

Tesis Doctoral

GENERACIÓN Y VALIDACIÓN DE UN MODELO ANIMAL ORTOTÓPICO DE CÁNCER DE ENDOMETRIO



Memoria presentada por la Licenciada

Silvia Cabrera Díaz

**para optar al grado de Doctora en Medicina y Cirugía por la
Universitat Autònoma de Barcelona**

Septiembre de 2013



V. RESULTADOS

1. LÍNEA CELULAR

Para nuestro trabajo necesitamos generar una línea celular originada en un cáncer de endometrio que nos permita realizar un seguimiento *in vivo* del modelo animal usando una señal bioluminiscente. La potencia de esta señal es fundamental para el correcto seguimiento del modelo, por lo que decidimos seleccionar el clon celular que produzca la mayor cantidad de luz para asegurarnos una mayor sensibilidad en la detección de posibles metástasis. Para controlar los artefactos que se pudieran producir debido a la selección clonal se realizaron diferentes experimentos *in vitro* que mostraron que no existen diferencias significativas en la morfología, proliferación e invasión de las células de los diferentes clones generados de Hec1A-Fluc respecto a la línea parental.

Inicialmente se estudió el nivel de emisión de luz que emite cada uno de los clones seleccionados con higromicina B mediante el kit Luciferase Assay System (Promega). Mediante este ensayo se seleccionaron los 3 clones que expresaban más luciferasa: los clones 4, 5 y 9. Estos tres clones se someten a diferentes ensayos para seleccionar el más adecuado para generar nuestro modelo.

1.1 Ensayo de expresión de luciferasa *in vitro* mediante sistema IVIS

La producción de luz medida por el sistema IVIS de cada variante celular en el experimento *in vitro* resultó lineal y proporcional al número de células en la placa. En base a esta experimental, el clon 5 de Hec1A-Fluc presentó la mayor emisión de luz (Figura 21).

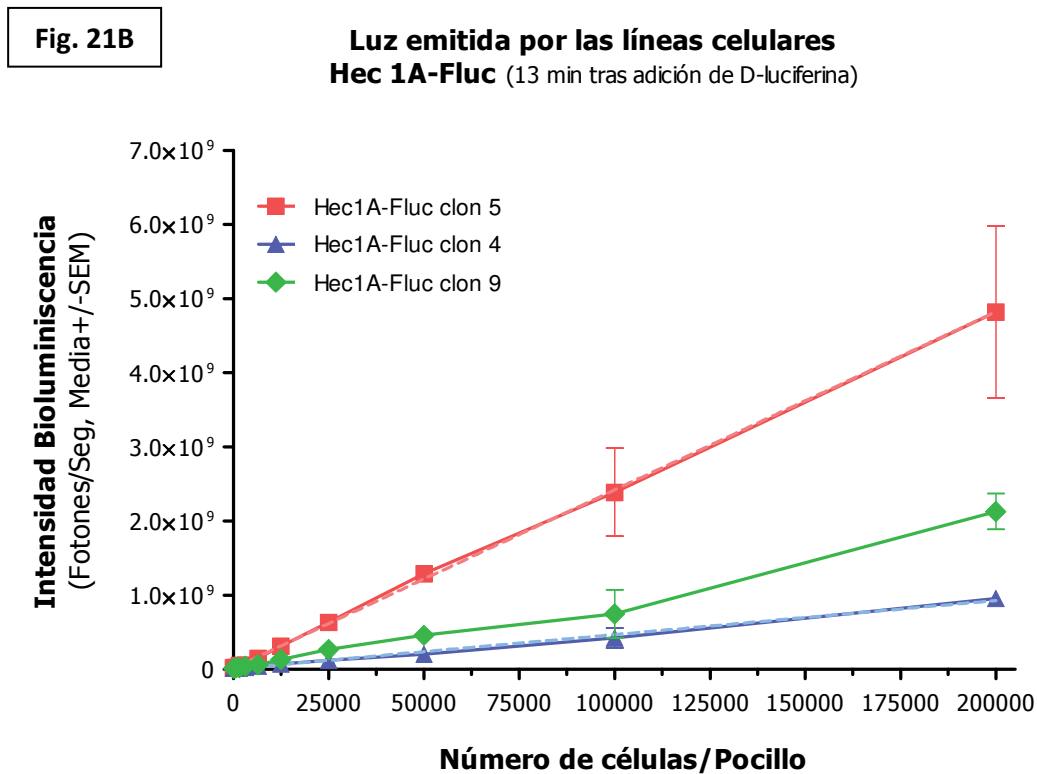
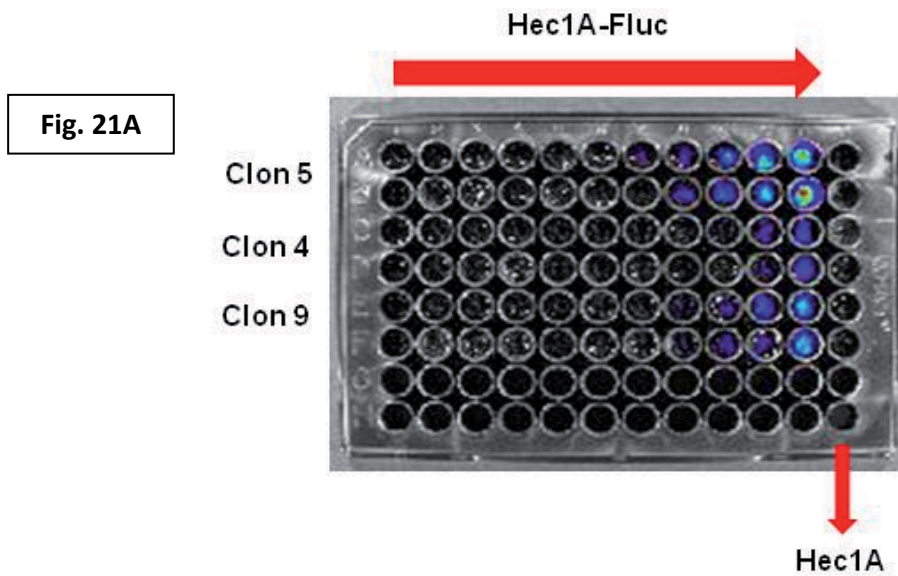


Figura 21. Emisión de bioluminiscencia detectada en el sistema IVIS in vitro.

A: Imagen de la placa obtenida en el ensayo de bioluminiscencia *in vitro* en el sistema IVIS (ver la distribución de pocillos representada en la figura 14)

B: Emisión de luz detectada por el sistema IVIS de las diferentes líneas celulares, el clon 5 es el seleccionado por emitir la mayor cantidad de luz.

1.2 Resultado del análisis de la morfología celular de los diferentes clones

Previamente a la selección de clon, chequeamos la morfología y el comportamiento de los diferentes clones en cultivo celular. En la figura 22 se observa que todos los clones generados tras la inserción del vector de la luciferasa presentan un fenotipo similar a las células Hec1A originales y son morfológicamente parecidos entre ellos. Todos ellos muestran un fenotipo epitelial con formación de colonias compactas.

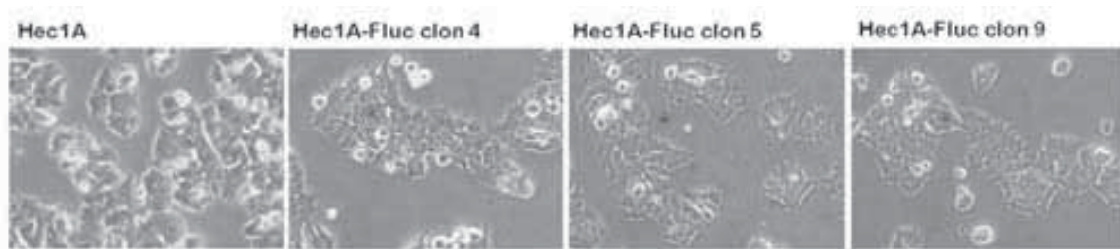


Figura 22. Imágenes en contraste de fase de la línea celular Hec1a y los clones 4, 5 y 9 de la línea Hec1a Fluc (20x)

1.3 Ensayo de proliferación celular

En el ensayo de proliferación celular usando CellTiter 96® AQueous One Solution (MTS) (Promega) realizado a 24 y 48 horas se observa que el nivel de proliferación de los 3 clones seleccionados es similar al de la línea parental Hec1A (Figura 23).

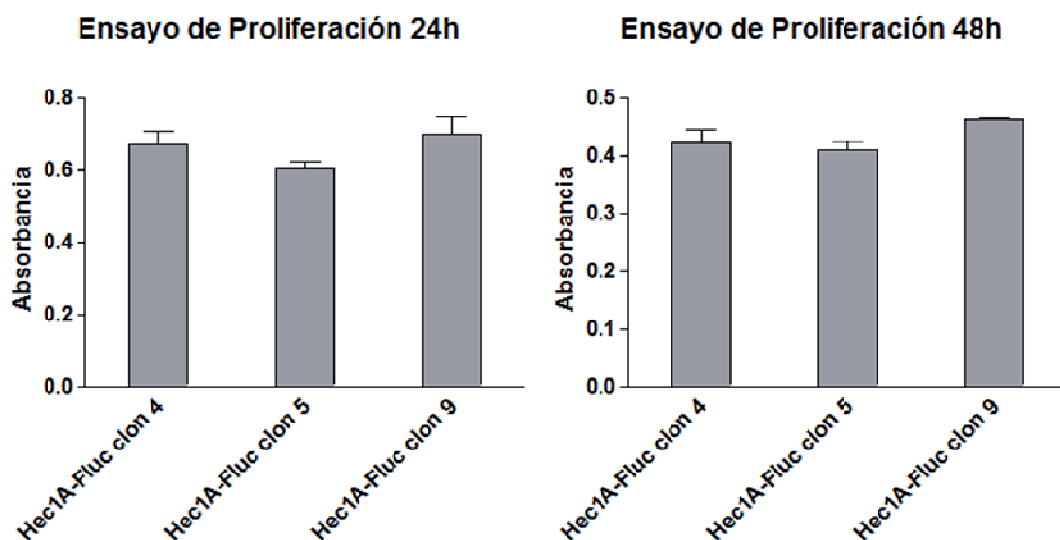


Figura 23. Ensayo de proliferación celular a 24 y 48h de los clones celulares 4, 5 y 9.

