

Laboratorio de Cirugía Experimental.
Universidad del País Vasco.

Desarrollo de un modelo experimental para el estudio de metástasis hepáticas

Alonso Varona, A.; García-Alonso, I.; Portugal, V.; San Emeterio, E.; Méndez, J., y López de Tejada, I.

SUMMARY

An experimental model for the induction of hepatic metastasis by means of the subcutaneous injection of rhabdomyosarcoma cultured cells (S4MH) is described. The growth of the primary tumor and the dissemination process (local, ganglionic and hematogenous) are studied. The particular ability of the tumor to produce liver metastasis is assessed. The microscopic foci may be found in all of the specimens on day 25th post-injection. The maximum metastatic load is achieved by day 35 th. In contrast, the ganglionic and pulmonary metastasis were only found on the last step of the process.

KEY WORDS: Experimental liver metastasis, implantation metastasis, rhabdomyosarcoma.

Alonso Varona, A.; García-Alonso, I.; Portugal, V.; San Emeterio, E.; Méndez, J., y López de Tejada, I. Experimental model for the study of liver metastasis. Rev Esp Enf Digest, 1994, 86, 521-525.

RESUMEN

Se presenta un modelo experimental de inducción de metástasis hepáticas mediante la inoculación subcutánea de células cultivadas del rhabdomyosarcoma S4MH. Se estudia el proceso de crecimiento local del tumor, así como la diseminación del mismo (local, ganglionar y hematogénica). Se comprueba una especial capacidad del tumor para producir metástasis hepáticas, que pueden objetivarse en el día 25 post-inoculación. El momento de máxima carga metastásica tolerada se establece en el día 35 de evolución. Las metástasis ganglionares y pulmonares sólo se identifican en los últimos momentos del proceso.

PALABRAS CLAVE: Metástasis hepáticas experimentales, implantación metástasis, rhabdomyosarcoma.

INTRODUCCION

En estos últimos años, la cirugía de las metástasis hepáticas aisladas se ha venido practicando con frecuencia creciente;

especialmente en lesiones secundarias a cáncer de colon. De hecho, existen ya estudios clínicos muy amplios que recogen los resultados obtenidos por diversos grupos tras la resección hepática de metástasis; entre ellos destacan los del Hepatic Metastasis Registry (859 casos) (1) y los de la Universidad de Erlangen (266 casos) (2). En ambos estudios se establece una elevada esperanza de vida para aproximadamente el 25% de los pacientes intervenidos de 1 a 4 metástasis. Sin embargo, la supervivencia a los cinco años varía según los grupos, entre el 23% (3) y el 40% (4).

A pesar de que estos datos han supuesto un fuerte impulso para la cirugía de resección, hay estudios que cuestionan su utilidad. Así, Silen (5) estima que la supervivencia obtenida no justifica la morbi-mortalidad de la técnica, y Namieno (6), por su parte, observa una elevada recurrencia tumoral hepática tras la resección de las metástasis.

Estos datos, y especialmente la evidencia clínica de que gran parte de los pacientes sometidos a resección hepática por metástasis fallecen por recurrencia de la enfermedad, plantean la necesidad de establecer modelos experimentales que permitan conocer los factores implicados en el desarrollo de las metástasis hepáticas, el efecto de la resección sobre las células tumorales residuales, así como la recurrencia tras la cirugía. Estos conocimientos ayudarán posteriormente en el diseño de terapias coadyuvantes a la cirugía de resección.

Diversos equipos de investigación han utilizado modelos en los que se induce la proliferación de focos tumorales en el hígado mediante la inoculación de células neoplásicas en el bazo (7, 8), o bien directamente inyectándolas por la vía venosa mesentérica (9) o portal (10). En trabajos previos hemos utilizado el modelo de inoculación intraesplénica con el fin de estudiar el efecto de algunos inmunosupresores sobre la colonización hepática de células del melanoma B/16/F10 (11), así como el establecimiento de dos periodos bien definidos en el desarrollo de las metástasis hepáticas: una fase inicial de retención y asentamiento de las células tumorales en el hígado, y otra tardía caracterizada por la proliferación y el desarrollo del foco metastático (12). La eficacia de cada una de las fases es modulable independientemente. El modelo de inoculación intraesplénica es adecuado en estos estudios, sin embargo no reproducen todas las etapas del proceso metastático.

