

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



4. EXPERIMENTO 4

VALIDACIÓN DEL MODELO ANIMAL ORTOTÓPICO TRANSMIOMETRIAL A PARTIR DE CÉLULAS HEC1A-FLUC

- Se inoculan **diecisiete ratones** con células Hec1A-Fluc usando la técnica **transmiometrial**
- Durante el ensayo se eliminan dos ratones del experimento, uno de ellos por no desarrollar tumor ortotópico tras 19 días de seguimiento y el otro por presentar una insuficiencia renal aguda. Así, quince ratones fueron monitorizados satisfactoriamente a lo largo de todo el experimento
- Durante el seguimiento se toman imágenes de **bioluminiscencia *in vivo*** del tumor de crecimiento ortotópico y de las lesiones metastásicas los días 5, 12, 19, 26, 33, 40, 44 y 47 tras la inoculación de las células tumorales
- La **necropsia** y el estudio mediante **bioluminiscencia *ex vivo*** e histológico se realiza el día 47 tras la inoculación
- **Dieciséis ratones** generan tumor endometrial (94%). Más del 80% de ellos presentan desarrollan metástasis ganglionares o a distancia.

4.1 BIOLUMINISCENCIA *IN VIVO*

Día 5

En los ensayos previos se realizaba control del animal el mismo día del implante, pero se observó que la presencia de señal bioluminiscente este día no se correlacionaba con el desarrollo de tumor ortotópico en días posteriores, además de suponer una manipulación muy agresiva para el animal realizar la bioluminiscencia el mismo día de la intervención, por lo que se elimina este primer control y se pospone hasta el día 5.

En el estudio con bioluminiscencia a día 5 tras el implante quince de los ratones inoculados presentaban señal de localización ortotópica a nivel pélvico sin señal de diseminación abdominal (Figura 38). Uno de los animales (ratón 5) presentó una imagen subdiafragmática compatible con un implante extra-uterino en este primer control, por lo que se considera fruto de una técnica de inoculación inadecuada y se descarta del experimento, aunque se sigue para evaluar su evolución. Otro de los animales (ratón 17) no presenta tumor uterino.

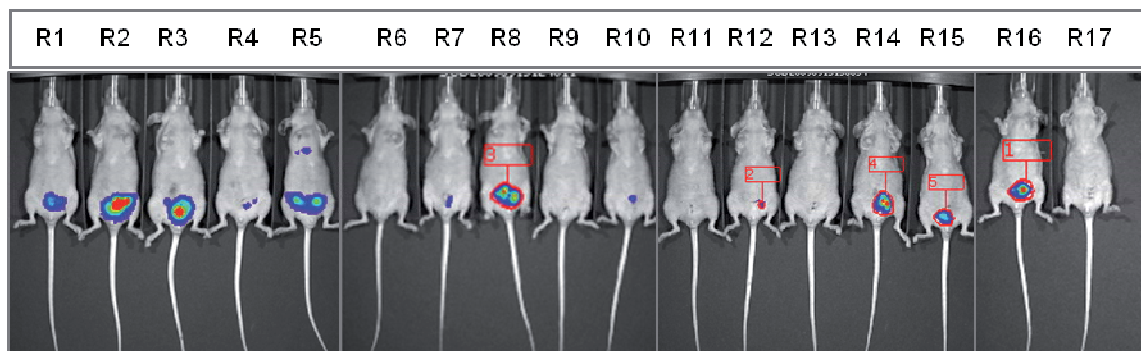


Figura 38. Imagen *in vivo* de los 17 ratones inoculados a día 5. El ratón 5 (R5) presenta una imagen sugestiva de implante en la región subdiafragmática, sospechosa de ser el resultado de una técnica de inoculación incorrecta en lugar de un proceso de infiltración miometrial y metástasis.

En este primer análisis se determina además la **cinética de la D-luciferina** *in vivo* del modelo. Se considera que el **minuto 11** es el minuto de máxima emisión de luz y que además supone un momento de valle de la emisión, por lo que se selecciona para comparar los animales a lo largo del experimento (Figura 39).

Cinética de D-Luciferina día 5

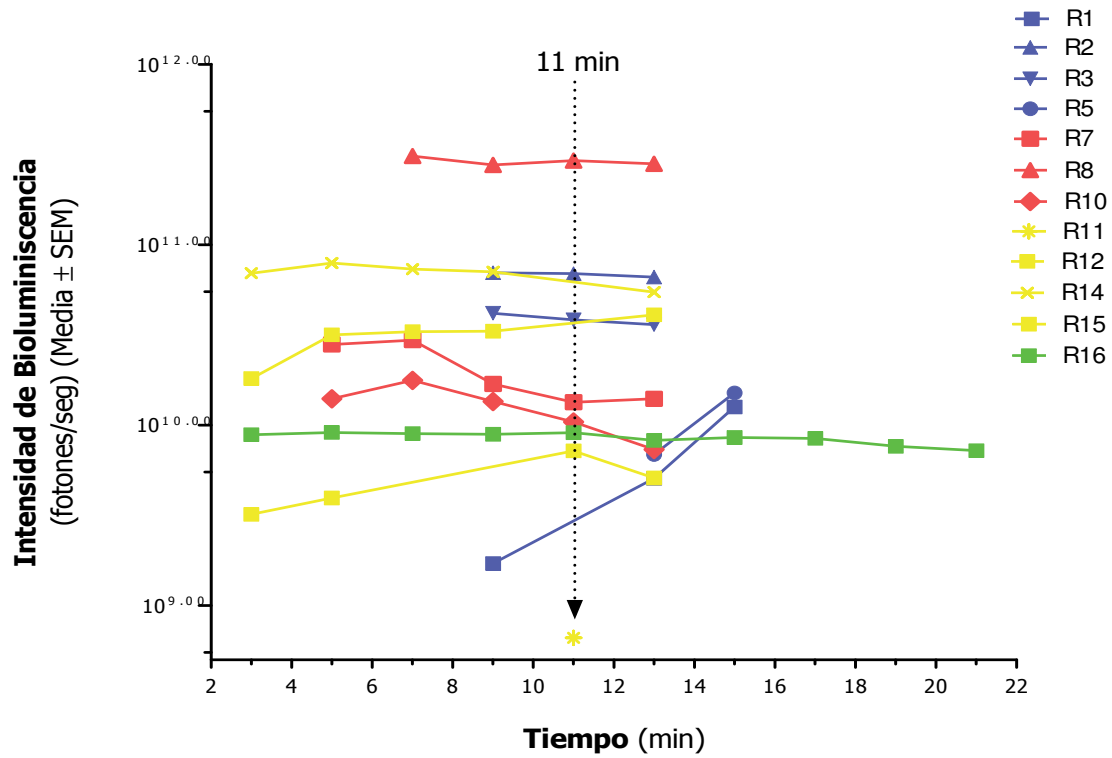


Figura 39. Cinética de la D-luciferina en el experimento de validación. Se selecciona el momento en que se observa una mayor emisión por parto de todos los animales que componen el experimento

Día 12

Se detecta señal pélvica en quince de los diecisiete ratones inoculados. Algunos animales presentan señales que podrían corresponder a metástasis ováricas a través de las trompas de células tumorales, o a implantes abdominales (Figura 40).