V. RESULTADOS

Específicamente si comparamos el nivel de proliferación del clon usado en la generación de nuestro modelo (Hec1A-Fluc clon 5) con el de la línea celular original antes de realizar la inserción del vector de la luciferasa, se observa que la proliferación celular a 48h es ligeramente inferior (no significativo), por lo que deducimos que la modificación realizada en el clon no le confiere una mayor agresividad a nivel de multiplicación celular que la línea original (Figura 24).

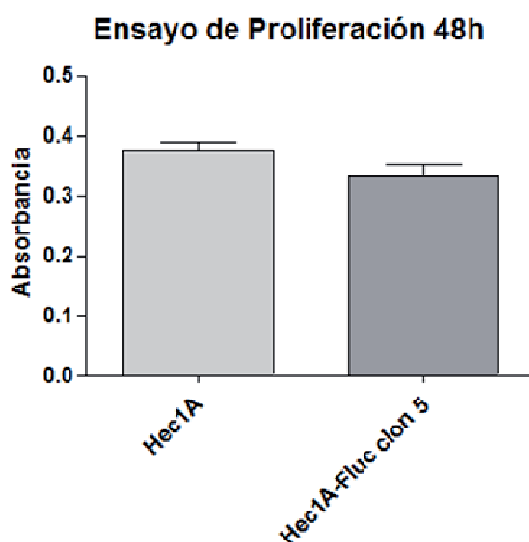


Figura 24. Ensayo de proliferación celular a 48 horas entre la línea original Hec1A y el clon 5 seleccionado para generar el modelo animal.

1.4 Ensayo de invasión Transwell

El ensayo de invasión se realizó por triplicado usando el Cytoselect 24-well cell migration assay (Cell Biolabs) para la línea celular Hec1A original y los diferentes clones generados. El clon 5 presenta una capacidad de invasión muy similar a la línea celular original, mientras que el clon 4 y 9 presentaban tasas de invasión inferiores a la línea original (Figura 25).

Finalmente se selecciona el clon 5 para el desarrollo del modelo animal, dado que es el clon que emite mayor cantidad de luz y presenta un comportamiento similar al de la línea celular original Hec1A, en base a la observación de su fenotipo y del estudio de proliferación e invasividad.

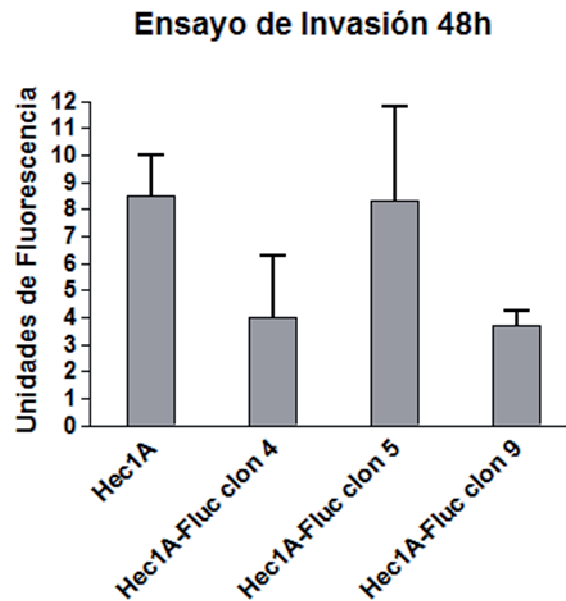


Figura 25. Ensayo de invasión Transwell.

2. SELECCIÓN DE TIPO DE RATÓN PARA GENERAR EL MODELO: ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE RATONES BALB-C NUDE Y SWISS NUDE

Se realiza un ensayo piloto para determinar qué tipo de animal nos ofrece las mejores características desde el punto de vista de generación de tumor y de resistencia a la agresión quirúrgica, dado que se trata de una cirugía abierta con manipulación de contenido abdominal.

Para la selección del tipo de animal se realiza la generación del modelo mediante la técnica descrita en el trabajo publicado por Doll et al. (95), en el cual se genera tumor ortotópico localmente infiltrante tras la sutura de tejido tumoral humano al fundus uterino del ratón por su cara externa. En este modelo, el desarrollo del tumor se produce desde fuera del útero hacia dentro, y el desarrollo de metástasis es raro. Esta técnica quirúrgica es más sencilla y por este motivo consideramos que era la de elección en este ensayo previo. Realizamos esta técnica ortotópica a 5 ratones Swiss Nude y 5 ratones Balb-c Nude del mismo tiempo de vida (5 semanas). Los resultados de este experimento se presentan en la Tabla14.

V. RESULTADOS

TIPO DE RATÓN	TIPO HISTOLÓGICO INOCULADO	PESO INICIAL (G.)	PESO FINAL (G.)	TIEMPO DE VIDA (DÍAS)	VOLUMEN TUMOR ORTOTÓPICO	GENERACIÓN METÁSTASIS	EVOLUCIÓN	
Balb-c Nude	Endometrioide IIB G2	1	18.6	20.8	85	++	No	Buena
		2	19.2	22.4	85	+++	No	Buena
	3	19.6	21.5	115	++	No	Buena	
	4	Célula clara IIB G3	17.4	17.8	110	-	No	Sacrificio por mal estado general, pérdida de peso, deshidratación.
	5	18.6	19.5	115	-	No	Muerte espontánea	
Swiss Nude	Endometrioide IIB G2	1	26.9	25.6	75	++	No	Buena
		2	26.5	33.6	89	++	No	Buena
	3	29	31	89	++	No	Buena	
	4	Célula clara IIIB G3	26.7	27	40	+++	No	Buena
	5	26.2	28.5	40	+++	No	Buena	

Tabla 14: Resultados de experimento para determinar la cepa de ratones más adecuada para generar el modelo animal.

Tumor primario: (-) ausencia de crecimiento, (+) crecimiento escaso, (++) crecimiento moderado, (+++) crecimiento importante.

En este estudio inicial comparativo los ratones Balb-c Nude presentaron peores resultados de generación de tumor (100% de generación de tumor ortotópico en ratones Swiss Nude vs 80% en ratones Balb-c Nude) y peor tolerancia a la generación de tumor (100% supervivencia al experimento de los ratones Swiss Nude vs 60% de los ratones Balb-c Nude). Se observa que los ratones Balb-c Nude presentan volúmenes de tumor ortotópico mayores en menor período de tiempo, lo que hace que los animales toleren peor la generación de tumor y su estado se afecte antes. Además, durante la manipulación quirúrgica existió una sensación subjetiva por parte de las investigadoras que operan a los animales de mayor dificultad en la realización de la técnica, dado que los animales Balb-c nude son más pequeños para el mismo tiempo de vida (el peso medio de los animales al principio del experimento es inferior en los ratones Balb-c Nude, media de 18,68 g. vs 27,06 g.) observándose una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de ambos grupos ($p < 0.01$).

Por todos estos motivos se considera que el desarrollo del modelo se realizaría de forma más efectiva y segura con el animal Swiss Nude.

3. GENERACIÓN DEL MODELO ANIMAL ORTOTÓPICO A PARTIR DE CÉLULAS Hec1A-Fluc

1. EXPERIMENTO PILOTO 1

ESTUDIO DE LA GENERACIÓN TRANSMIOMETRIAL DE TUMOR ORTOTÓPICO

- Se genera el modelo ortotópico mediante **inyección transmiometrial** de células Hec1A-Fluc en **3 ratones Swiss Nude**.
- Se realiza estudio con **bioluminiscencia *in vivo*** mediante el sistema IVIS en los días 0, 7, 21, 26, 33, 40 y 47 tras la inoculación de las células tumorales.
- El día 47 se procede a la **necropsia** y al estudio con **bioluminiscencia *ex vivo***
- Se observó tumor ortotópico endometrial en **2 de los 3** ratones inoculados.

1.1 BIOLUMINISCENCIA *IN VIVO*

En el estudio mediante bioluminiscencia *in vivo* realizado a **día 0**, sólo un animal de los tres inoculados presenta señal ortotópica. La señal a **día 7** se observa en el útero de los 3 ratones, sin otras lesiones localizadas a nivel abdominal que pudieran indicar una incorrecta inyección del inóculo. Los **días 21 y 26**, dos de los ratones presentan tumor localizado fuera de la pelvis, en concreto a nivel subdiafragmático (ratón 1) y a nivel del tejido pancreático (ratón 2). El ratón 3 no desarrolla tumor abdominal detectable a lo largo del ensayo. En los siguientes controles se observa un crecimiento tanto del tumor ortotópico como de los implantes abdominales. El **día 33**, el ratón 1 presenta señal bioluminiscente localizada en la cavidad torácica, signo de metástasis hematógena a pulmón. Se decide el sacrificio de los animales el **día 47** por el elevado volumen tumoral y la afectación del estado general. La Figura 26 muestra las imágenes de bioluminiscencia *in vivo* obtenidas a lo largo del experimento.

