



ARTÍCULO ORIGINAL

Estandarización de un modelo de cáncer de colon en ratones balb/c.

Standardization of a model of colon cancer in *BALB/c mice*

María del Carmen Herrera de la Uz¹, Yunit Hernández Rodríguez², Isvet Rodríguez Peguero³, Mirian Guerra Paredes⁴, Agustín Lemus Sarracino⁵.

¹ Especialista de Primer Grado en Fisiología Normal y Patológica. Instructor. Universidad de Ciencias Médicas de Pinar del Río. Cuba. mary87rmadrid@fcm.pri.sld.cu

² Especialista de Segundo Grado en Fisiología Normal y Patológica. Máster en Longevidad Satisfactoria. Profesora Auxiliar e Investigador Agregado. Universidad de Ciencias Médicas de Pinar del Río. Cuba. yunit.hernandez@princesa.pri.sld.cu

³ Especialista de Primer Grado en Fisiología Normal y Patológica. Instructor. Universidad de Ciencias Médicas de Pinar del Río. Cuba. isvet87@fcm.pri.sld.cu

⁴ Especialista de Segundo Grado en Fisiología Normal y Patológica. Máster en Educación Médica Superior. Profesora Auxiliar. Universidad de Ciencias Médicas de Pinar del Río. Cuba. eisel@princesa.pri.sld.cu

⁵ Especialista Segundo Grado en Anatomía Patológica. Máster en Medios Diagnósticos. Profesor Auxiliar. Departamento de Anatomía Patológica. Hospital General Docente "Abel Santamaría Cuadrado". Pinar del Río. Cuba. lemuss@princesa.pri.sld.cu

Recibido: 9 de septiembre de 2016

Aprobado: 1 de diciembre de 2016

RESUMEN

Introducción: el cáncer de colon ocupa el primer lugar dentro de las neoplasias del sistema digestivo y el segundo entre todos los procesos oncoproliferativos en ambos sexos. Para la evaluación de vacunas y mecanismos moleculares propios de la enfermedad se emplean frecuentemente modelos murinos, no existiendo en este contexto un modelo animal estandarizado con estos fines.

Objetivo: estandarizar un modelo de por células implantadas, estables, reproducibles y susceptibles de emplearse en estudios ulteriores.

Método: fueron utilizados ratones BALB/c hembras jóvenes distribuidos en dos grupos uno control (n=9) y otro de estudio (n=9) a las cuales se les inoculó células de CT 26 por vía subcutánea (ectópico). Transcurridos 35 días se practicó la eutanasia y se estudiaron las características morfológicas y la presencia de metástasis espontáneas en los tumores.

Resultados: en los animales del grupo estudio se encontraron nódulos subcutáneos con las características de un adenocarcinoma de colon poco diferenciado, que fueron responsables del aumento de peso observado en el grupo estudio, lo cual se evidenció al

extraer los tumores de dicho grupo. Los pesos de los órganos estudiados sufrieron un incremento por influencias del tumor, pero solo se encontraron metástasis espontáneas en los pulmones.

Conclusiones: con este estudio fue posible la estandarización de un modelo de cáncer colorrectal por célula implantada, estable, reproducible y susceptible de emplearse en estudios ulteriores.

DeSC: Cáncer de colon / modelos animales/ metástasis

ABSTRACT

Introduction: colon cancer occupies the first place within the neoplasias of the digestive system and the second among all the oncoproliferative processes in both sexes. For the evaluation of vaccines and molecular mechanisms specific to the disease, murine models are frequently used, and there is no animal model standardized for these purposes in this context.

Objective: to standardize a RCC model by implanted cells, stable, reproducible and susceptible to be used in later studies.

Method: young female BALB / c mice were distributed in two control (n = 9) and one (n = 9) groups to which subcutaneous (ectopic) CT 26 cells were inoculated. After 35 days euthanasia was practiced and the morphological characteristics and the presence of spontaneous metastases in tumors were studied.

Results: in the animals of the study group, subcutaneous nodules with the characteristics of a low-grade colon adenocarcinoma were found, which were responsible for the weight gain observed in the study group, which was evidenced when the tumors were removed from the group. The weights of the organs studied were increased by tumor influences, but only spontaneous metastases were found in the lungs.

Conclusions: with this study it was possible to standardize a stable, reproducible and susceptible Colorectal cancer model per implanted cell, which could be used in subsequent studies.

DeSC: Colon cancer / animal models / metastasis

INTRODUCCIÓN

El cáncer colorrectal (CCR) es el que se origina en el colon o el recto. A estos cánceres se les puede llamar por separado cáncer de colon o cáncer de recto (rectal) dependiendo del lugar donde se origina y ocupa el primer lugar dentro de las neoplasias del sistema digestivo y el segundo entre todos los procesos oncoproliferativos en ambos sexos, solo antecedido por el de pulmón en el hombre y mama en las mujeres. Se trata de un cáncer cuya incidencia no descende, como ocurre en otras neoplasias malignas, sino que está experimentando, en algunas regiones, un apreciable incremento.¹

En el momento actual, a nivel mundial, la mortalidad de los individuos diagnosticados de CCR es cercana al 50%.¹

El Anuario Estadístico Cubano 2014 reportó para cáncer intestinal con excepción del recto, 2177 fallecidos con una tasa de 19.5 por 100000 habitantes y para cáncer rectal 331 fallecidos con una tasa de 3.0 por 100 000 habitantes. Este reporte además precisa que el sexo más afectado es el femenino y la edad de 60 años y más para ambos sexos.²

El uso de modelos animales a partir de CCR humano puede permitir una mejor comprensión de los mecanismos de su desarrollo y patogénesis.