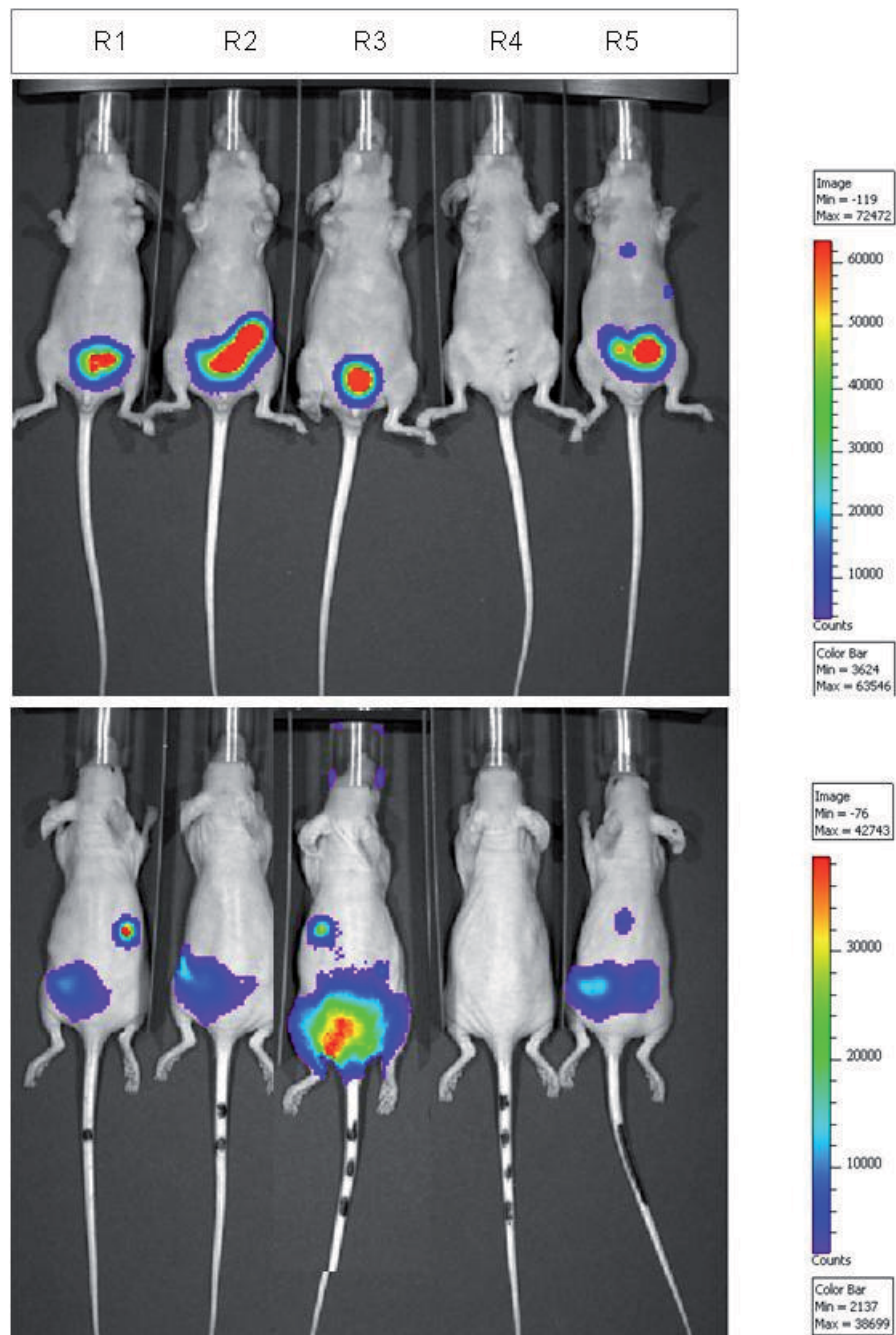


Figura 40 - GRUPO 1. Visión ventral y dorsal de los ratones 1-5. Los ratones 1 y 3 presentan imágenes de metástasis a hemiabdomen superior. Ausencia de señal en el ratón 4.

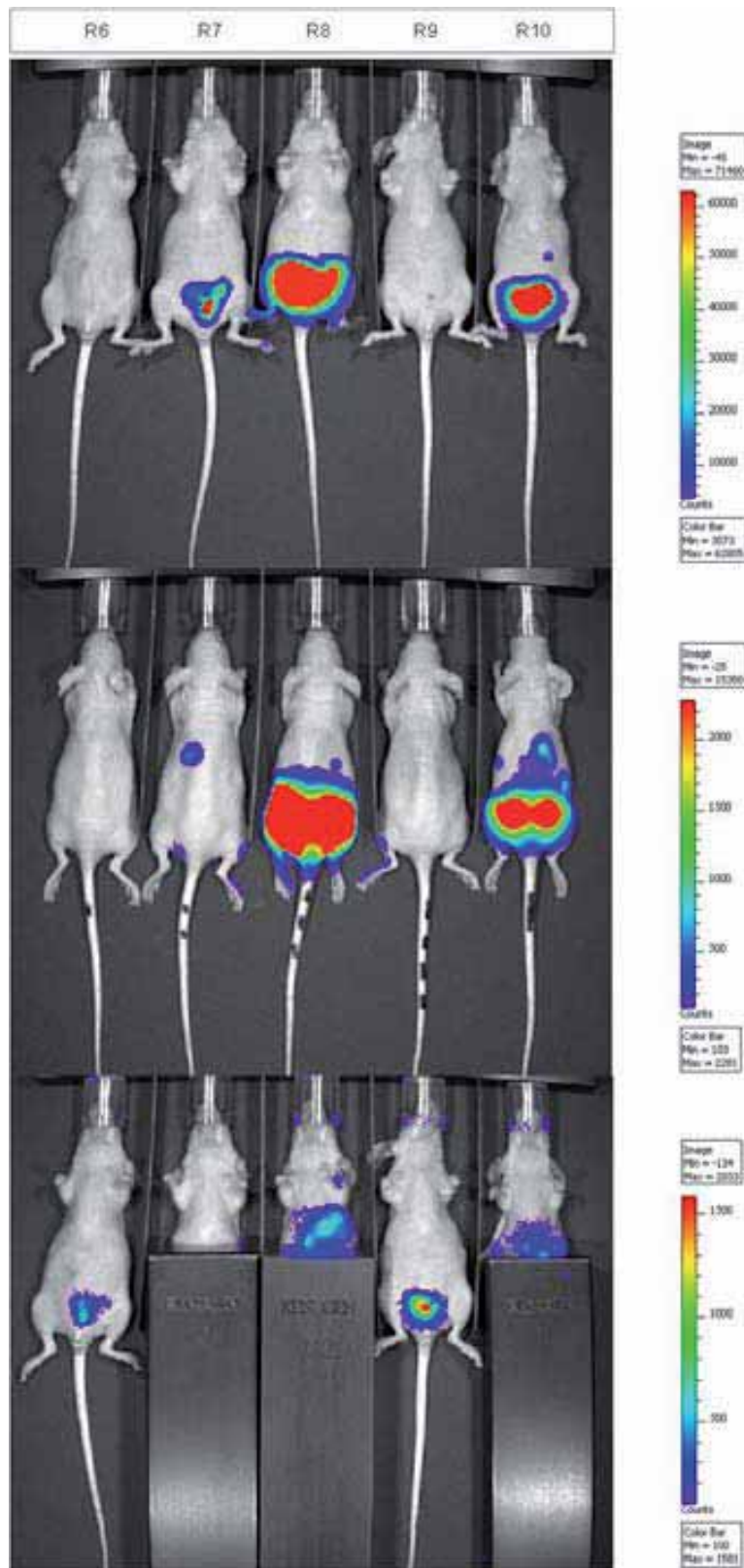


Figura 40 - GRUPO 2. Visión ventral y dorsal de los ratones 6-10. Los ratones 7, 8 y 10 presentan imágenes de metástasis a hemiabdomen superior.