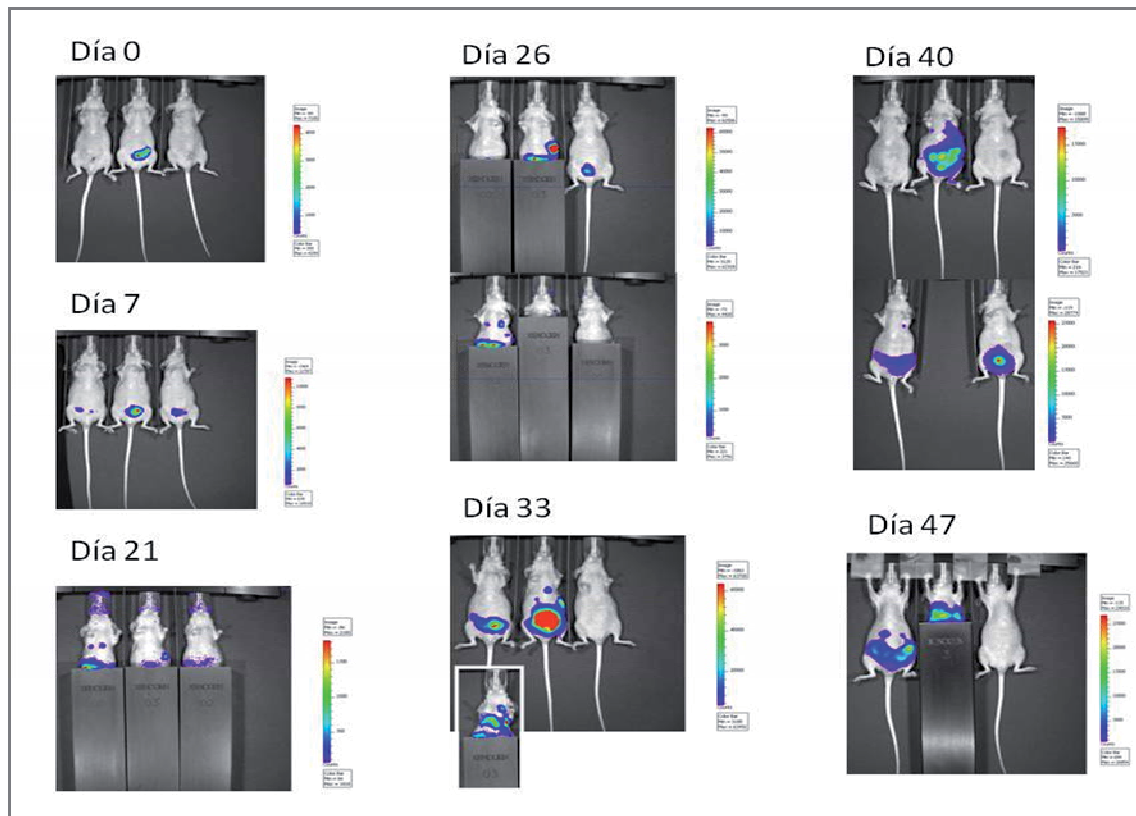


Figura 26. Imágenes representativas del estudio piloto 1 para la generación de un modelo ortotópico transmiométrial. De izquierda a derecha, *ratón 1- ratón 2 – ratón 3*. Se observa la aparición de tumor pélvico en los tres animales el día 7. A partir del día 21 tras la inoculación del tumor se puede detectar enfermedad diseminada por la cavidad abdominal en los ratones 1 y 2. A día 40 y 47, el ratón 2 presenta enfermedad detectable intratorácica.

1.2 BIOLUMINISCENCIA *EX VIVO*

Los resultados del estudio *ex vivo* de los tejidos de los 3 animales y del estudio histológico con hematoxilina- eosina se presentan en la Tabla 15 y Figura 27.

Se observa una adecuada correlación entre los resultados obtenidos mediante la bioluminiscencia *ex vivo* y el estudio histológico, con una sensibilidad de detección de metástasis del 85.2% y una especificidad del 94.4% (Tabla 15).

		RATÓN 1		RATÓN 2		RATÓN 3	
		Biolum.	Histología	Biolum.	Histología	Biolum.	Histología
Diseminación Pélvica	Útero	+	+	+	+	-	-
	Ovarios	-	+	-	-	+	-
	Grasa Pélvica	+	+	+	+	-	-
Diseminación Linfática	G. Inguinales	-	+	+	+	-	-
	G. Mediastínicos	+	+	+	+	-	-
	G. Para-aórticos	+	+	+	+	-	-
	G. Para-aórticos renales	+	+	+	+	-	-
	G. Mesentéricos	+	+	+	+	-	-
	G. Axilares	+	+	+	+	-	-
Diseminación Abdominal	Diafragma	-	+	+	+	-	-
	Bazo	-	-	+	+	-	-
	Estómago	-	+	+	+	-	-
	Hígado	-	-	+	+	-	-
	Páncreas	+	+	+	+	-	-
Diseminación Hematógena	Pulmón	+	+	+	+	-	-

Tabla 15A. Resultados de bioluminiscencia *ex vivo* y estudio histológico de los tejidos obtenidos de la necropsia de los 3 animales del experimento piloto 1.

V. RESULTADOS

		Resultados Histología		Total
		Negativo	Positivo	
Resultados Bioluminiscencia	Negativo	17	4	21
		94,4%	14,8%	46,7%
Resultados Bioluminiscencia	Positivo	1	23	24
		5,6%	85,2%	53,3%
Total		18	27	45
		100,0%	100,0%	100,0%

Tabla 15B. Comparación de los resultados obtenidos mediante ambos métodos para determinar la sensibilidad y especificidad de la técnica de bioluminiscencia respecto al estudio histológico en el experimento piloto 1. En este primer experimento piloto se obtiene una sensibilidad de la bioluminiscencia de 85,2% y una especificidad de 94,4%.

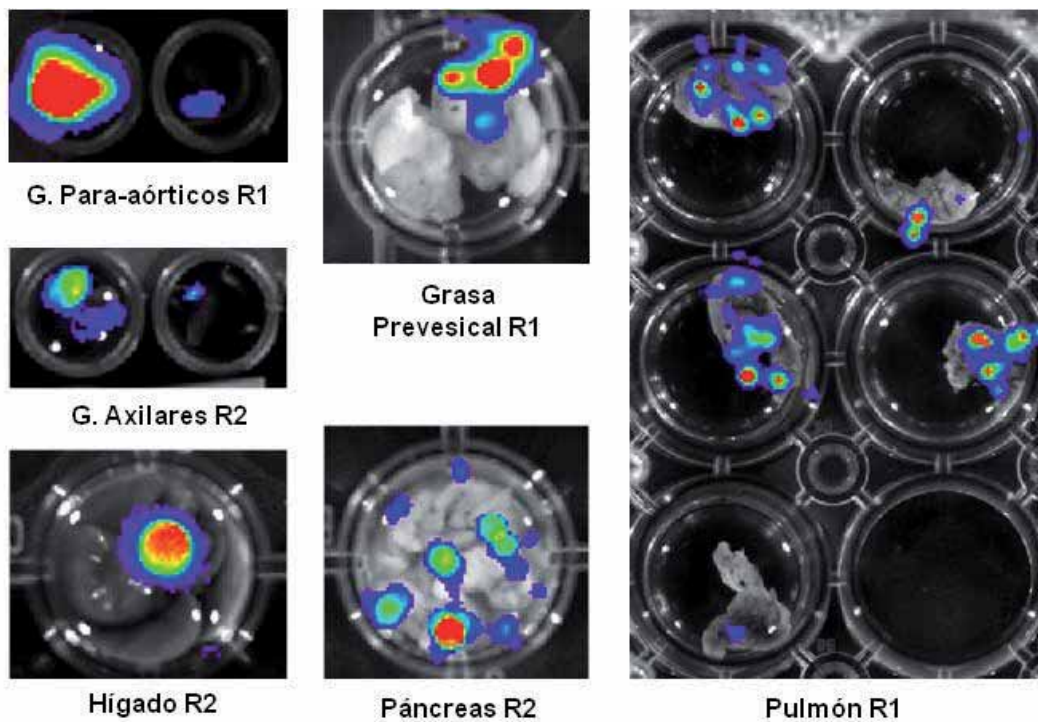


Figura 27. Ejemplos de lesiones tumorales visibles mediante bioluminiscencia *ex vivo*.

R1: ratón 1, R2: ratón 2. Se observan lesiones bioluminiscentes en ganglios para-aórticos y grasa prevesical del ratón 1, y ganglios axilares, hígado y páncreas del ratón 2. También se observa la extensa afectación metastásica de los lóbulos pulmonares del ratón 1, mostrados individualizados.

Con los datos obtenidos en el primer experimento piloto debemos destacar lo siguiente:

- El ratón 3 no desarrolló tumor ortotópico ni a distancia, el estudio con bioluminiscencia *in vivo* y *ex vivo* detectó un artefacto en los ovarios del animal que no se confirmó tras el estudio histológico.
- Los ratones 1 y 2 desarrollaron tumor ortotópico voluminoso y a distancia, de localización abdominal, torácica y ganglionar. Es importante destacar que el sistema IVIS detecta bioluminiscencia proveniente de un tejido, pero que no puede detectar si la señal se emite desde el interior del órgano (metástasis intraparenquimatosas) o desde el exterior (implante tumoral). Este hecho es de importancia ya que los órganos intra-abdominales que resultaron positivos mediante bioluminiscencia *ex vivo* no correspondían a metástasis intraparenquimatosas sino a implantes superficiales por diseminación intra-abdominal de las células tumorales, como posteriormente se comprobó en el estudio histológico.

1.3 NECROPSIA. ESTUDIO HISTOLÓGICO

Los dos animales que desarrollaron tumor endometrial presentaron además una franca diseminación metastásica en región pélvica y abdominal, diseminación linfática y en ambos se detectaron metástasis hematógenas a pulmón. Los dos ratones presentarían un estadio IVB de la FIGO.

En la tabla 16 se resumen los resultados de metástasis hallados en el estudio histológico de los 3 animales de este experimento piloto, y en la figura 28 se observan algunos hallazgos de la necropsia.

V. RESULTADOS

VÍA DE DISEMINACIÓN	INOCULACIÓN TRANSMIOMETRIAL	
	n=3	
	Tumor endometrial	2
Incidencia tumoral		66,6%
Transcelómica pélvica	Ovarios	1 (50%)
	Grasa Pélvica	2 (100%)
	Diafragma	2 (100%)
	Páncreas	2 (100%)
Transcelómica abdominal	Glándula Suprarrenal	2 (100%)
	Bazo	1 (50%)
	Estómago	2 (100%)
	Hígado	1 (50%)
Linfática	G. Inguinales	2 (100%)
	G. Mediastínicos	1 (50%)
	G. Para-aórticos	2 (100%)
	G. Mesentéricos	0
Hematógena	G. Axilares	2 (100%)
	Pulmón	2 (100%)

Tabla 16. Resultados histológicos del grupo de animales del experimento piloto 1.