Para el estudio del CCR se han empleado modelos in vitro e in vivo, siendo los últimos los más utilizados, ya que permiten analizar las complejas interacciones que se producen en el organismo, tales como respuesta inmune, angiogénesis y otros.³⁻⁵

Estos modelos constituyen una fuente única de material para el análisis biológico de los elementos moleculares y celulares de la transformación neoplásica, tumorigénesis y desarrollo de metástasis.³

Los modelos de trasplante subcutáneo (ectópico) se han usado extensamente en estudios de tumorigénesis; estos modelos presentan la ventaja, sobre los métodos in vitro, de reproducir la arquitectura del tumor original, sin embargo, en ocasiones no reflejan la interacción real con el microentorno tumoral y no reproducen la diseminación metastásica.^{4,5}

La provocación de cáncer mediante inyección/implantación subcutánea es uno de los modelos más usado por ser técnicamente más fácil de realizar. La accesibilidad de los tumores subcutáneos es una gran ventaja para monitorizar la progresión tumoral y para valorar los efectos de la intervención terapéutica.⁵

El modelo animal ideal debe replicar fielmente todos los aspectos del tumor desarrollado en el hombre. Desdichadamente, aunque los modelos aproximan algo de las características del CCR humano, ninguno de los modelos reúne todos los criterios. Por tanto, para cada cuestión experimental específica que deba ser estudiada, se debe elegir el mejor modelo adecuado para resolver esta cuestión particular.⁶

El CT26 WT (ATCC CRL-2638) es una línea celular de carcinoma colorrectal indiferenciado, obtenido a partir de la inducción química del tumor con N-metil-N-nitrosourea (MNU) en una especie experimental.⁷

El CT-26 ha sido propuesto como un modelo adecuado para evaluar compuestos antitumorales con efecto antiinvasivo, antimetastásico y antiangiogénico,^{8,9} del cual se conocen los aspectos referentes a latencia, crecimiento tumoral, metástasis, invasividad local, angiogénesis y resistencia a hormonas. Este modelo ha sido empleado para efectuar estudios preclínicos de agentes antiinvasivos y antiangiogénicos mediante la inoculación de las células tumorales en el tejido celular subcutáneo de ratones BALB/c.⁹

La obtención de un modelo animal de CCR en nuestro contexto, podría ser útil para evaluar nuevas estrategias de quimioterapia e inmunoterapia para el cáncer en esta localización dada la frecuencia de este problema de salud y su elevada mortalidad.

En Cuba, existen antecedentes de la estandarización de modelos animales para el estudio del cáncer en otras localizaciones los que han sido utilizados en la evaluación de vacunas y mecanismos moleculares propios de la enfermedad, sin embargo, no existen reportes de modelos de CCR que permitan su utilización con tales fines.

El estudio se propuso estandarizar un modelo de cáncer colorrectal por célula implantada, estable, reproducible y susceptible de emplearse en estudios ulteriores.

MATERIAL Y MÉTODO

Se trata de una Investigación-desarrollo con un diseño experimental de tipo longitudinal y prospectivo en el que se pretendió obtener un modelo de CCR por célula implantada (CT-26) en la línea de ratones BALB/c. Se realizó este experimento en el área de Experimentación Animal del Centro de Toxicología Experimental del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB) durante el segundo semestre de 2014.

El personal que laboró en el ensayo fue un personal acreditado y con los conocimientos necesarios para la ejecución del mismo.

Para el control de la calidad el ensayo fue conducido y se rigió por lo establecido en la Guía de Buenas Prácticas para el Cuidado, Uso, y Reproducción de los Animales para la Experimentación en el CENPALAB¹⁰ y los Procedimientos Operacionales de Trabajo establecidos para el desarrollo de todas las actividades en el propio centro.

Fundamentación de la especie animal seleccionada

El modelo de CCR se originó de la línea celular CT 26 WT (ATCC CRL-2638), la cual se obtuvo a partir de la inducción química del tumor con N-metil-N-nitrosourea (MNU) en

una especie experimental de BALB/c en el Centro de Inmunología Molecular (CIM).

Teniendo en cuenta este aspecto, en el estudio se emplearon ratones BALB/c, para realizar un trasplante singénico, lo cual evita las reacciones de rechazo que provocan distorsión de los resultados experimentales tales como: disminución del porcentaje de prendimiento, aumento del tiempo de latencia y otros cambios que pueden llegar hasta la remisión espontánea del tumor. Por otra parte, la línea de ratones BALB/c está bien caracterizada desde el punto de vista inmunológico, presenta baja incidencia de tumores espontáneos y enfermedades autoinmunes.¹¹

Sistema de ensayo

Se emplearon ratones de la línea BALB/c/Cenp hembras, nulíparas, jóvenes (4 a 8 semanas), con un peso promedio de 20 gramos, clínicamente sanos y de categoría higiénico sanitaria Libres de Gérmenes Patógenos Específicos (SPF), fueron certificados por la División de Roedores Gnotobióticos del CENPALAB.