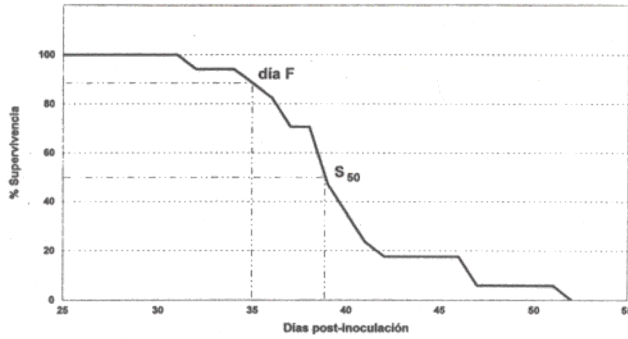


FIG. 1.—Curva de supervivencia de los animales inoculados con células RMS (S4MH). La muerte de los animales ocurre entre los días 32 y 52 post-inoculación. El mayor porcentaje de fallecimientos acontece entre los días 38 y 42.

Por ello, parece necesario diseñar nuevos modelos en los que las metástasis hepáticas se produzcan por liberación espontánea de células neoplásicas a partir de un tumor primario.

En este trabajo se propone un modelo en el que, a partir de un tumor primario inducido por inoculación subcutánea de células tumorales, se obtienen perfectamente metástasis hepáticas en un periodo de evolución relativamente corto, y con un patrón cronológico constante y reproducible. Esto permitirá, en estudios futuros, ensayar mejoras en las técnicas de resección hepática por metástasis y la aplicación de terapias coadyuvantes.

MATERIAL Y METODOS

Células tumorales

En todas las experiencias se ha utilizado la línea celular continua del rhabdomyosarcoma RMS (S4MH) inducido por la inoculación subcutánea de níquel, y seleccionada por su especial afinidad para la producción de metástasis hepáticas tras la inoculación.

Las células se han mantenido mediante cultivos «in vitro» con medio DMEM+10% SBF y suplementado con Penicilina (100 U.I./ml) / Estreptomicina (100 µgr/ml). Para la inoculación se han utilizado cultivos en fase de crecimiento exponencial, obteniendo una suspensión celular en PBS, a una concentración de 10^6 cels/ml.

Animales

Se han utilizado ratas singénicas WAG hembras, de 8-9 semanas de edad, con un peso de 150 ± 20 gr. Los animales han sido mantenidos en ciclos de 12 h. de luz/oscuridad, con libre acceso al agua y al alimento.

Inducción de metástasis hepáticas y sacrificio de los animales

En cada animal se han inoculado subcutáneamente 250.000 células, en el flanco derecho.

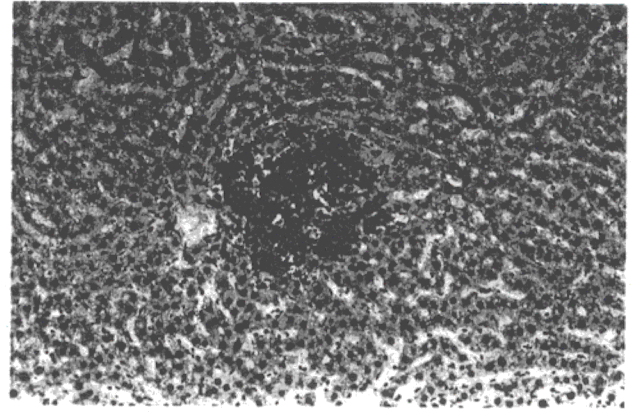


FIG. 2.—Microfotografía de una sección de hígado teñida con Hematoxilina-Eosina (200 X). En la imagen puede observarse la presencia de un foco metastático. La pieza corresponde a un animal sacrificado en el día 25 post-inoculación.