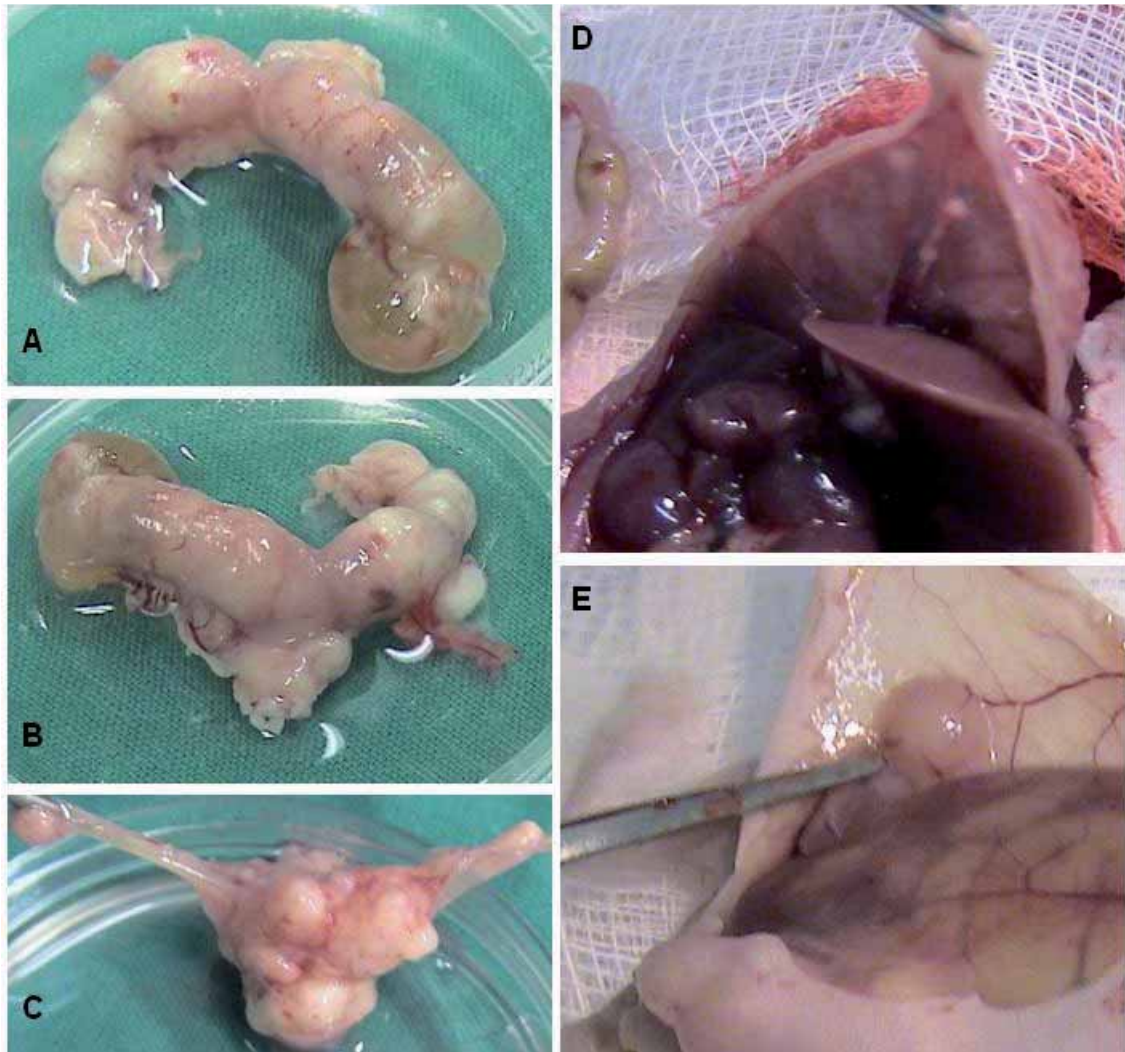


Figura 28. Composición en que se observan diferentes hallazgos macroscópicos en la necropsia de este grupo de animales.

A, B, útero en su visión anterior y posterior, se observan los cuernos uterinos ampliamente infiltrados por tumor,

C, útero completamente infiltrado por tumor en que no se distingue la anatomía uterina, sólo las trompas y los ovarios,

D, diafragma y cápsula hepática infiltrados por tumor,

E, adenopatía inguinal de aspecto metastásico.

2. EXPERIMENTO PILOTO 2

ESTUDIO DE LA GENERACIÓN TRANSVAGINAL DE TUMOR ORTOTÓPICO

- Se genera el modelo ortotópico mediante la técnica de **inoculación transvaginal** de células Hec1A-Fluc en **5** ratones Swiss Nude
- Se realiza estudio con **bioluminiscencia *in vivo*** mediante el sistema IVIS en los días 0, 6, 16 y 30 tras el día de la inoculación de las células tumorales
- Se realiza **necropsia** de los animales el día 30 para estudio histológico, sin estudio de bioluminiscencia *ex vivo* ya que no se detectó señal bioluminiscente en ningún animal a lo largo del experimento
- Ninguno de los animales inoculados desarrolló tumor ortotópico endometrial

2.1 BIOLUMINISCENCIA *IN VIVO*

El día de la inoculación (día 0), 3 de los 5 animales generados presentan señal detectable a nivel pélvico, aunque esta señal no se detecta posteriormente en ningún animal a día 6, 16 ni 30. La Figura 29 muestra las imágenes de bioluminiscencia obtenidas esos días.

2.2 BIOLUMINISCENCIA *EX VIVO*

No se realiza, ya que no se detectó señal bioluminiscente *in vivo* en ningún animal a lo largo del experimento.

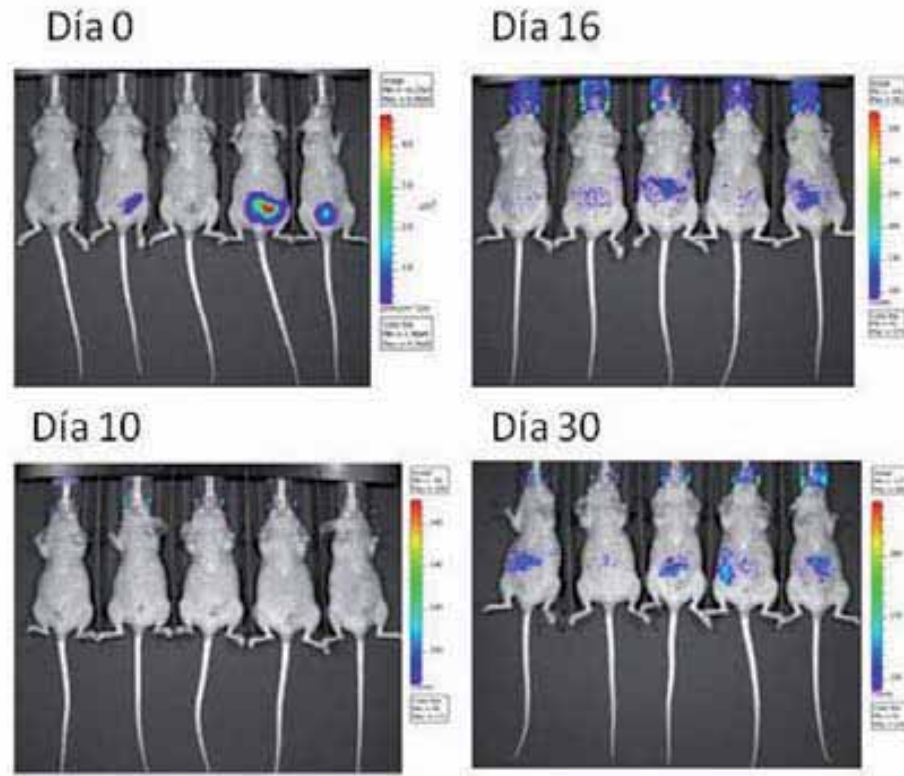


Figura 29. Imágenes de bioluminiscencia obtenidas en el estudio piloto 2. Se observa emisión de luz el mismo día de la inoculación transvaginal. Posteriormente en los siguientes controles esta señal se pierde, e incluso bajando la escala a niveles muy bajos no se detecta señal (fíjese en que el aire espirado por los animales a través de las boquillas presenta la misma señal que el contenido abdominal).

2.3 NECROPSIA. ESTUDIO HISTOLÓGICO

La necropsia se realiza el día 30. Mediante el estudio histológico con hematoxilina-eosina, no se observó tumor primario ni metástasis en ninguno de los animales generados por la técnica transvaginal (Tabla 17).

Técnica Transvaginal	n=3
Tumor endometrial	0
Metástasis	0

Tabla 17. Resultados histológicos del grupo de animales del experimento piloto 2.

3. EXPERIMENTO PILOTO 3

ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE LA GENERACIÓN TRANSVAGINAL Y TRANSMIOMETRIAL DE TUMOR ORTOTÓPICO

Para asegurar la viabilidad del modelo transmiometrial y descartar definitivamente el transvaginal, que tan malos resultados había dado en el experimento piloto 2, se decide realizar un experimento comparativo entre ambos métodos de generación del modelo ortotópico, operando a los animales el mismo día y bajo las mismas condiciones, y manipulándolos todos al mismo tiempo durante el seguimiento.