Recepción, readaptación y distribución por grupos

Los animales, clínicamente sanos y de categoría higiénico sanitaria Libres de Gérmenes Patógenos Específicos (SPF), fueron certificados por la División de Roedores Gnotobióticos del CENPALAB y recibidos con un peso que osciló de 16 a 18 gramos y se mantuvieron en el local de experimentación hasta que alcanzaron un peso promedio de 20 gramos, a la vez que se logró la homeostasis de todos los parámetros fisiológicos y la adaptación al nuevo ambiente (POT 05.02.01.014).

En el momento de la recepción (POT 05.02.01.015), todos los animales fueron inspeccionados clínicamente (POT 05.02.01.003) por el Médico Veterinario, verificando la información del certificado de calidad. El ensayo se realizó con la aprobación del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL) del CENPALAB.

Condiciones de mantenimiento

Los animales se alojaron en grupos, en cajas plásticas de policarbonato tipo T3, con tapas de rejillas de metal inoxidable cambiables, identificadas mediante tarjetas (POT 05.02.01.020), las cuales se ubicaron en el área de Experimentación Animal del CETEX, de CENPALAB.

El agua se suministró en biberones de policarbonato de 500 ml, con pipeta de acero inoxidable, mientras que el alimento pelletizado, fórmula EAO 1004 (CENPALAB, La Habana, Cuba) se colocó en la tolva de la caja a razón de 35 gramos semanales. Todos estos materiales fueron esterilizados mediante autoclave a 121°C durante 20 minutos (POT 05.01.06.021) y suministrados *ad libitum* (a voluntad).

Condiciones ambientales

Los parámetros ambientales fueron monitoreados diariamente mediante un medidor de temperatura y humedad relativa (POT05.01.06.067). La temperatura de la sala estuvo entre los $21 \pm 3^\circ\text{C}$, con una humedad relativa de 65-80% y se mantuvo un fotoperíodo de 12 horas luz, 12 horas oscuridad.¹⁰

Limpieza y desinfección

Antes de comenzar el ensayo se realizó la limpieza y desinfección del local de experimentación utilizando solución de asepsia 150 al 0.5 % (POT05.01.07.371). Diariamente se realizó la limpieza de rutina, una vez concluidas todas las actividades experimentales. El cambio de los utensilios relacionados con el mantenimiento de los animales (bandejas, tapas, biberones y pipetas) se realizó semanalmente (POT05.01.03.001). La entrada del personal se realizó aplicando las normas de higiene y el uso del vestuario protector (POT 05.01.02.002 y POT 05.01.02.003).

Línea celular empleada para la inoculación

La línea celular utilizada fue CT 26 WT (ATCC CRL-2638). Fueron descongeladas y mantenidas en medio D-MEM (Life Technologies, Gaithersburg, MD)

suplementado con suero fetal bovino al 10% y mantenidas a 37 °C en una atmósfera aérea con CO₂ al 5%.

Las células para inyección fueron cosechadas de cultivos de monocapa, mediante un tratamiento con tripsina al 0.25% (Life Technologies. Gaithersburg, MD), lavadas una vez y resuspendidas en 200 µL de solución PBS para su inoculación en los animales el día 0 del experimento, con previa verificación, mediante la técnica de Tripán azul, que la viabilidad celular fuera mayor del 90%. Se utilizó una concentración celular de 2×10^5 para la administración por vía subcutánea en el flanco derecho.

Identificación de los animales

La identificación individual de los animales se realizó mediante tinción con ácido pícrico (POT 05.02.01.020).

Diseño experimental

El modelo se estandarizó con dos grupos de animales experimentales que estuvieron formados por nueve animales cada uno, para lo cual se distribuyeron los animales al azar, mediante el programa de números aleatorios LABTOOLS v2.0 [9] (POT 05.01.03.002).

El **grupo con tumor (estudio)** recibió la inoculación de células de carcinoma de colon CT26 por vía subcutánea en el flanco derecho y el **grupo control** fue el control negativo (no se le inyectaron células) para comparar los hallazgos del **grupo estudio**, con lo que sucedió en un ratón normal. Todos los ratones fueron del mismo lote, sexo y edad.

Los ratones recibieron el siguiente tratamiento:

Grupo	Día 0	Día 35	Observaciones
Estudio	2×10^5 células	Eutanasia	Administración vía subcutánea
Control	-	Eutanasia	Sin administrar células tumorales

Técnicas de recolección de información

Se evaluó el peso corporal en función del tiempo (día 0, 6, 13, 20) de iniciado el experimento en ambos grupos de animales, determinándose desde el día de inicio del experimento y semanalmente hasta el día 20, utilizando una balanza digital Sartorius.

Mediciones del tumor primario

A partir de los seis días y tres veces por semana después de inoculado el tumor se efectuó la palpación de la zona donde se inocularon las células para detectar la presencia de masas atribuibles al tumor inyectado y de esta forma se pudo establecer el tiempo de latencia de aparición del tumor en cada animal.