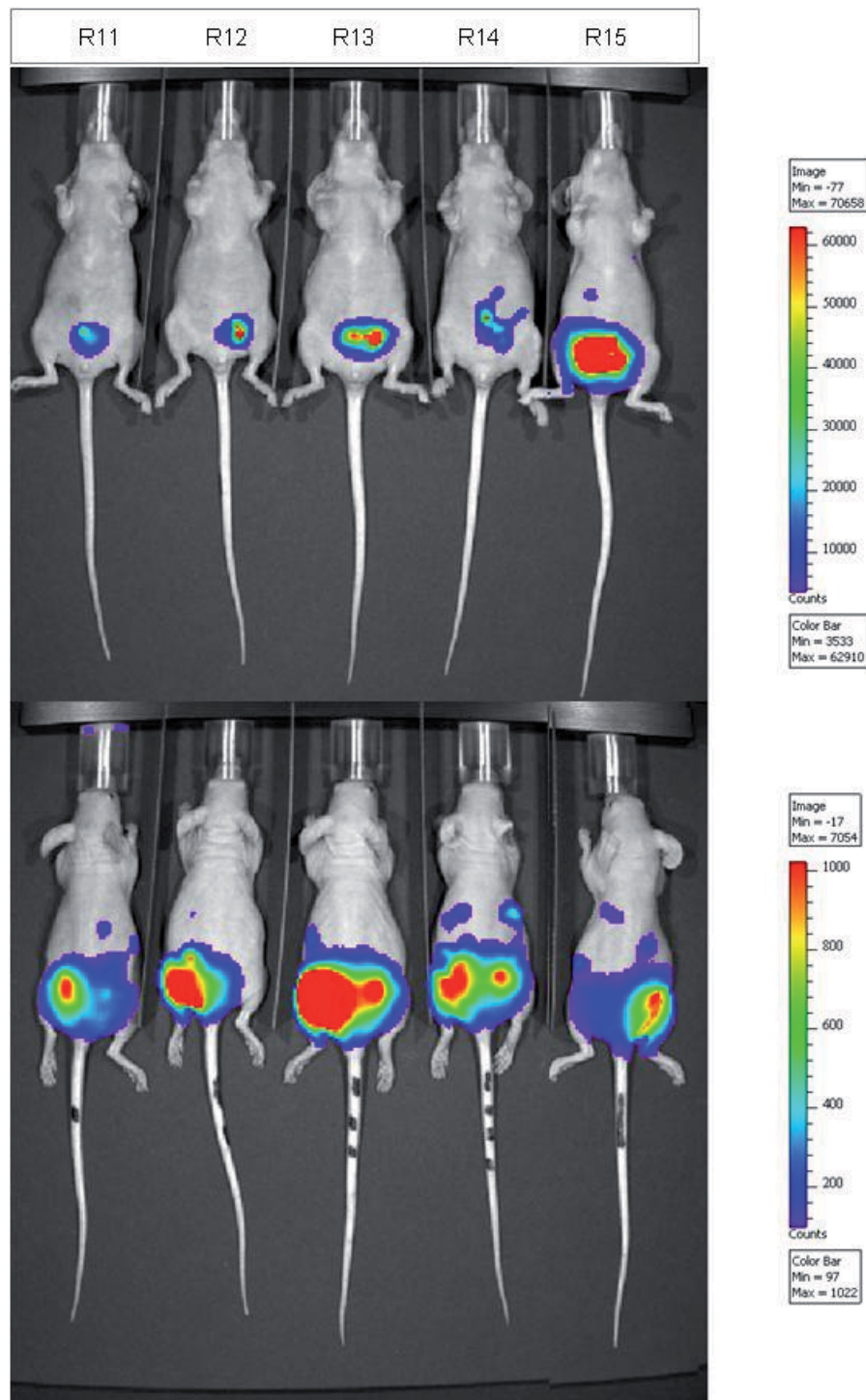


Figura 40 - GRUPO 3. Visión ventral y dorsal de los ratones 11-15. Los ratones 11, 14 y 15 presentan imágenes de metástasis a hemiabdomen superior.

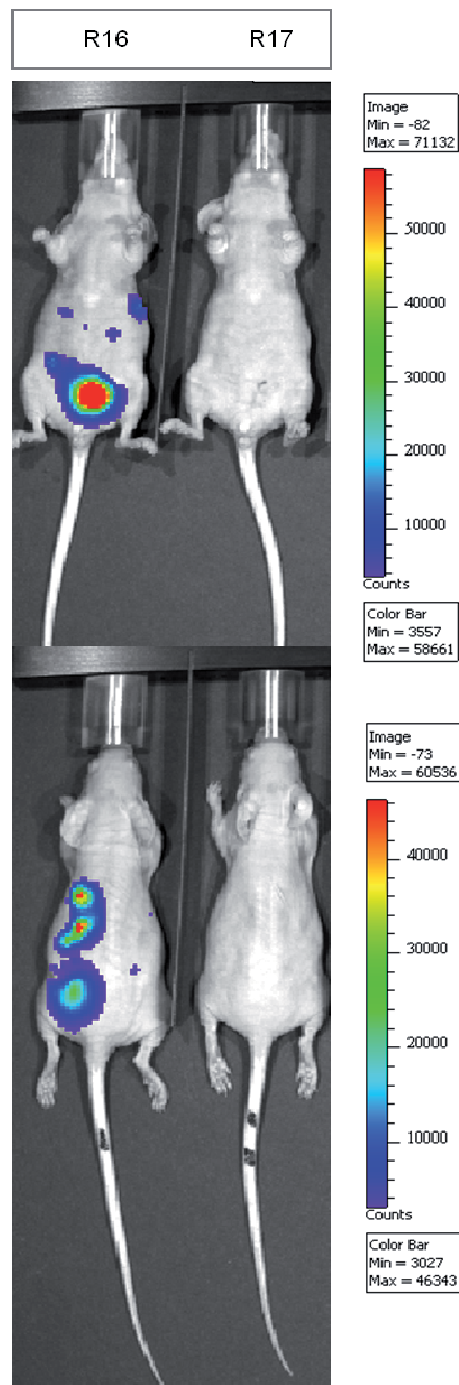


Figura 40 - GRUPO 4. Visión ventral y dorsal de los ratones 16 y 17. El ratón 16 presenta imágenes bioluminiscentes en pelvis y hemiabdomen superior.

Figura 40. Visión ventral y dorsal de los animales del experimento de validación a día 12.

Día 19

Durante el seguimiento, se descartaron dos ratones del experimento: uno de ellos no había desarrollado señal pélvica tras 19 días de seguimiento después de la inoculación, por lo que fue apartado del estudio (ratón 4). El otro ratón inició clínica compatible con fallo renal agudo (anasarca y anuria) el día 18 tras la inoculación (ratón 15). En la necropsia y el estudio histológico de éste último ratón, observamos la presencia de tumor endometrial aunque sin metástasis a distancia. En el estudio de los riñones se observa depósito de proteínas en el glomérulo, pudiendo corresponder a una glomerulonefritis que es una causa de insuficiencia renal aguda en estos animales (Figura 41).

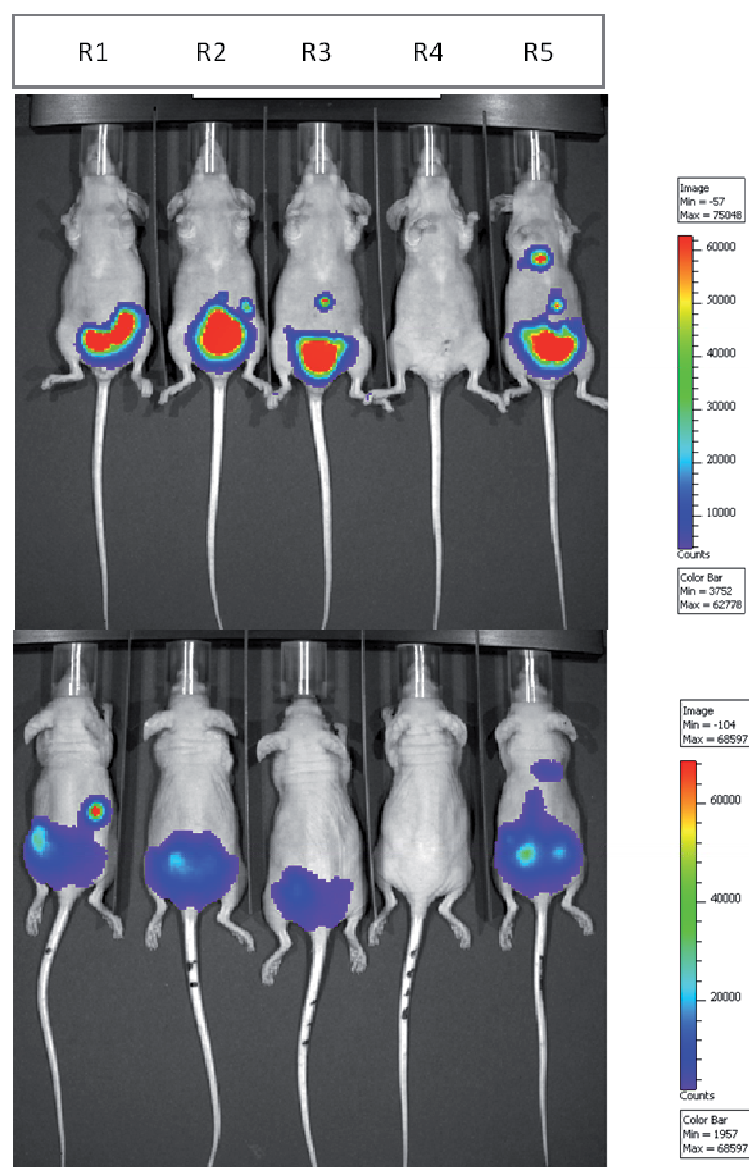


Figura 41 - GRUPO 1. Visión ventral y dorsal de los ratones 1-5 a día 19. El ratón 5 presenta una imagen compatible con metástasis intratorácica, aunque se trata del animal que se excluye del análisis final por sospecha de error en la inoculación.