- Se generan **3 animales por vía transvaginal y 5 por vía transmiometrial**
- Se realiza **bioluminiscencia *in vivo*** los días 0, 6, 13, 20, 26, 33, 40 y 48
- Se realiza la **necropsia** de los animales el día 48, con estudio de **bioluminiscencia *ex vivo*** y estudio histológico el mismo día
- Los **5** animales generados por vía transmiometrial desarrollaron tumor ortotópico. De los ratones generados por vía transvaginal, sólo **1** animal mostró señal ortotópica durante el seguimiento y desarrolló tumor endometrial

3.1 BIOLUMINISCENCIA *IN VIVO*

Día 0

Tras la inoculación de los animales se realiza el primer estudio de bioluminiscencia. Se observa la distribución de la señal tras la inoculación en útero y la señal bioluminiscente llega hasta trompas y ovarios (Figura 30)

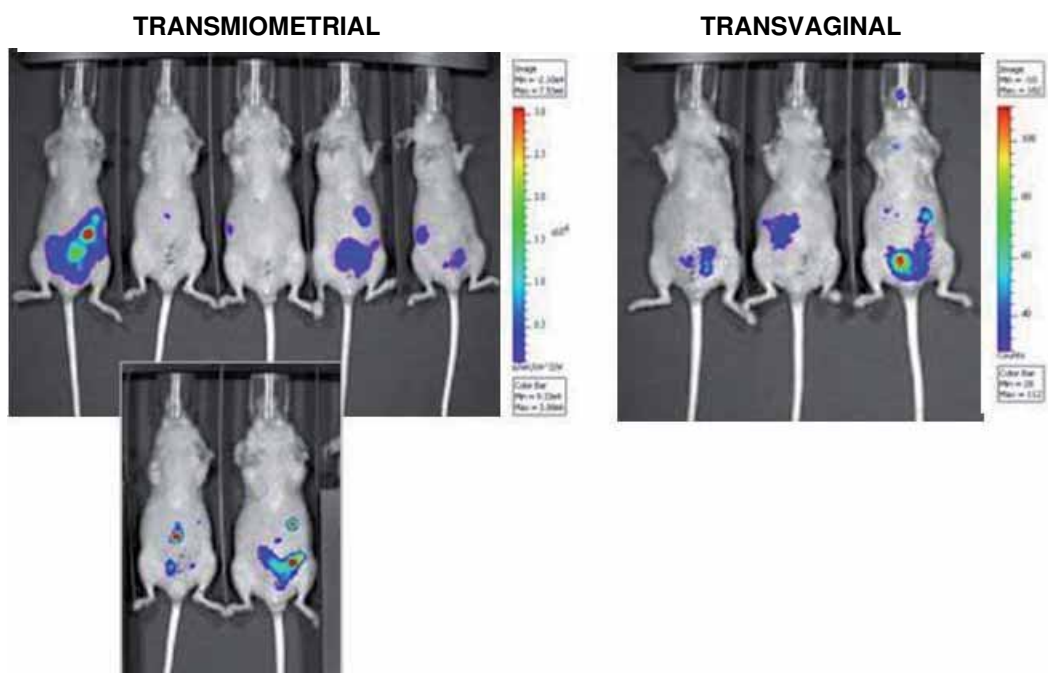


Figura 30. Distribución de la señal bioluminiscente a **día 0** en los ratones del experimento piloto 3. Los ratones 2 y 3 del grupo transmiometrial presentan señal detectable cuando se retiran los otros animales, que al tener una señal más potente impide su correcta detección.

Día 6

El día 6, todos los animales inoculados por vía transmiometrial y sólo uno de los inoculados por vía transvaginal presentaron señal pélvica. Es interesante destacar que éste es el único ratón que desarrollará tumor uterino en el experimento por vía vaginal, por lo que la imagen a día 0, en la que todos los animales generados por vía transvaginal tenían tumor, es menos

V. RESULTADOS

predictiva del desarrollo de tumor ortotópico que la que se detecta a la semana de la inoculación. Por este motivo, en los siguientes experimentos no realizaremos controles a día 0 de los animales (Figura 31)

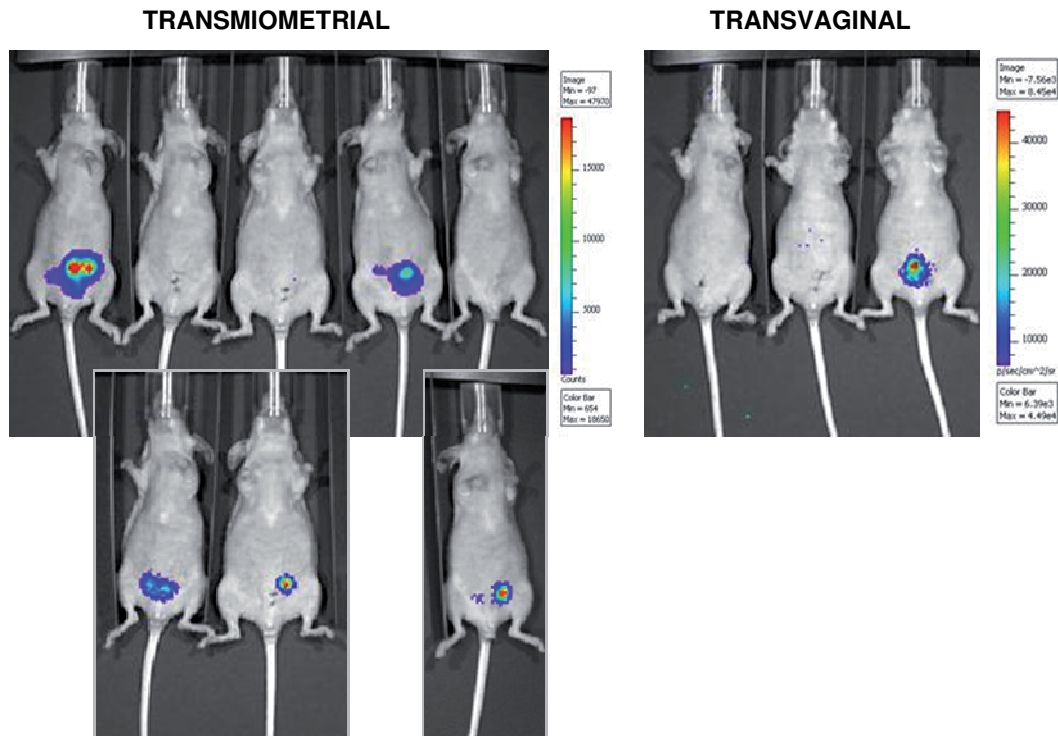


Figura 31. Distribución de la señal bioluminiscente a **día 6** en los ratones del experimento piloto 3. Los ratones 2, 3 y 5 del grupo transmiometrial presentan señal detectable cuando se retiran los otros animales. Los ratones 1 y 2 del grupo transvaginal pierden su señal ortotópica en este control.

En este día se estudia la **cinética de la D-luciferina** en nuestro modelo. Consiste en analizar la emisión de bioluminiscencia en los minutos posteriores a la inyección de D-luciferina a los animales, con el objetivo de determinar el mejor o mejores minutos para realizar las comparaciones entre los grupos de animales. En la Figura 32 se observa la representación gráfica de la cinética de la D-luciferina en este experimento. Se selecciona el **minuto 13** al observarse que es un momento de meseta en la emisión de bioluminiscencia que permitirá tomar y comparar los datos con comodidad.

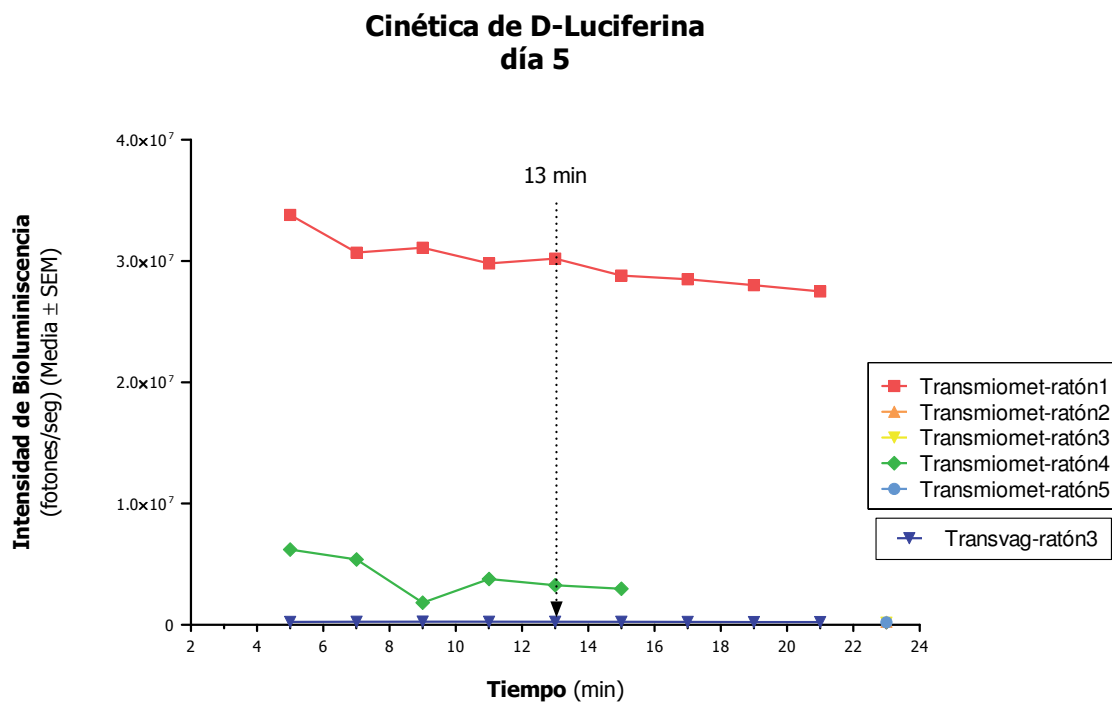


Figura 32. Cinética de la D-luciferina en el experimento piloto 3. Se observa la evolución de la señal bioluminiscente a lo largo del tiempo tras la inyección de D-luciferina a los animales.

Día 13

A día 13, todos los animales generados por vía transmiométrica presentaron tumor pélvico. En dos de ellos se puede detectar señal localizada a nivel subdiafragmático tras tapar el tumor primario. En el grupo generado por vía transvaginal sólo un animal presenta señal pélvica, sin otra señal de localización extra-pélvica detectable (Figura 33).