Cuando los tumores superaron los tres milímetros de diámetro, se midió la longitud mayor y menor del tumor (mm) de cada animal dos veces a la semana, utilizando un pie de rey. Para determinar el volumen tumoral se aplicó la fórmula: $n/6 \times \text{diámetro mayor} \times (\text{diámetro menor})^2$. Se expresó en mm³ pudiendo además calcularse el índice de crecimiento (IC= Volumen tumoral/ semanas de implantación). Se expresó en mm/semanas.

Examen anatomopatológico

Transcurridos 35 días de la inoculación de las células tumorales o cuando los tumores alcanzaron un volumen de 3 000 mm³ se practicó la eutanasia (POT 05.01.03.017) de todos los animales para lo cual fueron narcotizados con éter dietílico, posteriormente desangrados por incisión de la vena femoral y finalmente se aplicó la dislocación cervical.

Se realizó la necropsia completa a todos los animales (POT 05.03.03.011), para la evaluación anatomopatológica de los ratones, examinando cuidadosamente el aspecto externo, así como todas las cavidades y órganos para detectar la presencia de alteraciones anatomopatológicas de interés.

Se determinó el peso corporal *post mortem*, así como el peso del hígado, bazo, riñones, corazón, pulmones, timo y tumor, los cuales fueron disecados y pesados lo antes posible.

para evitar su desecación (POT 05.03.03.012).

Se consideraron las variables: peso corporal, latencia del tumor, diámetro mayor y menor del tumor, volumen tumoral = $\pi/6 \times \text{diámetro mayor} \times (\text{diámetro menor})^2$, parámetros morfométricos del tumor por intervalos de tiempo, Índice de crecimiento IC = volumen tumoral / semanas de implantación, peso corporal postmortem, peso del tumor, peso corporal sin tumor, características anatomopatológicas del tumor y de órganos, y el peso del órgano.

Análisis estadístico de los resultados

Fueron utilizados para variables cuantitativas el cálculo de la media y desviación estándar. Para la comparación de medias se aplicó la prueba estadística t-student para variables independientes con un 95 % de confianza. Se consideró que existieron diferencias estadísticamente significativas cuando ($p < 0,05$). Para variables cualitativas se utilizó el cálculo de la frecuencia absoluta y relativa porcentual.

Aspectos éticos

El ensayo fue conducido y se rigió por lo establecido en la Guía de Buenas Prácticas para el Cuidado, Uso, y Reproducción de los Animales para la Experimentación en el CENPALAB¹⁰ y los Procedimientos Operacionales de Trabajo establecidos para el desarrollo de todas las actividades en el propio centro.

RESULTADOS

Observaciones clínicas

Durante la investigación, no se encontraron alteraciones clínicas en los animales, sin embargo, el día 24 del estudio se encontró muerto el animal siete del grupo estudio (Balb/c/Cenp/hembra), al que se le administraron células tumorales por vía subcutánea.

Peso corporal

Se observó que el promedio del peso corporal en diferentes días del experimento del grupo control y el grupo estudio, así como la comparación de medias mediante la prueba estadística T para variables independientes con un 95 % de confianza. No existieron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los pesos de los diferentes grupos (control y estudio) en ninguno de los días. Tabla 1.

Tabla 1. Peso corporal en función del tiempo en grupo control y grupo estudio de la línea de ratones BALB/c. Área de Experimentación Animal del Centro de Toxicología Experimental. CENPALAB, La Habana 2014.

Días	Control		Estudio		t-student	p	Intervalo de confianza 95%	
	Media	DS	Media	DS			Inferior	Superior
0	21,8	1,4	22,7	2,4	1,0	0,3	-1,0	2,8
6	22,0	1,1	22,1	1,6	0,3	0,8	-1,2	1,6
13	22,2	1,1	23,3	2,0	1,5	0,2	-0,5	2,7
20	23,1	1,2	22,9	1,6	-0,4	0,7	-1,7	1,1

Tabla 2. Comparación del peso corporal postmortem entre el grupo control y el grupo estudio.

Peso corporal	Media(C)	DS(C)	Media(E)	DS(E)	t-student	p
Postmortem	24,4	1,2	23,8	1,7	0,87	$p > 0,05$
Peso sin tumor	24,4	1,2	20,0	1,8	5,93	$p < 0,05$
Peso del tumor	-	-	4,0	1,2	-	-

Se pudo apreciar en el comportamiento del peso corporal postmortem entre el grupo control y el grupo estudio (tabla 2) que al realizar el cálculo de la prueba de comparación de medias para grupos independientes (t-student), no se encontraron diferencias significativas entre los pesos de ambos grupos.

Posteriormente, al researse el tumor, fue posible determinar el peso del tumor y del animal sin tumor en el grupo estudio. En este caso, la prueba t-student mostró diferencias significativas entre el peso del grupo control y del grupo estudio, apreciándose en este

último un marcado descenso. En la tabla se incluye además el peso del tumor.

Mediciones del tumor primario

A partir de los seis días y tres veces por semana después de inoculado el tumor, se efectuó la palpación de la zona donde se inocularon las células para detectar la presencia de masas atribuibles al tumor inyectado y de esta forma se pudo establecer el tiempo de latencia de aparición del tumor en cada animal.