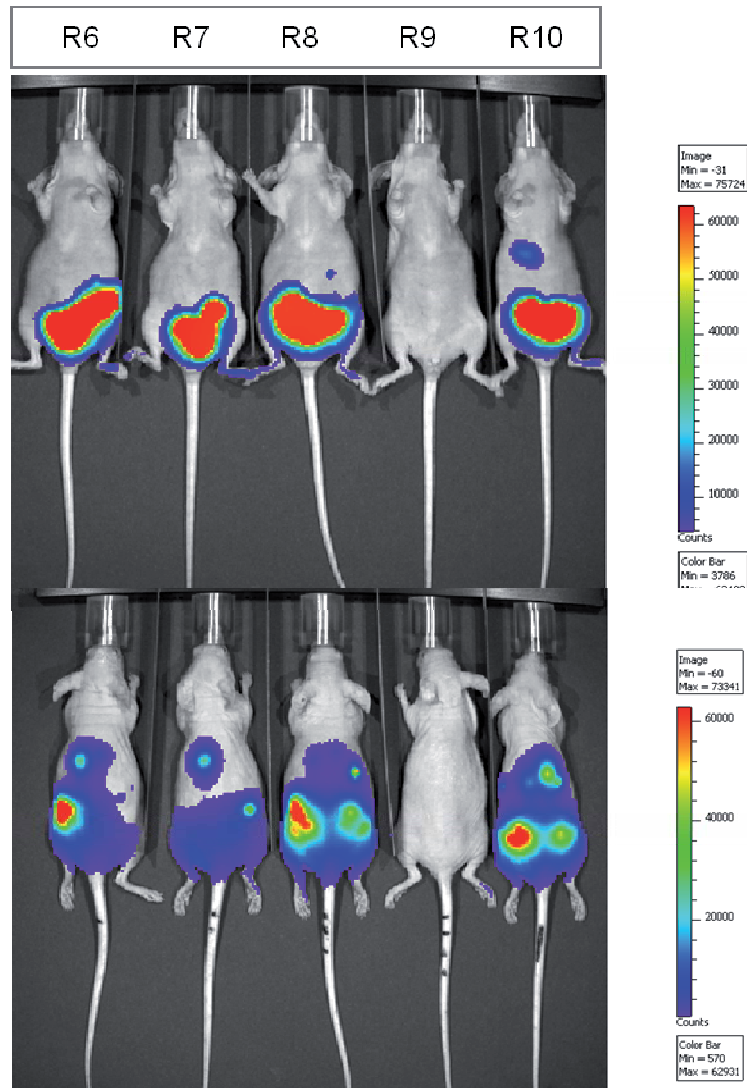


Figura 41 - GRUPO 2. Visión ventral y dorsal de los ratones 6-10 a día 19. Afectación tumoral masiva en los ratones 6, 7, 8 y 10.

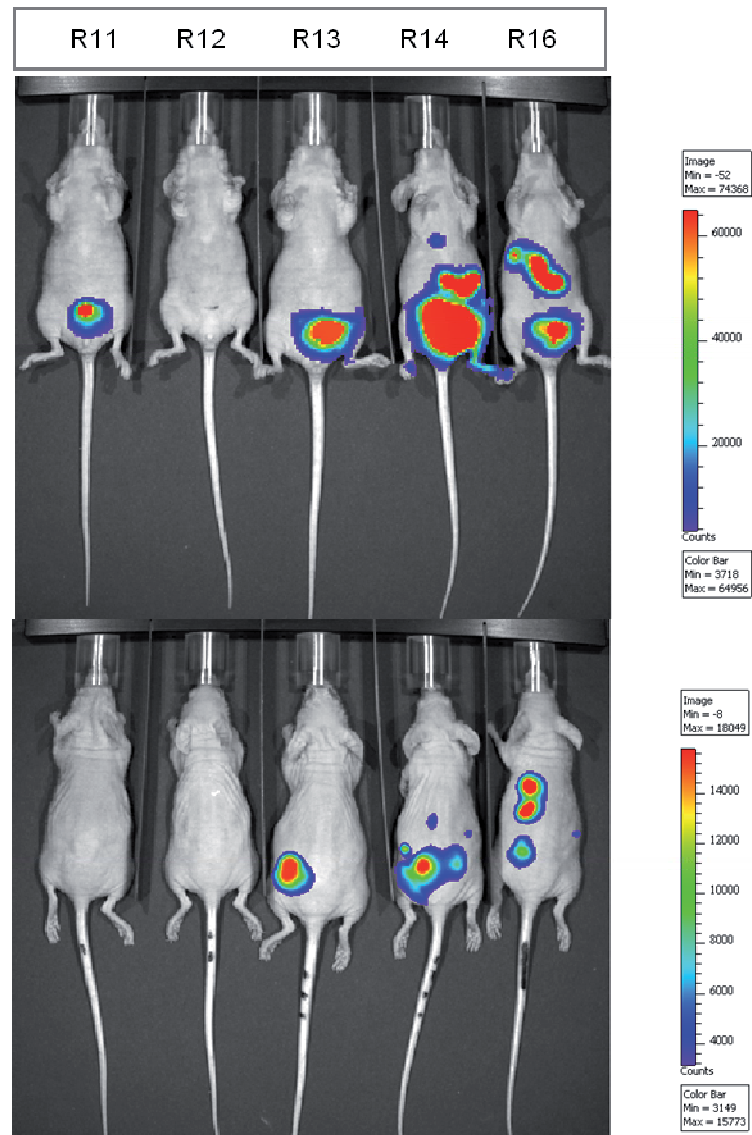


Figura 41 - GRUPO 3. Visión ventral y dorsal de los ratones 11-16 a día 19. Afectación tumoral en hemiabdomen superior en los ratones 14 y 16.

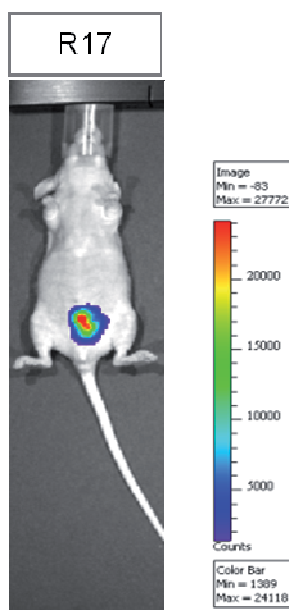


Figura 41 - GRUPO 4. A día 19, el ratón 17 presenta tumor pélvico sin imágenes de diseminación.

Figura 41. Visión ventral y dorsal de los animales del experimento de validación a día 19.

Días 26, 33, 40

Se observa la progresión metastásica en todos los animales inoculados (Figura 42). Durante el estudio IVIS del día 40 se observa que el ratón 16 presenta una gran distensión abdominal y mal estado general, por lo que se decide su sacrificio urgente y necropsia. Por este motivo, de este animal no tenemos estudio mediante bioluminiscencia *ex vivo*.

En la necropsia del animal se observa una afectación de la Vena Cava por un mazacote tumoral de localización subhepática, que infiltra la vena y produce una ascitis hemorrágica severa que justifica el empeoramiento agudo del animal. En la figura 43 se presentan las imágenes obtenidas del estudio mediante 3D realizado en el sistema IVIS, con el objetivo de identificar mejor en el espacio la localización de los implantes tumorales que se detectan en el modelo.

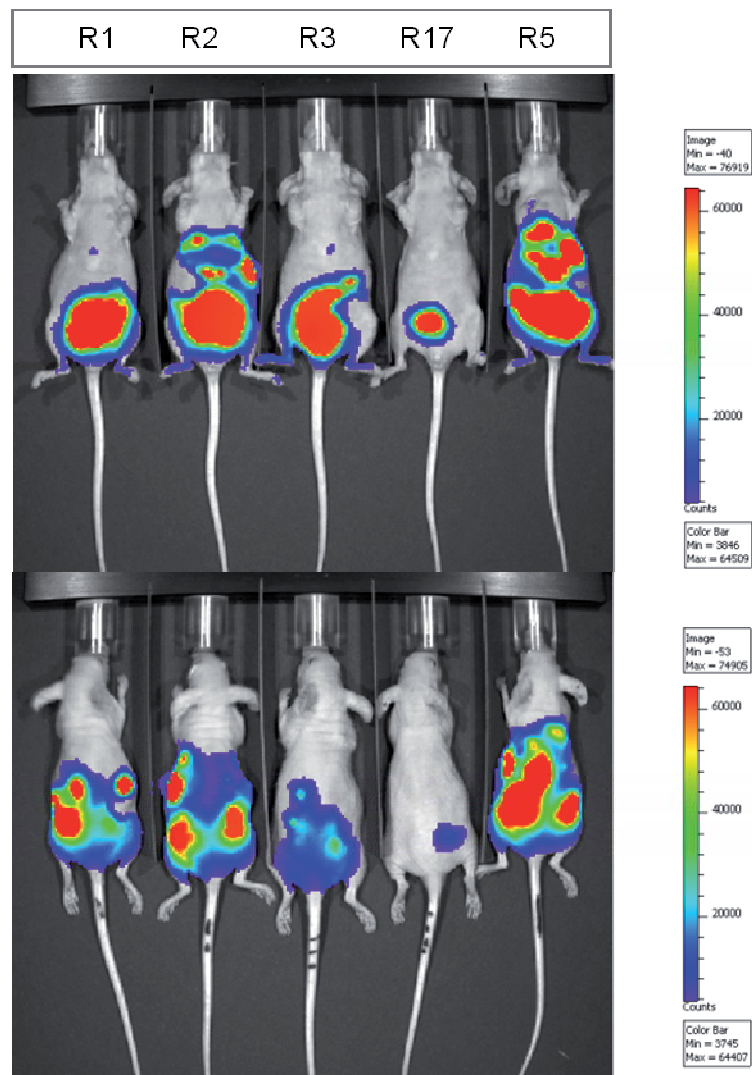


Figura 42 - GRUPO 1. Visión ventral y dorsal de los ratones 1, 2, 3, 17 y 5 a día 40. Afectación tumoral masiva en los ratones en todos los animales excepto en el 17, que parece presentar sólo tumor local.