V. RESULTADOS

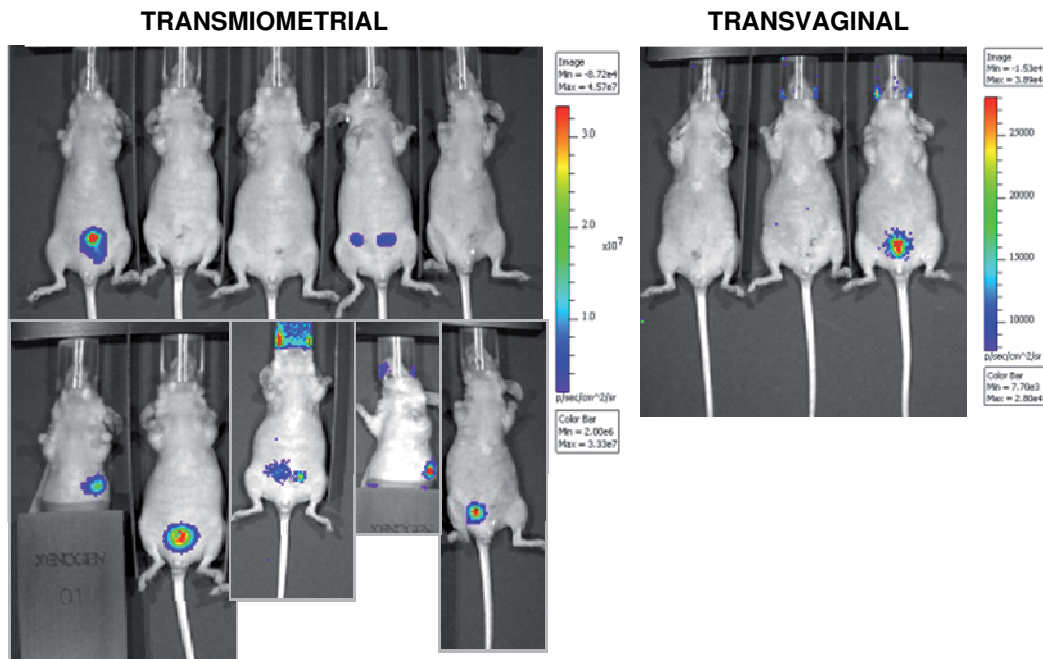


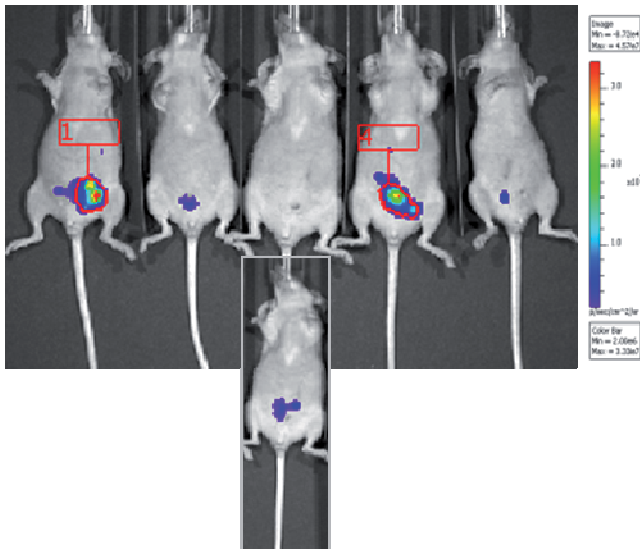
Figura 33. Distribución de la señal bioluminiscente a **día 13** en los ratones del experimento piloto 3. Todos los animales generados por vía transmiometrial presentan señal ortotópica, e incluso los ratones 1 y 4 del grupo presenta señal de localización subdiafragmática. Sólo un ratón del grupo transvaginal presenta señal ortotópica.

Días 20, 26 y 33.

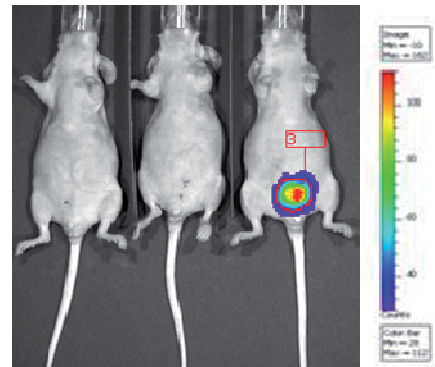
Durante el resto del seguimiento se observa progresión en el desarrollo del tumor pélvico y abdominal, de predominio subdiafragmático, en el grupo de inyección transmiometrial. Es de destacar que el ratón 5 del grupo transmiometrial presenta una señal pélvica pobre, y no se identifican metástasis intra-abdominales durante el experimento. En el grupo de inyección transvaginal sólo un animal desarrolla señal pélvica, y durante el seguimiento no se consigue detectar señal bioluminiscente extra-pélvica en este animal (Figura 34).

Día 20

TRANSMIOMETRIAL

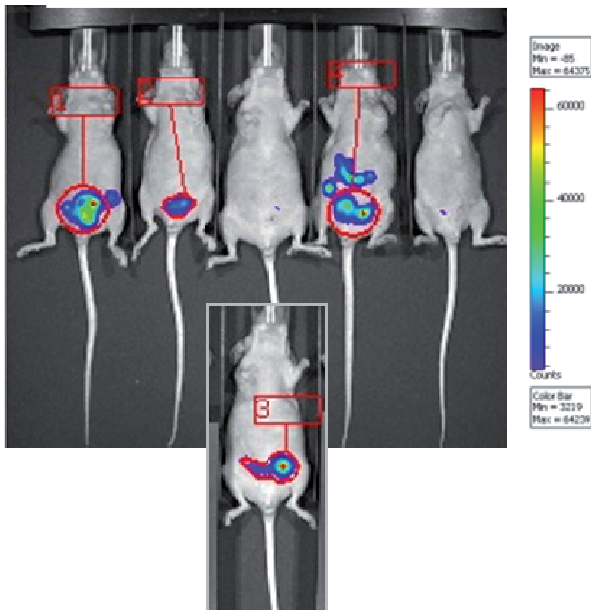


TRANSVAGINAL

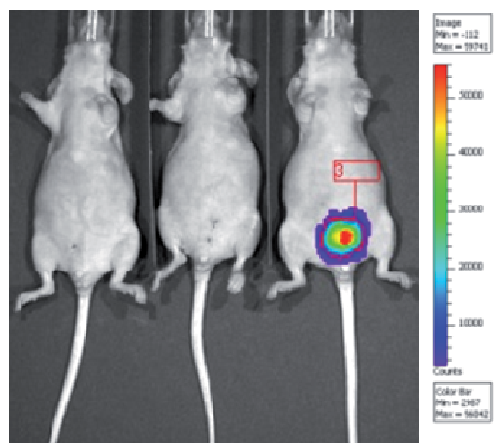


Día 26

TRANSMIOMETRIAL



TRANSVAGINAL



Día 33

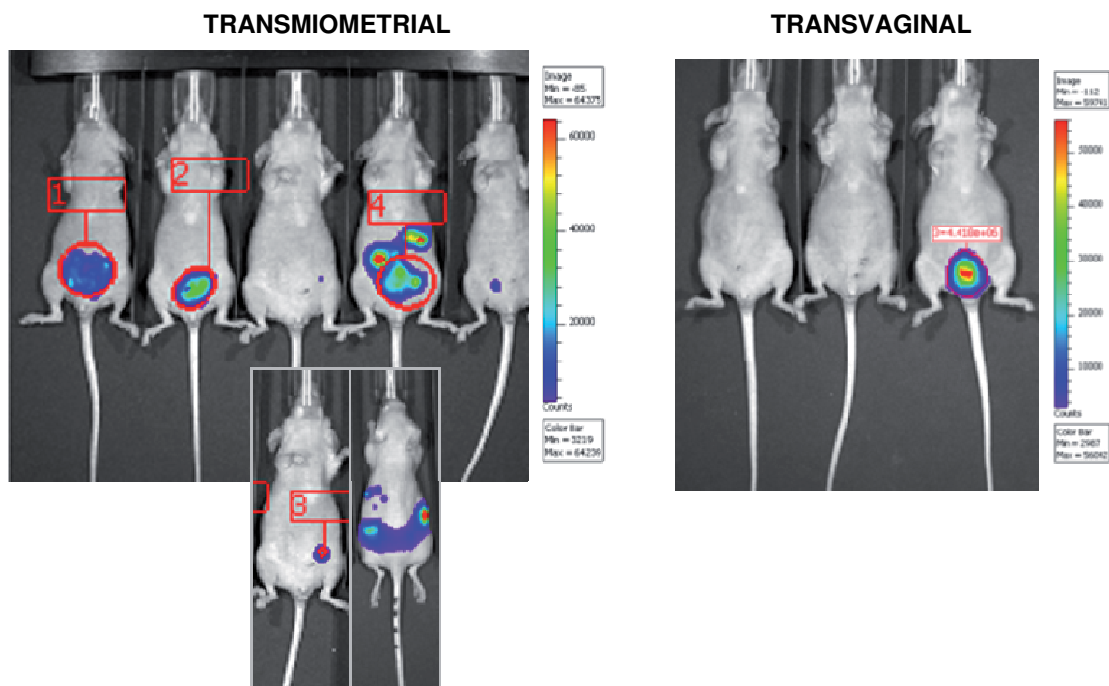
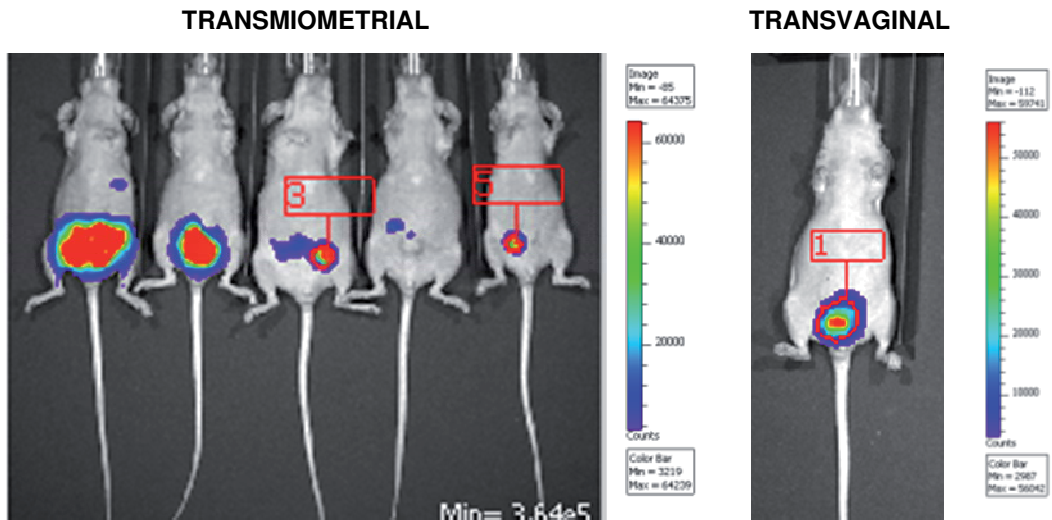


Figura 34. Distribución de la señal bioluminiscente a **día 20, 26 y 33** en los ratones del experimento piloto 3. Todos los animales generados por vía transmiometrial presentan señal ortotópica, el ratón 4 de este grupo presenta además señal de localización intra-abdominal muy importante. Sólo un ratón del grupo transvaginal presenta señal ortotópica.