El sacrificio de los animales se ha llevado a cabo mediante sección medular alta bajo anestesia con éter, procediéndose a realizar el estudio necrópsico.

Diseño experimental

Para el estudio de la supervivencia se ha utilizado una serie de 30 animales. A partir del momento de la inoculación de las células tumorales, se ha realizado un control diario de la mortalidad inducida por el desarrollo del tumor. Esto ha permitido establecer el día de máxima carga metastática tolerada (día F).

En segundo lugar, y para determinar el momento de implantación de los focos metastáticos hepáticos (día I), se han utilizado 35 animales, sacrificados en grupos de cinco los días 17, 20, 23, 25, 28 y 35 tras la inoculación de las células tumorales. El estudio necrópsico incluyó: pesos del animal, tumor primario e hígado, así como la presencia de focos micrometastáticos en secciones histológicas del hígado teñidas con hematoxilina-eosina.

En estos mismos animales, se ha valorado la evolución del proceso metastático, estudiando la presencia de metástasis macroscópicas. La diseminación local se ha valorado en función de la presencia o no de masa tumoral intraperitoneal. La diseminación ganglionar se ha estudiado verificando la existencia de metástasis retroperitoneales e inguinales. Y, por último, la diseminación hematogena se ha valorado mediante la búsqueda de metástasis macroscópicas en pulmón e hígado.

RESULTADOS

1. Supervivencia

Como se aprecia en la figura 1, la observación diaria de los animales permitió determinar que la mortalidad del 50%

TABLA I
Evolución de los parámetros ponderales

Días evolución	Peso del animal (grs)	Peso corregido (grs)	Peso del hígado (grs)	% peso hepático / peso corporal	Peso del tumor (grs)
17	149 ± 10,7	147 ± 11	6,96 ± 0,64	4,69 ± 0,5	2,39 ± 1,95
20	153 ± 7,4	147 ± 10	6,41 ± 0,41	4,19 ± 0,39	6,61 ± 3,64*
23	152 ± 6,9	145 ± 6	7,29 ± 1,46	4,77 ± 0,88	7,63 ± 4,52*
25	174 ± 8,7**	159 ± 9**	9,28 ± 0,79*	5,33 ± 0,51*	15,55 ± 1,88**
28	179 ± 17,7*	165 ± 24	7,71 ± 1,26	4,28 ± 0,34	14,36 ± 7,01*
35	177 ± 11*	152 ± 9	7,37 ± 1,31	4,16 ± 0,64	25,57 ± 5,27**

Los valores expresan la media de cada grupo, ± la desviación estándar. En todos los grupos n=5, salvo en el día 35 (n=8).

(*) La diferencia frente al valor correspondiente del día 17 es estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

(**) La diferencia frente al valor correspondiente del día anterior es estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

acontece en torno al día 38 post-inoculación, produciéndose el fallecimiento del primer animal el día 32, y alcanzándose el 100% de mortalidad el día 52, en esta serie. Se ha considerado el día 35 el momento de máxima carga metastática tolerada (día F), ya que coincide con una supervivencia del 90%.

2. Determinación del día «I»

La observación de las secciones histológicas hepáticas de animales sacrificados secuencialmente (días 17, 20, 23, 25, 28, 35) tras la inoculación de las células tumorales, permitió establecer el momento en que los focos micrometastáticos alcanzan un tamaño suficiente para ser estudiados con las técnicas habituales de microscopía óptica. Este momento es considerado como el inicio de la fase de proliferación de las células tumorales implantadas (día I). En las muestras de animales sacrificados el día 17 post-inoculación, no se pudo identificar ningún foco tumoral. El día 23 comienzan a ser visibles los primeros focos, aunque no aparecen en todos los animales pertenecientes a esta serie. A partir del día 25 las metástasis son objetivables en todos los casos (fig. 2).