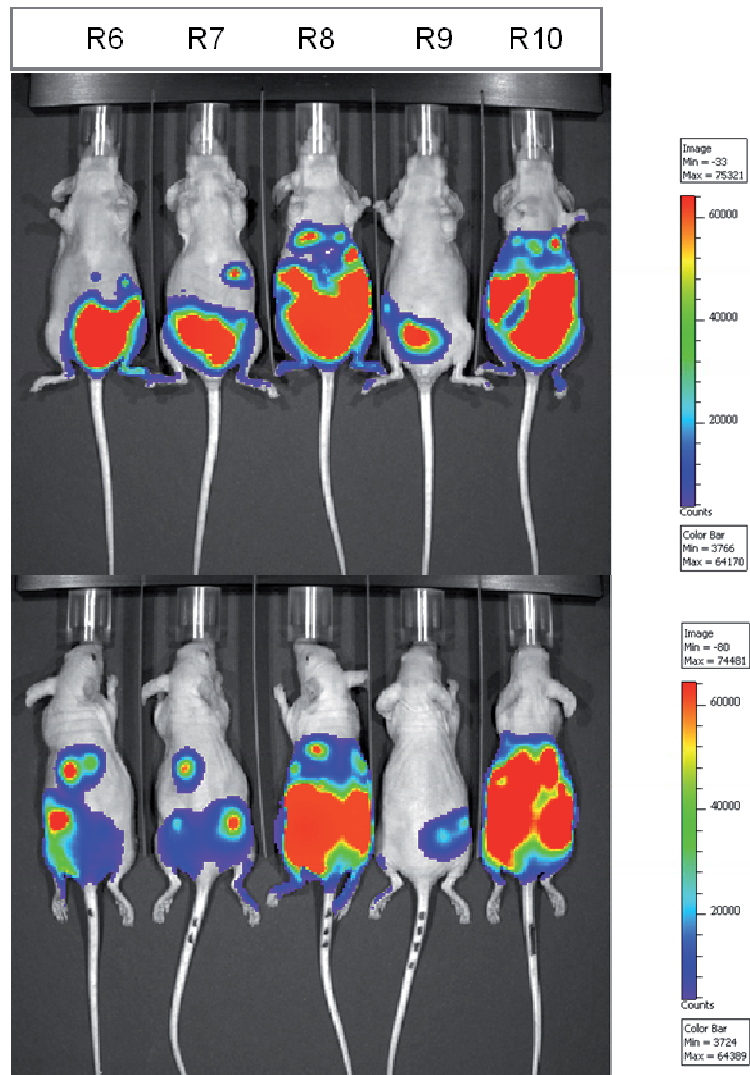


Figura 42 - GRUPO 2. Visión ventral y dorsal de los ratones 6-10 a día 40. Afectación tumoral masiva en los ratones en todos los animales excepto en el 9, que parece presentar sólo tumor local. Se observa tumor intratorácico en los animales 6, 7, 8 y 10.

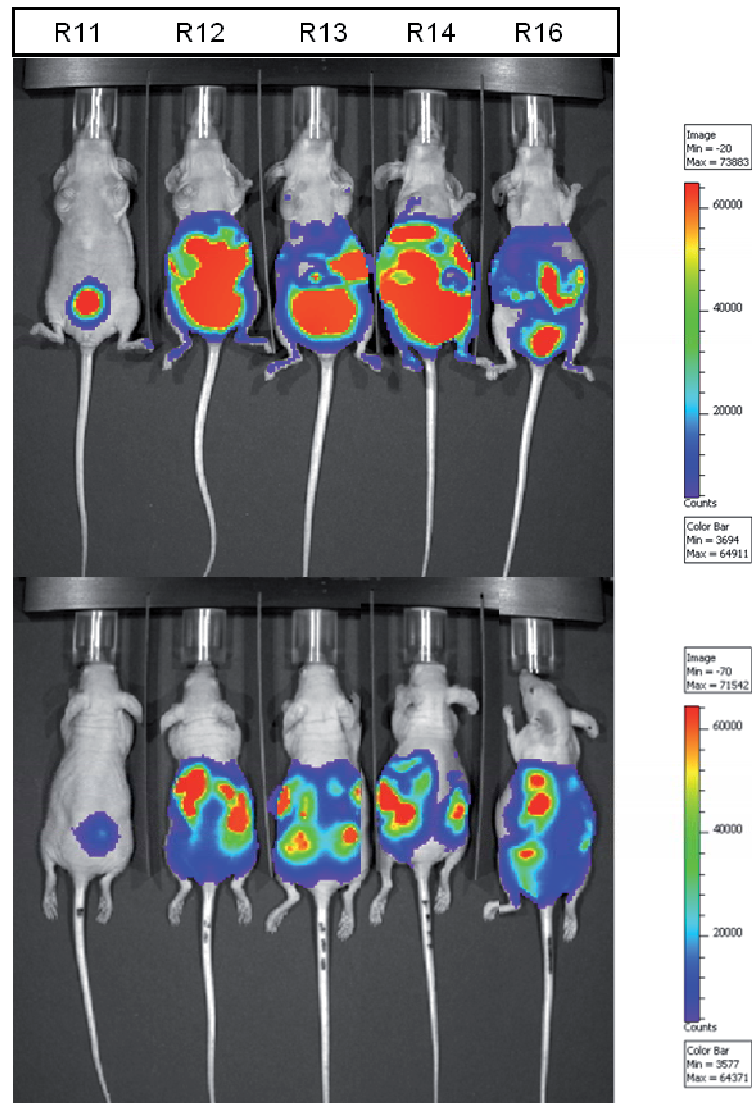


Figura 42 - GRUPO 3. Visión ventral y dorsal de los ratones 11-16 a día 40. Afectación tumoral masiva en los ratones en todos los animales excepto en el 11, que parece presentar sólo tumor local. Se observa tumor intratorácico en todos los demás animales.

Figura 42. Visión ventral y dorsal de los animales del experimento de validación a día 40.