Días 40 y 48.

A partir del día 40 de la inoculación del tumor se observa un desarrollo tumoral muy importante en las metástasis del animal, con un aumento del volumen tumoral que compromete en esta última semana el bienestar del animal. En la imagen del día 48, se observa la diseminación tumoral abdominal masiva que presenta el ratón 4, con un dibujamiento perfecto de ambas cúpulas diafragmáticas por infiltración tumoral. En el grupo transvaginal sólo se detecta señal pélvica en un animal. Se decide finalizar el experimento a día 48 (Figura 35).

Día 40



Día 48

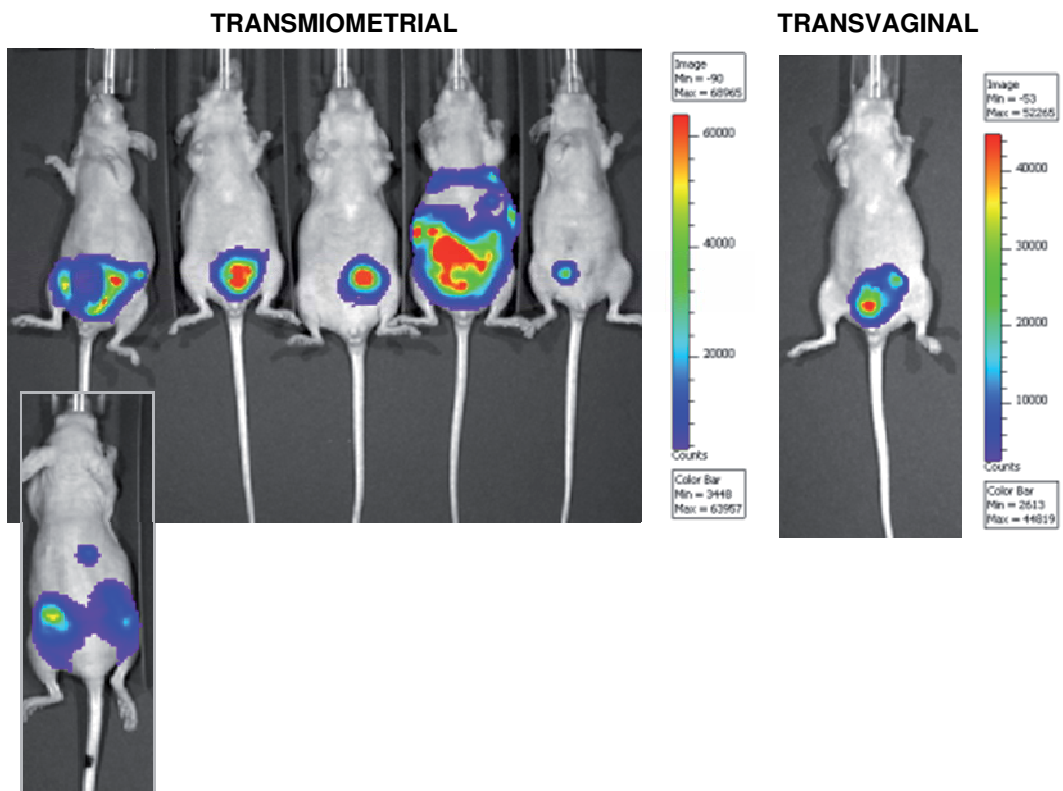


Figura 35. Distribución de la señal bioluminiscente a **día 40 y 48** en los ratones del experimento piloto 3. Afectación intrabdominal masiva en los ratones 1 y 4 del grupo transmiometrial.

V. RESULTADOS

En el análisis de la evolución de la señal bioluminiscente a lo largo de este experimento piloto, se observa que la señal ortotópica pélvica del grupo transvaginal es de menor intensidad al inicio del experimento, pero que va aumentando hasta generar una intensidad de señal similar a la del grupo transmiometrial (Figura 36).

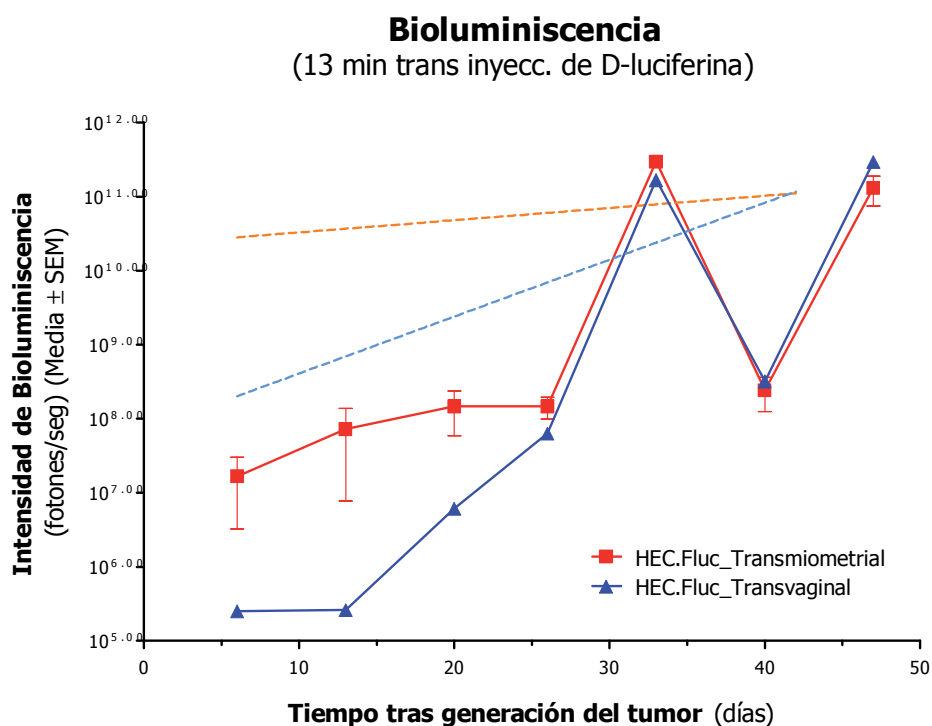


Figura 36. Intensidad de bioluminiscencia a lo largo de los días tras la inoculación del tumor ortotópico.

Destaca una caída brusca de la intensidad de señal detectada a día 40, que se produce de forma proporcional en todos los animales, y que se atribuye a problemas de calibración del sistema IVIS, sin que represente una disminución real del volumen tumoral. Por ese motivo se representa en línea discontinua la tendencia de la bioluminiscencia a lo largo del experimento.

3.2 BIOLUMINISCENCIA *EX VIVO*

A continuación se muestran imágenes representativas de los hallazgos del estudio necrópsico y del estudio con bioluminiscencia *ex vivo* (Figuras 37 y 38).

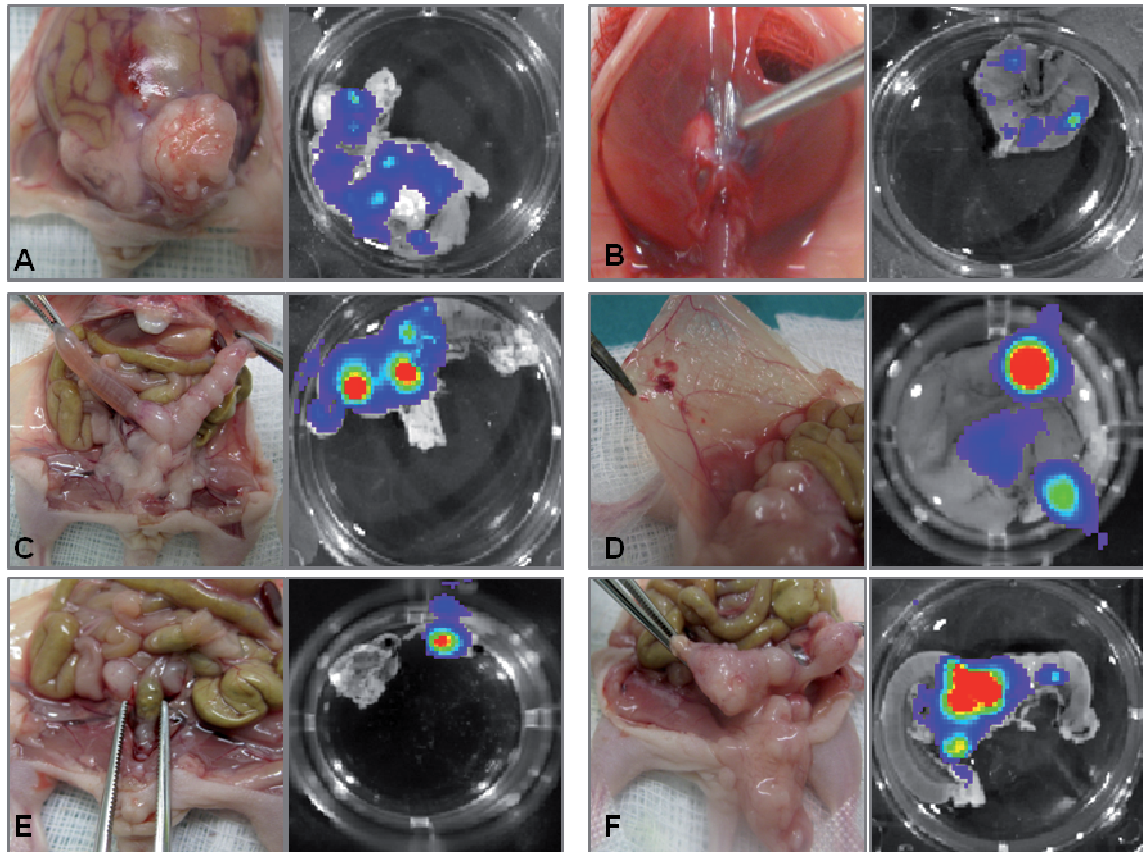


Figura 37. Imágenes combinadas de necropsia y bioluminiscencia *ex vivo*, en el grupo de animales generados por vía transmiometrial en el experimento piloto 3. (A) Afectación tumoral de la grasa pélvica que traspasa el peritoneo abdominal formando un gran tumor en la pared abdominal, se observa la emisión de luz del tumor en el estudio *ex vivo*. (B) Diafragma con implante metastásico y visión *ex vivo* del mismo tejido. (C) Útero infiltrado por tumor que afecta principalmente al cuerpo y al cuerno izquierdo, y visión en el estudio *ex vivo*. (D) Peritoneo deslustrado y nodular, sugestivo de infiltración tumoral que se confirma en el estudio *ex vivo*. (E) Ganglios para-aórticos tumorales, observados tras realizar la exéresis del útero y la vejiga, en el estudio *ex vivo* uno de ellos emite señal de forma marcada. (F) Tumor endometrial que infiltra totalmente el útero y afecta a la grasa pélvica, que se ha retirado para poder ver el útero en su totalidad, y estudio *ex vivo* del útero.