El número de animales positivos al tumor y el porcentaje que representan en correspondencia con los diferentes días en los que ha sido posible detectar la presencia del mismo se comportó de la siguiente manera.

El porcentaje mayor de animales positivos al tumor aparece alrededor del día 8 (44,4%), sin aparecer masas tumorales palpables hasta ese día en ninguno de los animales del grupo estudio. Dos animales (22.2%) fueron positivos al tumor el día 10 y 3 de ellos (33.3%) el día 13, estableciéndose entonces un tiempo promedio de latencia del tumor alrededor del día 9 posterior a la inoculación de las células tumorales de la línea CT 26 WT (ATCC CRL-2638).

Cuando los tumores superaron los 3 mm de diámetro, en el grupo estudio, se midió la longitud mayor y menor del tumor (mm) de cada animal dos veces a la semana, utilizando un pie de rey. Para determinar el volumen tumoral se aplicó la fórmula: $\pi/6 \times \text{diámetro mayor} \times (\text{diámetro menor})^2$.

Se pudo observar el incremento en el valor promedio de las variables morfométricas en el tiempo, lo que fue común tanto al diámetro mayor, como al menor y al volumen tumoral. Esto refleja el crecimiento tumoral apreciado en el grupo estudio, posterior a la implantación de las células tumorales por vía subcutánea. Tabla 3.

Tabla 3. Parámetros morfométricos del tumor según tiempo en el grupo estudio.

Variables morfométricas	Día 17		Día 21		Día 24		Día 28	
	media	DS	media	DS	media	DS	media	DS
Diámetro menor	3,6	1,3	5,9	1,7	7,9	2,5	11,0	3,0
Diámetro mayor	4,3	2,1	8,3	2,3	14,1	3,4	18,0	1,8
Volumen tumoral	41,0	37,0	199,0	117,0	515,0	326,0	1242,0	678,0

En las variaciones de los parámetros morfométricos del tumor en el grupo estudio por intervalos de tiempo, aplicando la prueba estadística t-student para muestras independientes se precisó que existieron diferencias significativas entre las medias para un 95% de confianza, lo que habla a favor del crecimiento del tumor. Tabla 4.

Tabla 4. Variaciones de parámetros morfométricos del tumor por intervalos de tiempo.

Días	Diámetro mayor		Diámetro menor		Volumen	
	Dif. media	DS	Dif. media	DS	Dif. media	DS
Día 17-día 20	5,2	2,4	2,3	1,2	157,9	93,2
Día 21-día 23	4,8	2,9	2,3	1,3	337,0	234,3
Día 24-día 28	4,1	3	3,1	1,2	727,4	454,2

Al apreciar el índice de crecimiento del tumor, que se calculó determinando el cociente entre volumen tumoral y semanas de implantación, se pudo observar que el tumor mantuvo un crecimiento ascendente, que fue marcado durante la última semana de experimentación.

El promedio de los diferentes pesos de órganos en el grupo control y el grupo estudio, así como otros datos relacionados con la prueba estadística aplicada (prueba de T para variables independientes). La prueba estadística mostró que existieron diferencias estadísticamente significativas entre el peso de los órganos del grupo control y el grupo estudio ($p < 0,05$), con excepción del corazón ($p = 0,066$).

Tabla 5. Peso de órganos postmortem en grupo control y estudio.

Órganos	Grupo control		Grupo estudio		t	p	95% Intervalo de confianza	
	Media	DS	Media	DS			Inferior	Superior
Hígado	0,943	0,097	1,253	0,108	6,228	0,000	0,204	0,416
Bazo	0,099	0,009	0,231	0,048	7,664	0,000	0,092	0,172
Riñones	0,265	0,030	0,298	0,031	2,213	0,043	0,001	0,645
Corazón	0,097	0,006	0,108	0,015	1,984	0,066	-0,001	0,022
Pulmones	0,135	0,006	0,148	0,015	2,349	0,043	0,000	0,026
Timo	0,027	0,003	0,018	0,005	4,318	0,001	-0,013	-0,005

Fuente. Examen anatomopatológico

Examen macroscópico

Después de transcurridos 35 días desde la inoculación de las células de CT26, se concluyó el estudio y se practicó la eutanasia de todos los ratones, sometiéndolos a una necropsia completa donde se examinó cuidadosamente el aspecto externo, así como todas las cavidades y órganos.

En el momento de la necropsia se comprobó en el flanco derecho de todos los animales inoculados el día 0 del estudio con células de adenocarcinoma CT26, la presencia de un aumento de volumen localizado, de consistencia aumentada, lo que corroboró el adecuado desarrollo del tumor primario en esos animales.

En todos los ratones se encontró un aumento del tamaño del bazo, el hígado, pulmones y riñones.

Examen microscópico

Características anatomopatológicas del tumor

Nódulo tumoral subcutáneo afecto de adenocarcinoma de colon poco diferenciado con zona central de extensa necrosis y hemorragia, células viables de localización perivascular, presencias de numerosos cuerpos apoptóticos, más de 20 mitosis atípicas por 10 C G A, invasión epidérmica con extensa ulceración, invasión vascular linfática extensa, trombos tumorales en linfáticos, infiltrado inflamatorio linfoplasmocitario moderado peritumoral. El

tumor infiltra hasta el músculo estriado en la mayoría de los animales. Desmoplasia del nódulo tumoral mínima.