V. RESULTADOS

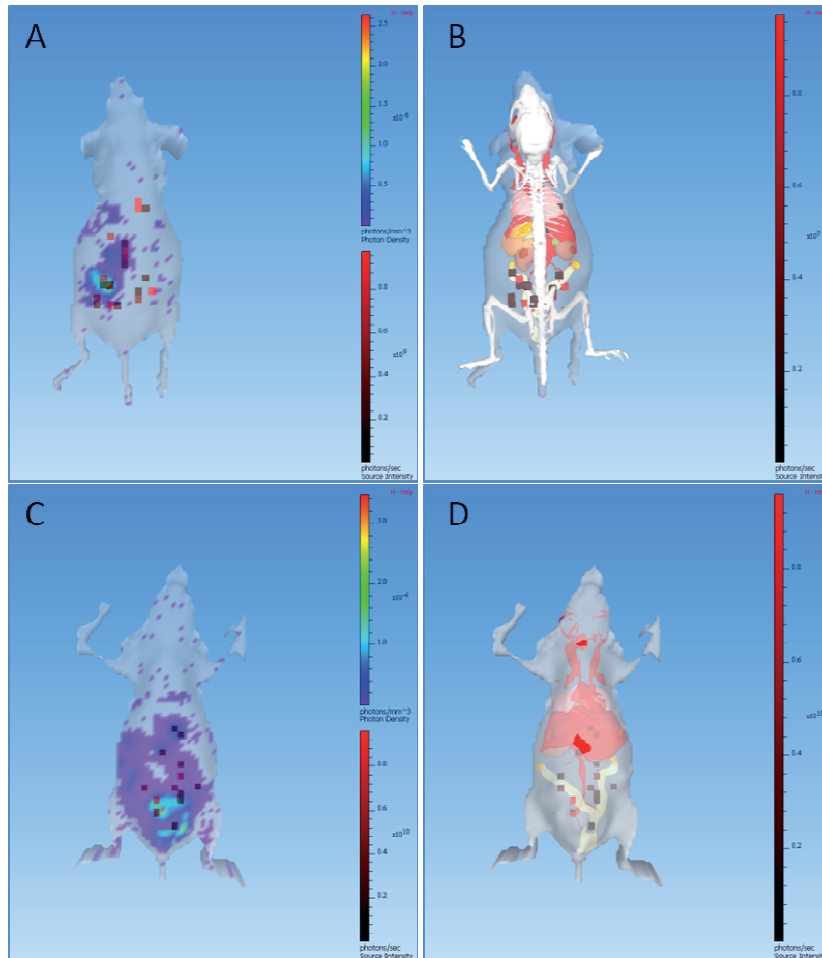


Figura 43. Imagen 3D obtenida mediante el sistema IVIS de un ratón en el día 40, con visión dorsal y ventral. Se observan puntos de máxima emisión de bioluminiscencia (A, C) y su superposición en las diferentes regiones anatómicas del ratón (B, D).

Día 44

En el seguimiento de los ratones realizado a día 44 se observa que el ratón 14 presenta mal estado general, adinamia y distensión abdominal con sospecha clínica de ascitis hemorrágica. Se decide sacrificio por el mal estado del animal.

Durante la necropsia de este ratón se observa una afectación adenopática masiva de la región para-aórtica alta, con infiltración tumoral de la salida de la Vena Renal, lo que había producido una anulación funcional del riñón, que se observa azulado por ectasia sanguínea, y una ascitis hemorrágica muy severa.

Día 47

Dada la afectación masiva de los animales inoculados se decide la finalización del experimento de validación. Se procede a la necropsia de los 13 animales restantes y al estudio *ex vivo* e histológico (Figura 44).

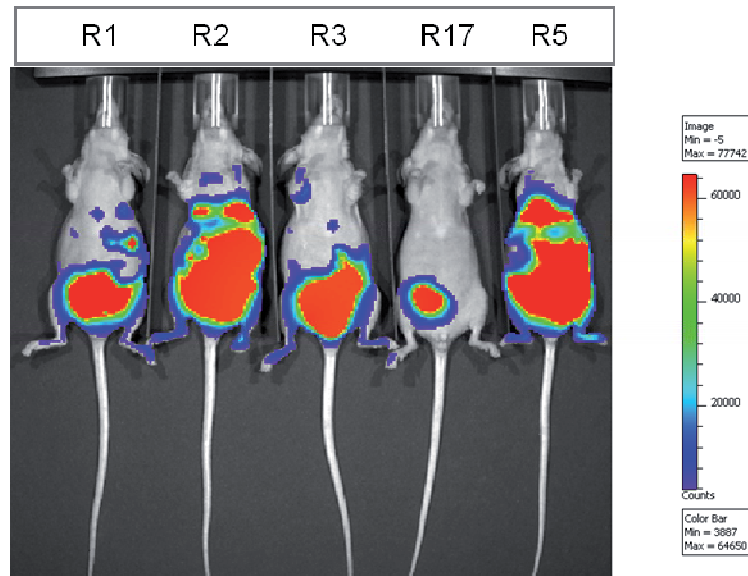


Figura 44 - GRUPO 1

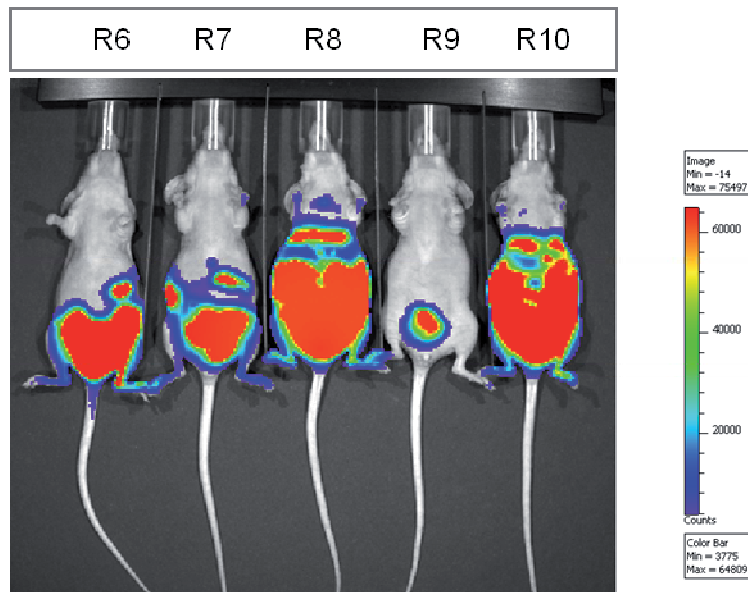


Figura 44 - GRUPO 2

V. RESULTADOS

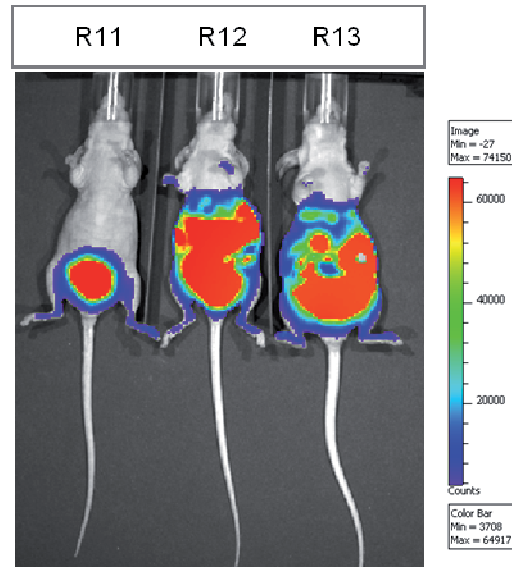


Figura 44 -GRUPO 3

Figura 44. Visión ventral de los animales del experimento de validación a día 44. Se observa la infiltración tumoral masiva de la región abdominal y torácica en la mayoría de los animales.

Análisis de resultados de Bioluminiscencia *in vivo*

En la Figura 45 se observa la evolución de la señal bioluminiscente a lo largo del experimento en el total de ratones inoculados con células Hec1A-Fluc. Se observa el crecimiento exponencial de la señal bioluminiscente generada por el tumor primario, correspondiente al aumento del volumen tumoral del tumor inoculado. En la curva inferior se observa un aumento más moderado de la emisión de luz que generan las metástasis abdominales y torácicas.

Es importante destacar que en la medida de la emisión de luz del tumor primario también incluimos la emisión de las metástasis pélvicas de localización ganglionar inguinal o pélvica y en grasa pélvica, ya que nos es imposible diferenciar estos campos con el sistema de medición por la gran proximidad.

Bioluminiscencia del crecimiento tumoral (11 min tras administración de D-luciferina)

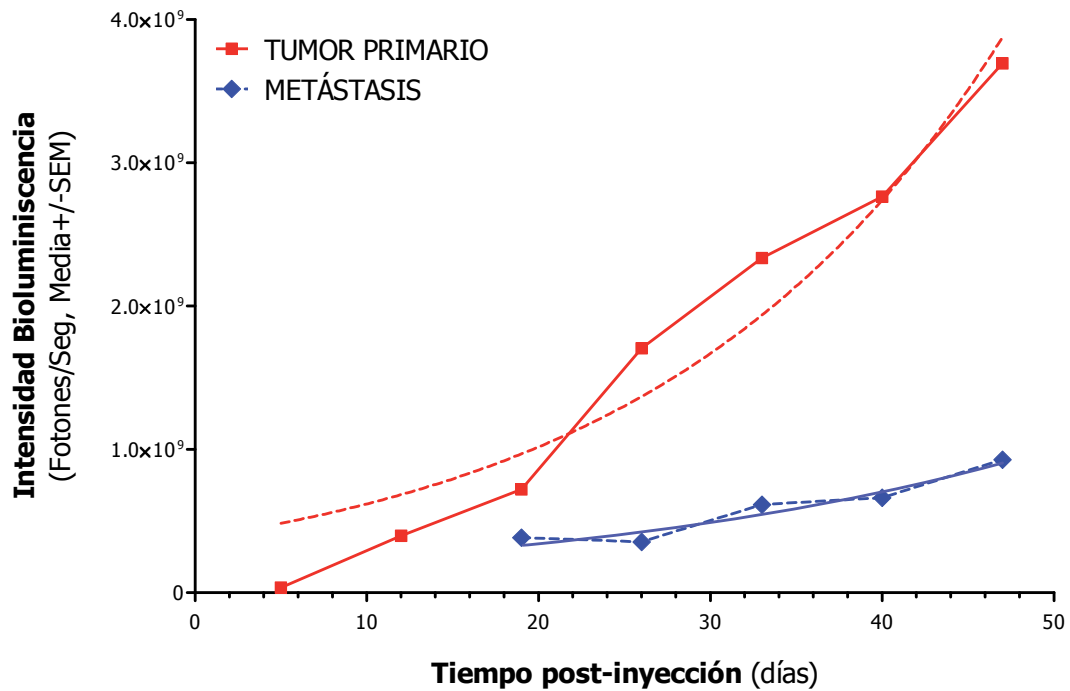


Figura 45. Evolución de la señal bioluminiscente a lo largo del experimento en el total de ratones inoculados con células Hec1A-Fluc.