Los parámetros ponderales obtenidos en las necropsias quedan expresados en la tabla I. Tal y como puede observarse, el peso del animal apenas se modifica entre el día 17 y el 23. Sin embargo, experimenta un incremento significativo entre los días 23 y 25 ($p=0,012$), momento a partir del cual el peso del animal permanece estable. Esta tendencia no se altera si realizamos el estudio restando al peso del animal el peso del tumor [peso animal corregido=(peso del animal) - (peso del tumor)] (fig. 3).

Con respecto al peso del tumor primario, éste aumenta progresivamente a lo largo de todo el periodo estudiado. En la gráfica de la figura 4 puede apreciarse cómo existe un momento de mayor velocidad de crecimiento entre los días 23 y 25 ($p = 0,015$) seguido por una pequeña meseta (días 25 a 28) que puede corresponder a los fenómenos de necrosis intratumoral. En el último periodo, se reanuda la velocidad de crecimiento normal (días 28 a 35).

El peso del hígado no experimenta grandes variaciones a lo largo de la evolución salvo por un aumento aislado en el

día 25, que también se observa cuando se considera la relación (peso hepático) / (peso animal corregido) / (fig. 5).

3. Valoración de metástasis macroscópicas

La extensión intraperitoneal del tumor sólo se ha presentado al final del proceso evolutivo, objetivándose únicamente en la mitad de los animales sacrificados el día 35. En cambio, la diseminación ganglionar es más precoz, apareciendo metástasis retroperitoneales en un 50% (± 10) de los animales a partir del día 20, y en el 100% de los sacrificados el día 35, presentando uno de ellos metástasis inguinales. En cuanto a la vía hemática, aparecen metástasis visibles en el pulmón en los animales sacrificados a partir del día 28 (60% el 28 y 87,5% el 35). Por último, en el hígado las metástasis sólo son visibles macroscópicamente a partir del día 35; momento en el que se encuentran en el 87,5% de los animales, con una media de 4 ($\pm 1,7$) metástasis por animal.

DISCUSION

En los modelos experimentales clásicos diseñados para el estudio de las metástasis hepáticas, la inducción de éstas, se produce mediante la inoculación de las células por las vías intraesplénica, portal o mesentérica (7-11). En estos modelos, no existe una auténtica liberación de células a partir de un tumor primario, sino que, por diferentes vías, se «embolizan» células tumorales directamente en el hígado, lo que, aunque válido para determinados estudios, plantea problemas para la consecución de nuestros objetivos.

Por una parte, se suprime la presentación que ocurre de manera natural, previa al anidamiento de las células tumorales en el órgano. Esto supone un problema, ya que la ausencia del tumor primario impide extrapolar a la situación clínica las conclusiones obtenidas tras la aplicación de diferentes tratamientos.

Además, se debe considerar que la eficacia de la respuesta antitumoral de los macrófagos intrasinusoidales depende en buena medida del ritmo de llegada de las células tumorales (9). Las embolizaciones de células tumorales producen un

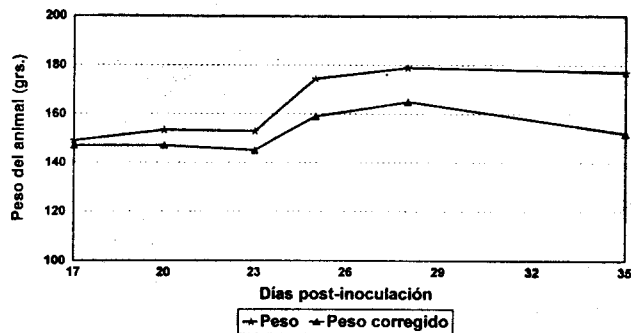


FIG. 3.—Curva de evolución ponderal. El peso de los animales se mantiene constante hasta el día 23, momento en el que se inicia un ligero aumento hasta el día 28, para estabilizarse en el último periodo.

rápido bloqueo de la acción citolítica de las células de Kupfer, situación que no se produce cuando la liberación tiene lugar a partir de un tumor primario.