Características anatomopatológicas de los órganos analizados del grupo estudio.

Hígado. Congestión hepática aguda sin infiltración tumoral, con cambio hidrópico, no metástasis.

Riñón. Congestión renal moderada. Necrosis tubular incipiente

Bazo. Congestión esplénica aguda, hiperplasia de la pulpa blanca, no metástasis.

Corazón. Congestión miocárdica.

Pulmones. presencia de metástasis tumorales, las cuales se caracterizaron por mantener un patrón celular semejante al carcinoma que les dio origen. Estas masas tumorales se observaron perivascular y peribronquialmente, en la pared alveolar o subpleurales. Las mismas estuvieron presentes en siete de los ocho animales analizados.

La invasión vascular linfática tumoral y la presencia de trombos tumorales en linfáticos, fueron indicio de que la vía linfática fue la utilizada por el tumor para su diseminación.

DISCUSIÓN

La evaluación de las variaciones del peso corporal en función del tiempo mediante la prueba estadística T para variables independientes, indicó que no existieron diferencias significativas entre los pesos corporales de los dos grupos durante el desarrollo del experimento ($p > 0,05$). Resultados similares se describieron en el estudio de Jeong Ji-Kang et al.¹², donde reproducen un modelo de cáncer de colon por vía ortotópica y ambos grupos, el control y el estudio, aumentaron de peso.

El aumento de peso observado en el grupo que desarrolla el tumor de CT26, está en

correspondencia con el peso del tumor, que le aporta un peso extra a los animales de dicho grupo (3,97g es el peso promedio del tumor), tabla 2, en la cual se puede apreciar que postmortem, en los animales del grupo estudio, una vez extraído el tumor, el peso corporal adquiere un valor promedio de 20,04 g, el cual está disminuido significativamente ($p < 0,05$) en relación con el peso postmortem del grupo control.

Esto demuestra que los animales del grupo estudio no tuvieron una ganancia de peso adecuada con respecto al grupo control y se debe a la pérdida de peso que sufren los mismos como consecuencia de la presencia del tumor, resultado de diversos cambios caracterizados por hipermetabolismo relativo, depleción proteica y falla anabólica.

Según Sosa R. et al.¹³ en su artículo de revisión sobre pérdida de peso asociada al cáncer, los mecanismos patogénicos implicados en esta pérdida de peso, tienen un complejo origen multicausal. Existen alteraciones metabólicas que incrementan el gasto energético.

Los diversos mecanismos que intervienen en el metabolismo intermedio aún no se comprenden del todo; las células malignas no solamente consumen nutrientes con mayor afinidad que las de tejidos normales, sino que inducen cambios sustanciales del metabolismo, secretando mediadores solubles a la circulación sistémica, incrementando la actividad de vías antianabólicas incluyendo la proteólisis, lipólisis y excesivo funcionamiento del ciclo de Cori en el hígado. La síntesis de proteínas es ineficaz y el manejo de los depósitos de energía metabólica está profundamente alterado; como resultado, el aporte de calorías y nutrientes elementales no es capaz de estimular eficazmente la síntesis de proteínas.¹³

Por otra parte, los cambios metabólicos que ocurren durante el crecimiento tumoral son mediados por numerosos factores, entre ellos el factor de inducción de proteólisis, que induce la degradación de proteínas a aminoácidos en el músculo esquelético, y el factor movilizador de lípidos, que promueve la degradación del tejido adiposo en ácidos grasos libres. Mientras que ambos son secretados por el tumor, también se liberan

citocinas proinflamatorias por la interacción entre células huésped y células tumorales.

Otro factor que puede condicionar la pérdida de peso es una mala adaptación metabólica, implicando los metabolismos glucídico, proteico y lipídico; ocasionando glucemias anormalmente bajas, con síndrome de resistencia periférica a la insulina, oxidación excesiva de ácidos grasos que resultan en depleción de los depósitos de grasa, hipertrigliceridemia, disminución de la concentración de lipoproteína lipasa y reducción de la síntesis de ácidos grasos libres y monoacilglicerol. Además, disminuye la síntesis de triglicéridos en los adipocitos.¹³

Al evaluarse el tiempo de prendimiento del tumor, pudo establecerse el tiempo de latencia del mismo, el cual quedó establecido alrededor del día 9 lo que parece explicarse teniendo en cuenta los ciclos de división de las células tumorales que por debajo de este período no alcanzan a diferenciar masas tumorales palpables. También se establece un período de latencia similar, no apareciendo masas atribuibles al tumor durante la primera semana de implantadas las células tumorales.

Al analizar el comportamiento de las variables morfológicas se comprobó que a medida que transcurrió el tiempo, los diámetros y el volumen del tumor aumentan apreciándose en el índice de crecimiento tumoral. El crecimiento acelerado de estos tumores se debe precisamente a sus características histológicas. Las células tumorales son poco diferenciadas y tienen un ritmo de divisiones celulares anormales (mitosis atípicas) muy acelerado.