4.2 BIOLUMINISCENCIA *EX VIVO*

Al final del experimento (día 47) los ratones son sacrificados y se realiza el estudio mediante bioluminiscencia *ex vivo*. En la figura 46 se observan imágenes representativas de este estudio en algunos de los tejidos de este grupo de animales.

V. RESULTADOS

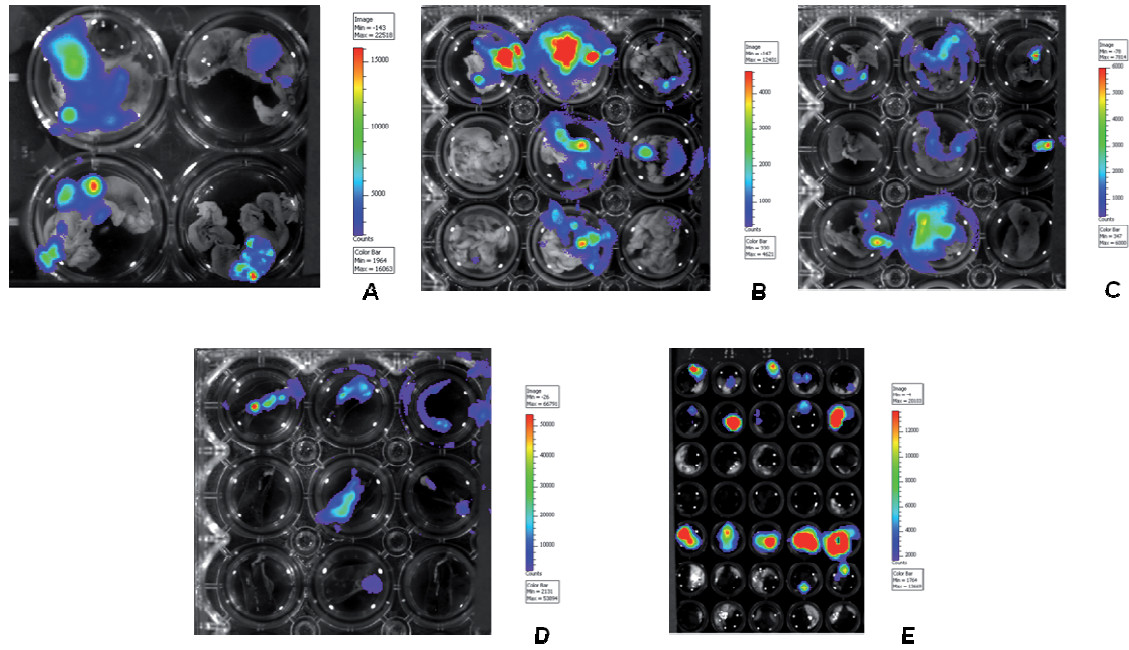


Figura 46. Imágenes representativas del estudio mediante bioluminiscencia *ex vivo* en el grupo de animales del experimento de validación. A: Útero, B: Páncreas, C: Diafragma, D: Bazo, E: Pulmón separado en lóbulos

Los resultados apareados de la bioluminiscencia y el estudio histológico se presentan en la Tabla 21, así como los valores de sensibilidad y especificidad de la técnica de bioluminiscencia en el experimento de validación del modelo animal.

V. RESULTADOS

	RATÓN 1		RATÓN 2		RATÓN 3		RATÓN 4		RATÓN 5		RATÓN 6		RATÓN 7	
	Biolum.	Histología	Biolum.	Histología	Biolum.	Histología	Biolum.	Histología	Biolum.	Histología	Biolum.	Histología	Biolum.	Histología
Útero	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ovarios	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Grasa Pélvica	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
G. Inguinales	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
G. Mediastínicos	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+
G. Para-aórticos	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+
G. Para-aórticos renales	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+
G. Mesentéricos	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
G. Axilares	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
Diafragma	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+
Bazo	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-
Estómago	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+
Hígado	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
Páncreas	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
Pulmón	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+

V. RESULTADOS

	RATÓN 8		RATÓN 9		RATÓN 10		RATÓN 11		RATÓN 12		RATÓN 13	
	Biolum.	Histología	Biolum.	Histología	Biolum.	Histología	Biolum.	Histología	Biolum.	Histología	Biolum.	Histología
Útero	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ovarios	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Grasa Pélvica	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
G. Inguinales	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+
G. Mediastínicos	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+
G. Para-aórticos	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+
G. Para-aórticos renales	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+
G. Mesentéricos	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+
G. Axilares	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+
Diafragma	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+
Bazo	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+
Estómago	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+
Hígado	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+
Páncreas	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
Pulmón	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-

Tabla 21A. Resultados del estudio mediante bioluminiscencia *ex vivo* y estudio histológico de los animales del experimento de validación.

		Resultados Histología		Total
		Negativo	Positivo	
Resultados Bioluminiscencia	Negativo	61	6	67
		75,3%	5,26%	34,35%
	Positivo	20	108	128
		24,7%	94,73%	65,64%
Total		81	114	195
		100,0%	100,0%	100,0%

Tabla 21B. 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 de validación. Se obtiene una sensibilidad de la bioluminiscencia del 94,73% y una especificidad del 75,3%.

En este experimento con mayor número de animales se observa una caída en la especificidad respecto a los experimentos previos, pero mantiene una sensibilidad cercana al 95% para la detección de las metástasis de los tejidos. Se observan discrepancias importantes en los resultados del estudio del riñón entre ambas técnicas, ya que la bioluminiscencia no es capaz de detectar pequeños grupos de células tumorales localizadas en el hilio renal que sí que se identifican con el estudio histológico.

El análisis del ratón 5, que se considera mal inoculado, se mantiene en este estudio comparativo, ya que el objetivo del mismo es conocer la fiabilidad de la bioluminiscencia en la identificación de metástasis. Este animal será excluido en el análisis final.

4. 3 RESULTADOS DE LA NECROPSIA. ESTUDIO HISTOLÓGICO.

Quince de los diecisiete ratones (88%) generaron tumor endometrial. El ratón 5 generó tumor ortotópico pero se excluye para el análisis de resultados a partir de este momento ya que sus metástasis se consideran fruto de una técnica de inoculación inadecuada.

El 85% de los animales que presentaron tumor endometrial generaron además implantes tumorales de localización pélvica (en el peritoneo, vejiga o grasa prevesical). La diseminación linfática se observó en el 92,8% de los animales. Al igual que se observó en los estudios pilotos, los ganglios para-aórticos lumbares se afectaron en todos los ratones que presentaron metástasis ganglionares, lo que se interpreta como que ésta es la primera estación ganglionar de los tumores de origen endometrial en estos animales. Otros ganglios

V. RESULTADOS

afectados fueron: renales para-aórticos (84,6%), mediastínicos (30,7%), mesentéricos (30,7%), inguinales (15,3%) y axilares (7,7%).

Los implantes abdominales se detectaron en el 78,5% de los animales que presentaron tumor ortotópico, afectando principalmente a páncreas, hígado, bazo, riñones, diafragma y peritoneo abdominal.

La metástasis hematógenas a los pulmones se detectaron en el 71,4% de los animales, no se encontró ningún caso de metástasis intra-hepática ni cerebral en nuestra serie (Tabla 22).