Por otra parte, es sabido que la presencia del tumor primario origina un estímulo inmunológico constante, que también condiciona la capacidad de asentamiento de las células en los diferentes órganos (11). Por este motivo, la ausencia de tumor primario, elimina uno de los mecanismos de defensa antitumoral.

El objetivo de este trabajo es plantear un modelo experimental lo más parecido posible a la situación clínica real; es decir, que cumpla todas las etapas del proceso de formación de las metástasis hepáticas, con el fin de evitar los problemas señalados previamente.

Así, el modelo experimental propuesto en este trabajo aporta varios aspectos ventajosos de cara a la posterior aplicación clínica de los resultados obtenidos en la experimentación animal.

En primer lugar, la inducción del tumor se consigue mediante la inoculación de células procedentes de cultivos, y por lo tanto fácilmente disponibles, y no mediante el recurso a técnicas de carcinogénesis (tóxicos, radiaciones, etc.). Esto supone menos esfuerzo, menor tiempo de inducción, y

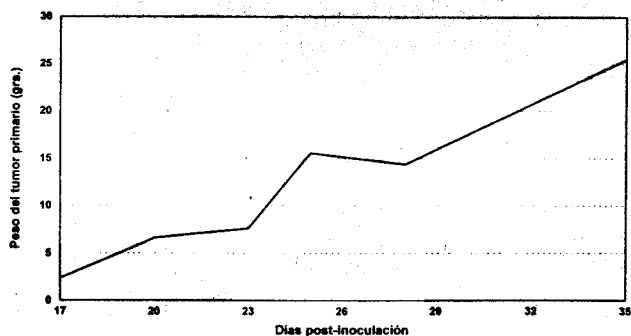


FIG. 4.—Evolución ponderal del tumor. El ritmo de crecimiento del tumor es constante a lo largo de todo el proceso, aunque se aprecia un aumento significativo entre los días 23 y 25.

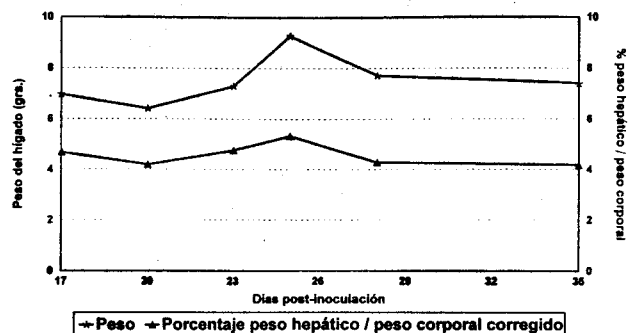


FIG. 5.—Evolución ponderal del hígado. El peso del hígado, tanto en cifras absolutas como expresado en forma de porcentaje del peso corporal, permanece estable; con la salvedad de un incremento transitorio en el día 25.

unos resultados más homogéneos, pues provoca en todos los casos el crecimiento de un tumor primario en el lugar de inoculación.

Además, asegurada una técnica correcta, el patrón de crecimiento del tumor es absolutamente previsible, constante y reproducible.

Otro aspecto positivo del modelo propuesto lo constituyen las características del proceso de diseminación del tumor, pues las metástasis se localizan preferentemente en el hígado, y sólo en etapas muy tardías, invade el tumor las cadenas ganglionares y el pulmón.

Por último, la evolución de las metástasis hepáticas (identificación, número, tamaño y ritmo de crecimiento) se puede estudiar mediante técnicas de análisis de imagen aplicadas sobre secciones histológicas del hígado.

Se acepta que estos estudios deben realizarse, al menos, en dos momentos diferentes del proceso (12): cuando comienzan a aparecer los primeros focos metastásicos en el hígado (día I), y en el periodo final, que suele denominarse de «máxima carga metastásica tolerada» (día F).