En el estudio de Bruzzo J. et al.¹⁴ sobre cáncer experimental e inflamación sistémica, demuestran que la misma, podría promover el crecimiento tumoral a través de diferentes mecanismos. Una alta concentración de citoquinas y proteínas de fase aguda circulantes, podría afectar directa o indirectamente el tejido donde el tumor se encuentra implantado, generando señales regenerativas que podrían estimular el crecimiento tumoral e induciendo la secreción de moléculas contrainflamatorias e inmunosupresoras como IL-10, TGF- β , IL-13.

El infiltrado inflamatorio peritumoral descrito en el análisis anatomopatológico del tumor de CT26 evidencia la relación existente entre cáncer e inflamación, que justifica el rápido crecimiento de las células tumorales en el intervalo de tiempo que se desarrolla el experimento.

El análisis anatomopatológico de los órganos se hace con el objetivo de estudiar la aparición de metástasis en los mismos, teniendo en cuenta cuáles son las localizaciones metastásicas más frecuentes del CCR.

Con respecto al grupo control, los órganos hígado, bazo y riñones del grupo estudio, muestran un incremento de peso, que está en correspondencia con la congestión aguda presente en los mismos que se describe en el análisis anatomopatológico. Estos cambios pueden fundamentarse por el proceso de inflamación sistémica que experimentan estos animales del grupo estudio como consecuencia de la presencia del tumor, el cual desencadena la liberación de una serie de mediadores de la inflamación con el objetivo de garantizar su proliferación. El examen anatomopatológico del tumor del grupo estudio, evidenció la presencia de un infiltrado inflamatorio linfoplasmocitario alrededor de dicho tumor que avala este hecho.

Muchos tumores generan por sí mismos un ambiente pro-inflamatorio compuesto de citoquinas, quimioquinas, factores de crecimiento, estroma activado, metaloproteinasas que degradan la matriz extracelular y agentes que inducen daño en el ADN, lo cual generaría un mayor crecimiento y malignidad del tumor según los estudios de Bruzzo, J. et al.¹⁴

En el estudio de Jeong, J. et al.¹³, se demuestra en un modelo ortotópico de CCR, niveles elevados de óxido nítrico sintetasa (NOS) y ciclooxigenasa (COX 2), las cuales están implicadas en la producción de óxido nítrico y prostaglandinas y constituyen también un mecanismo implicado en la carcinogénesis del CCR. La congestión observada en algunos órganos puede ser consecuencia de este fenómeno de inflamación sistémica.

La hiperplasia de la pulpa blanca observada en el órgano bazo del grupo estudio, es otro elemento que en este caso, explica el aumento de peso del bazo del grupo estudio con respecto al control. La hiperplasia está en correspondencia con la activación del sistema inmune por la presencia de las células tumorales. La inflamación, según Bruzzo J. et al.¹⁴, es un proceso fisiológico que el organismo elabora frente a fenómenos de daño tisular y que tiene un rol clave en la activación de la respuesta inmune innata y adaptativa, la que debería, en principio, mediar el rechazo de los tumores inmunogénicos.

En el caso del timo se evidencia una disminución del peso de la glándula en el grupo estudio con respecto al grupo control, puesto que la reducción de peso de la glándula está acelerada, como se muestra en el estudio de Fuentes D et al.⁹

El aumento de peso de los pulmones en el grupo estudio con respecto al grupo control, estuvo relacionado con la presencia de nódulos metastásicos espontáneos en los mismos. La presencia de invasión vascular linfática extensa y de trombos tumorales en linfáticos fueron hallazgos encontrados en el análisis anatomopatológico del tumor del grupo estudio, que evidencian la diseminación por vía linfática de las células tumorales hacia este órgano, como es común que ocurra en la mayoría de los carcinomas. Similares resultados se encontraron en el estudio de Fuentes D. et al.⁹

El análisis anatomopatológico no evidencia signos de metástasis en la mayoría de los órganos, a pesar de que los mismos constituyen las localizaciones más frecuentes de metástasis en este tipo de cáncer. No obstante, estos hallazgos se corresponden con los encontrados en otros estudios relacionados con biomodelos de CCR, como en los de Rosenberg, Kim Y-Eet al.⁷; Rashidi, Babak et al.⁶; en los que se demuestra que existen interacciones entre la envoltura anfitriona y el tejido del tumor que determinan entre otros elementos, el comportamiento metastásico, por lo que resulta difícil encontrar metástasis en un modelo subcutáneo como el desarrollado. Sin embargo, estos tumores de CT26 presentan una capacidad de generar metástasis pulmonares espontáneas en la mayoría de los

animales inoculados, aunque la cantidad de focos metastásicos es baja, con un conteo que osciló entre 0 y 3 focos por animal.

El hecho de no haber encontrado metástasis espontáneas en otras localizaciones podría deberse a que el pulmón posee un microambiente que previene la apoptosis de las células metastásicas de CT26 y por lo tanto favorece su supervivencia. Esto se corrobora en el estudio de Fuentes D.⁹ relacionado con un modelo de carcinoma mamario ectópico que produce metástasis pulmonares.