V. RESULTADOS

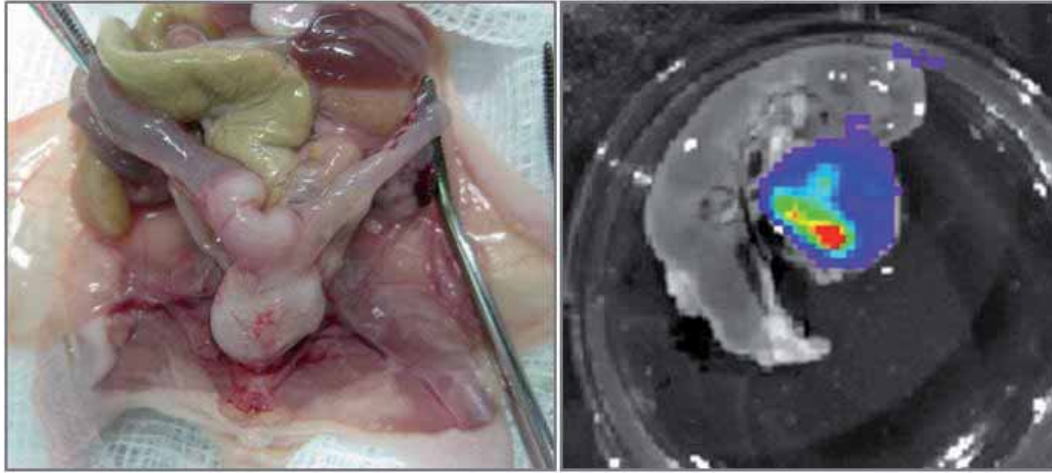


Figura 38. Imágenes combinadas de necropsia y bioluminiscencia *ex vivo*, en el único animal que desarrolló tumor del grupo transvaginal del experimento piloto 3. Se observa que la localización del tumor es principalmente a nivel cervical, y que el cuerpo y los cuernos uterinos se observan normales, excepto por una ligera distensión asociada a la retención del moco endometrial secretado.

En la tabla 18 se observan los resultados comparativos obtenidos mediante bioluminiscencia *ex vivo* y estudio histológico. Se observa que tanto la sensibilidad como la especificidad de la bioluminiscencia *ex vivo* para detectar metástasis en los tejidos estudiados son superiores al 90% en esta serie de animales.

		RATÓN 1		RATÓN 2		RATÓN 3		RATÓN 4		RATÓN 5		RATÓN 6	
		Biolum.	Histología	Biolum.	Histología	Biolum.	Histología	Biolum.	Histología	Biolum.	Histología	Biolum.	Histología
Diseminación Pélvica	Útero	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
	Ovarios	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Grasa Pélvica	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Diseminación Linfática	G. Inguinales	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	G. Mediastínicos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	G. Para-aórticos	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
	G. Axilares	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
Diseminación Abdominal	Diafragma	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-
	Bazo	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
	Hígado	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
	Páncreas	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-
Diseminación Hematógena	Cerebro	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Glándula Suprarrenal	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
	Pulmón	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-

Tabla 18A. Resultados del estudio mediante bioluminiscencia *ex vivo* y estudio histológico de los animales del experimento piloto 3.

V. RESULTADOS

		Resultados Histología		Total
		Negativo	Positivo	
Resultados Bioluminiscencia	Negativo	52	2	54
		94,5%	6,9%	64,3%
	Positivo	3	27	30
		5,45%	93,1%	35,7%
Total		55	29	84
		100%	100%	100%

Tabla 18B. Comparación de los resultados obtenidos mediante ambos métodos para determinar la sensibilidad y especificidad de la técnica de bioluminiscencia respecto al estudio histológico en el experimento piloto 3.

En el ratón 1 el hígado se consideró positivo a nivel histológico por la presencia de un implante superficial en la cápsula, pero no por la presencia de una metástasis intraparenquimatosa. Este implante no fue detectado por la bioluminiscencia. En este experimento se obtiene una sensibilidad de la bioluminiscencia del 93,1% y una especificidad del 94,5%.

3.3 NECROPSIA. ESTUDIO HISTOLÓGICO

En el estudio histológico con hematoxilina-eosina en este grupo de animales, se identificó tumor ortotópico endometrial en 4 de los animales generados por vía transmiometrial, y en uno de los generados por vía transvaginal. En el ratón 5 no se identificó tumor intrauterino pero sí se observaron implantes tumorales de pequeño tamaño en la grasa pélvica, en el tejido pancreático y en el diafragma. Este hecho probablemente se deba a que la inoculación de tumor no fue adecuada, y una parte de las células se diseminó por cavidad abdominal. Otra hipótesis sería que el tumor primario se necrosara después de iniciar el proceso de diseminación, aunque este hecho es menos probable.

De los animales que desarrollaron tumor ortotópico endometrial, todos presentaron diseminación ganglionar. Es de destacar este hecho ya que el único animal que desarrolló tumor pélvico y abdominal pero no endometrial, el ratón 5, a causa de una incorrecta técnica de inoculación, no presentó diseminación ganglionar. Esto nos indica que la metástasis ganglionar en este modelo es fruto de un verdadero proceso de infiltración miometrial y del espacio vasculo-linfático del miometrio.

VÍA DE DISEMINACIÓN	VIA TRANSMIOMETRIAL n=5	VIA TRANSVAGINAL n=3
	Tumor endometrial	4
Incidencia tumoral	80%	33.3%
Transcelómica pélvica	Grasa Pélvica 4 (100%)	0
	Páncreas 2 (50%)	0
Transcelómica abdominal	Peritoneo 1 (25%)	0
	Bazo 1 (25%)	0
	Hígado 2 (50%)	0
Linfática	Diafragma 1 (25%)	0
	G. Para- aórticos 4 (100%)	1 (100%)
	G. Axilares 2 (50%)	0
Hematógena	Pulmón 2 (50%)	0
	G.Supra- renal 3 (75%)	0

Tabla 19. Resultados histológicos del grupo de animales del experimento piloto 3.

Las diferencias en la eficacia de generación de tumor observada entre la inoculación por vía transmiometrial y transvaginal son estadísticamente significativas ($p=0.004$). Los ganglios para-aórticos se afectaron en el 100% de Los ratones que desarrollaron tumor endometrial.

ANÁLISIS CONJUNTO DE RESULTADOS DE LA COMPARACIÓN ENTRE LA VÍA DE INOCULACIÓN TRANSMIOMETRIAL Y LA TRANSVAGINAL EN LA GENERACIÓN DE UN MODELO ORTOTÓPICO USANDO CÉLULAS HEC1A-FLUC.

El análisis de los resultados de los tres ensayos previos se realiza agrupando los animales inoculados por vía transmiometrial (n=8) y los inoculados por vía transvaginal (n=8). Los resultados se presentan en la tabla 20.

En el grupo de inoculación transmiometrial, 6 ratones (75%) desarrollaron tumor ortotópico y todos ellos presentaron una diseminación metastásica en la cavidad pélvica, así como metástasis ganglionares. La mayor incidencia de metástasis ganglionares la encontramos en los ganglios para-aórticos, que se encuentran afectados en el 100% de los animales que desarrollan infiltración ganglionar. Las metástasis hematógenas en el pulmón se observaron en 4 ratones (66%). En el grupo transvaginal, solo un ratón (12.5%) desarrolló tumor ortotópico y metástasis pélvicas y ganglionares.

De estos resultados concluimos que la inoculación transmiometrial genera mayor incidencia de tumor ortotópico endometrial y de metástasis que la transvaginal en el modelo animal derivado de células Hec1A-Fluc, por lo que seleccionamos esta vía de inoculación como la de elección para la generación del modelo.

	INOCULACIÓN TRANSMIOMETRIAL (n=8)	INOCULACIÓN TRANSVAGINAL (n=8)	
TUMOR ENDOMETRIAL, n	6	1	
INCIDENCIA TUMORAL, %	75%	12,5%	
INCIDENCIA DE METÁSTASIS, %	Implantes pélvicos	6/6 (100%)	1/1 (100%)
	Metástasis ganglionar	6/6 (100%)	1/1 (100%)
	G. Para- aórticos	6/6 (100%)	1/1 (100%)
	G. Mediastínicos	1/6 (16%)	0/1 (0)
	G. Axilares	4/6 (66%)	0/1 (0)
	G. Inguinales	2/6 (33%)	0/1 (0)
	Implantes abdominales	5/6 (83%)	0/1 (0)
	Metástasis pulmonares	4/6 (66%)	0/1 (0)

Tabla 20. Comparación de resultados entre la vía de inoculación transmiometrial y transvaginal para la generación de un modelo animal ortotópico de cáncer de endometrio.

Las diferencias en la eficacia de generación de tumor observada entre la inoculación por vía transmiometrial y transvaginal son estadísticamente significativas ($p < 0.001$).