En nuestro modelo, consideramos que el día I debe asignarse al 25 de evolución, ya que antes no es posible identificar focos metastásicos en todos los animales. Ocurre además, que en torno a este día se observan los cambios más significativos en la evolución de los parámetros ponderales estudiados. Así, tanto el peso del animal como el del hígado (absoluto y relativo) y el del tumor primario aumentan significativamente entre el día 23 y el 25. Sin embargo, el significado de este fenómeno no puede ser explicado con los datos disponibles actualmente.

Por otro lado, no parece adecuado prolongar el estudio más allá del día 35, ya que en ese momento todos los animales han desarrollado metástasis hepáticas y la supervivencia ha descendido ya al 90%. Por ello, hemos propuesto considerar el día 35 como el día F, en este modelo.

En base a los resultados expuestos, consideramos que el modelo experimental propuesto (que incluye todas las etapas del proceso metastático) es adecuado para el estudio de la eficacia de determinados tratamientos sobre el proceso de colonización inicial, las recidivas y la supervivencia.

AGRADECIMIENTOS

Las células RMS S4MH han sido gentilmente cedidas por M.F. Poupon del Institut Curie de París.

Este trabajo ha sido financiado por el F.I.S. (92/0693)

Correspondencia:

Dr. Ignacio López de Tejada.
Laboratorio de Cirugía Experimental.
Universidad del País Vasco.
48940 Lejona (Vizcaya).

BIBLIOGRAFIA

1. Hughes K, Scheele Y y Sugarbaker P. Cirugía para cáncer colorrectal metastásico al hígado. Optimización de los resultados de tratamiento. *Clin Quir N Am* (Ed Esp) 1991; 2: 385-407.
2. Scheele Y, Stangl P y Alendorf-Hofmann D. Metástasis hepáticas del carcinoma colorrectal: importancia de la resección quirúrgica en su historia natural. *Br J Surg* (Ed Esp) 1991; 5 (2): 118-125.
3. Flanagan L y Foster JH. Hepatic resection for metastatic cancer. *Am J Surg* 1967; 113: 551-557.
4. Attiyeh FF, Wanebo HJ y Stearns MW. Hepatic resection for metastasis from colorectal cancer. *Dis Colon Rect* 1978; 21: 160-162.
5. Silen N. Hepatic resection for metastases from colorrectal carcinoma is of dubious value. *Arch Surg* 1989; 124: 1021-1022.
6. Namieno T. Experimental analysis of postoperative early recurrence of liver cancer. *Hokkaido-Igaku-Zasshi* 1989; 64 (5): 630-641.
7. Kopper L, Hanh TV y Lapis K. Experimental model for liver metastases formation using Lewis lung tumor. *J Cancer Res Clin Oncol* 1982; 103: 31-38.
8. Barberá-Guillem E, Alonso A y Vidal-Vanaclocha F. Selective implantation and growth in rats and mice of experimental liver metastases in acinar zone one. *Cancer Res* 1989; 49: 4003-4010.
9. Bayón LG, Martín Cabanna J, Meijer S y García Sabrido JL. Role of Kupffer cells in binding circulating tumor cells and controlling metastatic growth in the liver. *Hepato-Gastroenterol* (Ed Esp) 1993; 3 (1S): 306.
10. Panis Y, Ribeiro J, Chrétien y Nordlinger B. Dormant liver metastases: an experimental study. *Br J Surg* 1992; 79: 221-223.
11. Barberá-Guillém E, Cañavete ML, López de Tejada I y Vidal-Vanaclocha F. Influence of host defense on the hepatic colonization of B16/F10 melanoma cells. *Clin Exp Metastases* 1988; 6 (2): 153-169.
12. Barberá-Guillém E, Barceló JR, Urcelay B, Alonso-Varone A y Vidal-Vanaclocha F. Noncorrelation between implantation and growth of tumor cells for their final metastatic efficiency. *Invasion Metastasis* 1988; 8: 266-284.

Recibido: 20-XII-93.