Se concluye que fue posible la estandarización del modelo de cáncer colorrectal subcutáneo por célula implantada CT26, estable, reproducible y susceptible de emplearse en estudios ulteriores, como en la evaluación de nuevas estrategias de quimioterapia e inmunoterapia.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. American cancer society. [Internet]; 2015. [citado el 24 de septiembre 2015]. Disponible en: <http://www.cancer.org/espanol/cancer/colonyrecto/guiadetallada/cancer-colorrectal-what-is-what-is-colorectal-cancer>
2. Anuario estadístico de salud 2014. [Internet]; 2014. [citado el 24 de septiembre 2015]. Disponible en: <http://files.sld.cu/bvscuba/files/2015/04/anuario-estadistico-de-salud-2014.pdf>
3. DQ, Guo Q, Zhu JH, Chen WC. Increase of cyclooxygenase-2 inhibition with celecoxib combined with 5-FU enhances tumor cell apoptosis and antitumor efficacy in a subcutaneous implantation tumor model of human colon cancer. *World J Surg Oncol* [Internet]. 2013 Jan [citado el 26 de septiembre 2015] : [Aprox. 2 p.]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23347845>
4. McIntyre RE, Buczacki SJA, Arends MJ, Adams DJ. Mouse models of colorectal cancer as preclinical models. *Bioessays* [Internet]. 2015 Jun [citado el 25 de noviembre 2015]; 37(8): [Aprox. 13 p.]. Disponible en : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4755199/>
5. Rashidi B, Gamagami R, Sasson A, Sun FX, Geller J, Moossa AR, et al. An Orthotopic Mouse Model of Remetastasis of Human Colon Cancer Liver Metastasis. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2000 Jun [citado el 14 de mayo 2015]; 6 (6): [Aprox. 2 p.]. Disponible en : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10873112>
6. Kim Y-E, Kwon S, Wu G, Kim D, Park BK, Park JA, et al. Therapeutic effect of a TM4SF5-specific monoclonal antibody against colon cancer in a mouse model. *Oncotarget* [Internet]. 2014 Sep [citado el 14 de mayo 2015]; 5(18): [Aprox. 2 p.]. Disponible en : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25268742>
7. Das Thakur M, Pryer NK, Singh M. Mouse tumour models to guide drug development and identify resistance mechanisms. *J. Pathol* [Internet]. 2014 Jan [citado el 14 de mayo 2015]; 232(2): [Aprox. 2 p.]. Disponible en : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24122209>
8. Fuentes Morales D, Cabezas Cruz A, Beausoleil Delgado I, Avellanet González, J, García Díaz A. Influencia del sitio de inoculación sobre el crecimiento, morfología y metástasis espontáneas del cáncer de mama en un modelo murino. *REDVET* [Internet]. 2009 [citado el 10 de marzo 2014]; 10 (2): [Aprox. 13 p.]. Disponible en: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n020209/020911.pdf>
9. Schackert HK, Itaya T, Schackert G, Fearon E, Vogelstein B, Frost P. Systemic immunity against a murine colon tumor (CT-26) produced by immunization with syngeneic cells expressing a transfected viral gene product. *Int J Cancer*[Internet]. 1989 [citado el 10 de marzo 2014]; 43(5): [Aprox. 2 p.]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2714886>
10. Guía para el Cuidado, Uso y Reproducción de los Animales para la

Experimentación en el CENPALAB (2000). CENPALAB. Edición 01/00. <http://scielo.sld.cu/scieloOrg/php/reference.php?pid=S1028-47962003000200005&caller=scielo.sld.cu&lang=es>

11. Wang BC, Kennan WS, Yasukawa Barnes J, Lindstrom MJ, Gould MN. Carcinoma induction following direct in situ transfer of v-Ha-ras into rat mammary epithelial cells using replication-defective retrovirus vectors. CancerRes [Internet].1991 May [citado el 10 de marzo 2015]; 51(10): [Aprox. 2 p.]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2021942>

12. Jeong JK, Chang HK, Park KY. Inhibitory effects of meju prepared with mixed starter cultures on azoxymethane and dextran sulfate sodium-induced colon carcinogenesis in mice. JCarinog [Internet]. 2012 [citado el 11 de mayo 2015]: [Aprox. 2 p.]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23230391>

13. Sosa Sánchez R, Sánchez Lara K, Motola Kuba D, Green Renner D. Síndrome de

anorexia-caquexia en el paciente oncológico. Gac Méd Méx [Internet].2008 [citado el 10 de noviembre 2015]; 144(5): [Aprox. 6 p.]. Disponible en: http://www.anmm.org.mx/GMM/2008/n5/64_vol_144_n5.pdf

14. Bruzzo J, Chiarella P, Fernández G, Bustuoabad O D, Ruggiero R A. Cáncer experimental e inflamación sistémica en un modelo murino. Medicina (B. Aires) [Internet]. 2007[citado el 11 de mayo 2015]; 67(5): [Aprox. 2 p.]. Disponible en: http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0025-76802007000500010



María del Carmen Herrera de la Uz:

Especialista de Primer Grado en Fisiología Normal y Patológica. Instructor. Universidad de Ciencias Médicas de Pinar del Río. Cuba. ***Si usted desea contactar con el autor de la investigación hágalo [aquí](#)***