N INICIAL	17
TUMOR ENDOMETRIAL *	16
N FINAL **	15
INCIDENCIA DE TUMOR ENDOMETRIAL	88,2%
IMPLANTES PÉLVICOS	12/14 (85,7%)
METÁSTASIS GANGLIONARES	13/14 (92,8%)
Ganglios para-aórticos lumbares	13 (100%)
Ganglios para-aórticos renales	11 (84,6%)
Ganglios mediastínicos	4 (30,7%)
Ganglios mesentéricos	4 (30,7%)
Ganglios inguinales	2 (15,3%)
Ganglios axilares	1 (7,7%)
IMPLANTES ABDOMINALES	11/14 (78,5%)
Páncreas	11 (100%)
Hígado	10 (90,1%)
Bazo	10 (90,1%)
Riñones	10 (90,1%)
Diafragma	10 (90,1%)
Peritoneo	9 (81,8%)
METÁSTASIS PULMONARES	10/14 (71,4%)

*Se excluye el animal que no desarrolló tumor ortotópico

**Se excluye el ratón 5, que se considera resultado de una inoculación inadecuada.

Tabla 22. Resultados de la generación de un modelo ortotópico de cáncer de endometrio a partir de células Hec1A-Fluc por vía transmiometrial.

En la figura 47 se observan imágenes representativas de los hallazgos en la necropsia y en la figura 48 algunas imágenes del estudio con hematoxilina-eosina de los animales de este experimento.

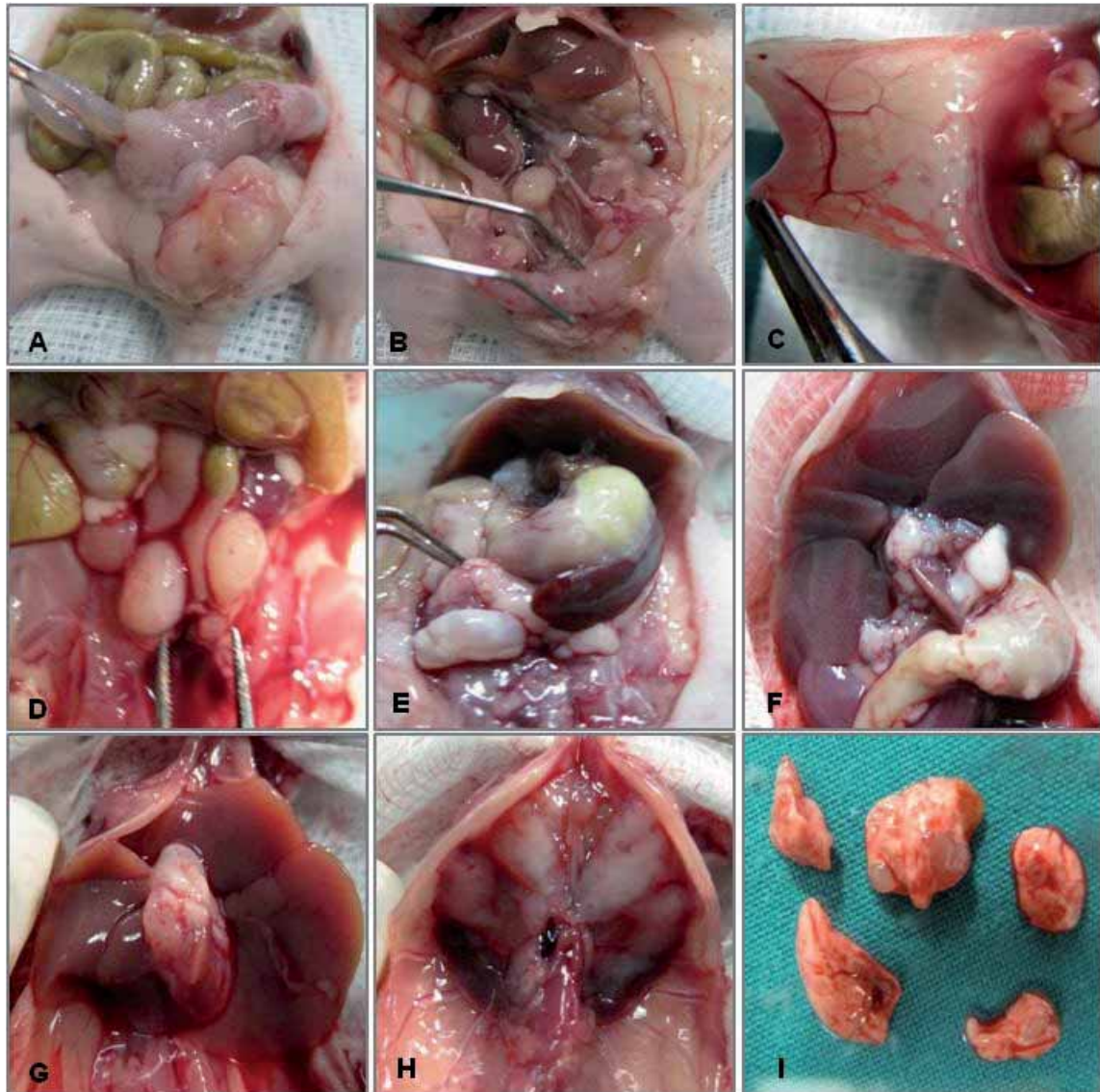


Figura 47. Necropsia y estudio histológico de los animales del experimento de validación del modelo ortotópico transmiometrial. Imágenes representativas del estudio necrópsico de los animales del experimento de validación.

Se observa: A) útero infiltrado por tumor, B) ganglios para-aórticos engrosados al retirar el útero, C) infiltración tumoral del peritoneo parietal, D) ganglios para-aórticos patológicos, E) afectación tumoral del páncreas, F) implantes tumorales sobre el estómago y la base del hígado, G) implantes tumorales sub-hepáticos, H) afectación metástasica del diafragma, I) lóbulos pulmonares que presentan metástasis macroscópicas.

V. RESULTADOS

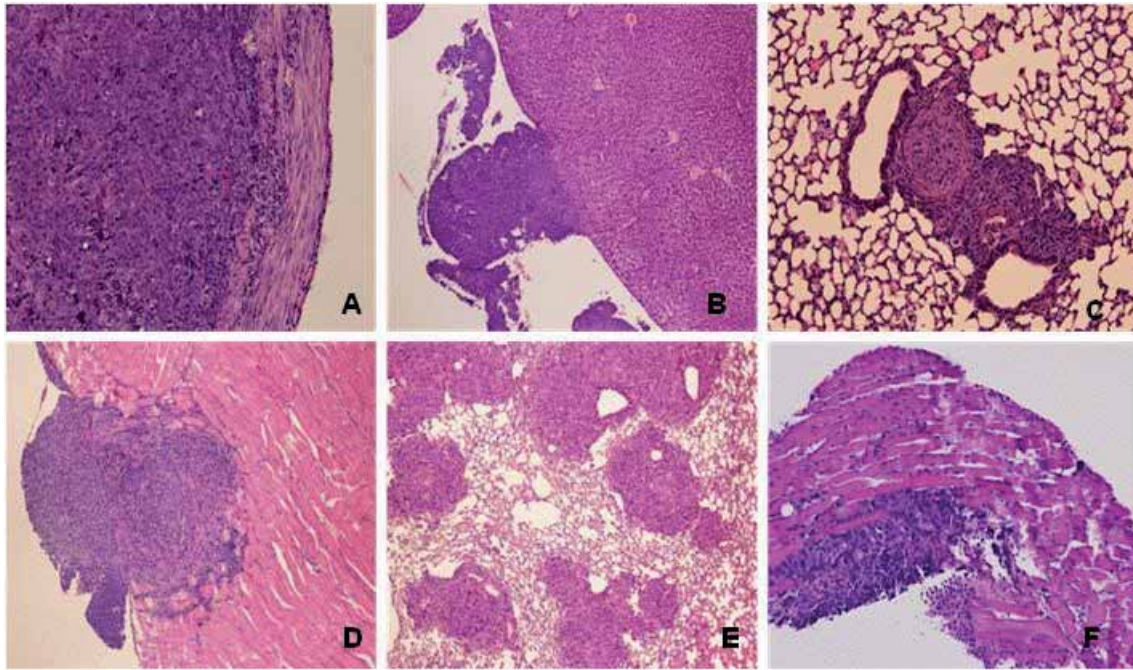


Figura 48. Cortes histológicos teñidos con Hematoxilina-Eosina en que se observa:

A: tumor de endometrio que infiltra el miometrio desde dentro de la cavidad uterina hacia la serosa, siguiendo el proceso infiltrativo propio del cáncer de endometrio en el humano,

B: implante en la cápsula hepática,

C: metástasis hematógica en el pulmón,

D: implante infiltrante de peritoneo abdominal que afecta a la musculatura de la pared abdominal,

E: metástasis pulmonares masivas,

F: implante en el peritoneo parietal