

Effects of all-trans retinoic acid on tumor recurrence and metastasis

I. García-Alonso, T. Palomares, A. Alonso-Varona¹, B. Castro¹, M. del Olmo¹, V. Portugal and J. Méndez

Laboratory of Experimental Surgery. ¹Dept. of Cellular Biology and Histology. Faculty of Medicine and Dentistry. Lejona, Vizcaya, Spain

ABSTRACT

Objective: all-trans-retinoic acid (ATRA) promotes cell differentiation. We have studied its effect on the local recurrence and metastatic spreading of an experimental rhabdomyosarcoma in rats.

Design: syngenic rhabdomyosarcoma cells (S4MH) were inoculated s.c. in male WAG/RijCrl rats. After 25 days tumors were excised and a 40% hepatectomy was performed for all animals. Ten days later the rats were sacrificed and a thorough necropsy was performed. The animals were randomly allocated to receive daily doses of ATRA (5 mg/kg, i.p.) or its solvent (Clinoleic®/ethanol 90/10), starting three days before surgery until the end of the experiment.

Results: ATRA reduced the incidence of local recurrence from 70 to 33% ($p < 0.05$), but the tumor size was not altered (1.8 vs. 2.0 cc). Regarding inguinal metastasis, there was a six-fold decrease (0.2 vs. 1.2 cc; $p < 0.05$) in mean tumor volume, although the rate of this proliferation increased sharply (86 vs. 29%; $p < 0.05$) for treated animals. The volume of the retroperitoneal tumor masses also decreased with ATRA (0.7 vs. 5.1 cc; $p < 0.05$), but the difference in rate was not significant (71 vs. 67%). Lung metastases, which were present in 100% of control animals, were found in only 33% of treated rats, while the mean number of metastatic foci dropped from 26.7 to 5.7 ($p < 0.05$).

Conclusion: protocols including retinoid administration prior to and following primary tumor excision could help in controlling both recurrence and metastatic progression in surgically treated rhabdomyosarcoma.

Key words: Rat. Rhabdomyosarcoma. Recurrence. Metastasis. All-trans-retinoic acid.

García-Alonso I, Palomares T, Alonso A, Castro B, del Olmo M, Portugal V, Méndez J. Effects of all-trans retinoic acid on tumor recurrence and metastasis. *Rev Esp Enferm Dig* 2005; 97: 240-248.

INTRODUCTION

Over the past decade, remarkable progress has been made in antineoplastic therapy, with surgery still in the forefront as the main curative approach. However, recurrence of disease following tumor resection remains a major problem, not only because of failed local control but also because of the effect of surgery on the distant proliferation of disease, thus reducing patient quality of life and survival (1).

While tumor recurrence depends to a great extent on the radicality of surgery, it can also be induced by biological responses initiated following tissue aggression as implied by the operation itself. Indeed, in an experimental carcinogenesis model, researchers observed that the rate of colon tumor development following a carcinogen was much higher within healing anastomoses in the colon (2).

Surgery, it must be remembered, triggers local release of multiple growth factors (GF) that are responsible for wound healing, but which may also act as paracrine factors giving tumor cells the signal they require to divide and proliferate (3). Such factors include beta fibroblast proliferation-stimulating GF (FGFb), platelet-derived growth factor (PDGF), hepatocyte growth factor (HGF), and others (4-6). It is important therefore to design combined treatments that will inhibit residual tumor cell proliferation following surgery, without impairment of the healing process.

Today it is well known that a tumor's behavior is related to the degree of differentiation of cancer cells, so that

This study was supported by "Fondo de Investigación Sanitaria", Spain, Grant no. 144.327-0364/99, 1999.

Recibido: 20-09-04.
Aceptado: 11-11-04.

Correspondencia: Ignacio García-Alonso. Departamento de Cirugía. Facultad de Medicina y Odontología. Bº Sarriena, s/n. 48940 Lejona, Vizcaya. Tel.: 946 012 816. Fax: 946 012 781. e-mail: ocpgamoi@lg.ehu.es

usually the lower the degree of differentiation the greater the aggressiveness that may be expected from the neoplasm. Therefore, this study was undertaken to explore a differentiation inducement treatment to be used in combination with surgery as a strategy to prevent the development of both the primary tumor and potential metastases. Retinoic acid and related molecules have been shown to be capable of reducing the aggressiveness of different tumor lines both *in vitro* (7) and *in vivo* (8) by inducing cell differentiation (9) and apoptosis. In this regard, we recently reported that all-trans retinoic acid (ATRA) blocks rhabdomyosarcoma development in male WAG/RijCrl rats inoculated s.c. in the right flank (10).

Using the same experimental model, whose natural development has been reported in detail in earlier works (11), we studied the effects of ATRA on local recurrence following the surgical excision of the tumors induced in the animals' flank. In order to enhance the presence of growth factors locally released in the surgical bed, we associated tumorectomy with partial (40%) hepatectomy, a procedure often used for managing single hepatic metastases in combination with the surgical excision of the primary tumor. Thus, growth factors were also present in the serum of animals, and could then be conveyed to any body site harboring tumor cells.

METHODS

The study was carried out on syngenic, 8-week-old, male WAG/RijCrl rats stabilized throughout the experiment with a 12-h light/darkness cycle and given food (Panlab A-04) and drink *ad libitum*. Spain's National Guidelines for the care of laboratory animals (Royal Decree Law No. 223/88) were followed at all times.

Experimental model

As a tumor model we used the S4MH rhabdomyosarcoma cell line (syngenic for WAG rats), with a high affinity for the development of liver metastasis. Cells (2.5×10^5 cells, resuspended in 250 μ l of Ca⁺⁺-free PBS [phosphate-buffered saline solution]) were administered by subcutaneous inoculation in the flanks of animals (1 cm ahead of the hip).

Twenty-five days after tumor cell inoculation, the primary malignant lesion was surgically isolated by blunt dissection of the capsular plane, and extirpated along with a 0.5-cm border of skin not attached to the tumor. During the same procedure, a partial (40%) hepatectomy (excision of the right lateral lobe) was performed to simulate a hepatic resection for metastatic disease. To facilitate recovery following surgery, 5 ml of 5% glucose solution were administered i.p. For the next ten days, the animals were monitored for potential local recurrence of the tumor.

The rats were sacrificed on day 35 post-inoculation, and the necroscopic study was performed without the technician knowing which treatment the animals had received. The weight of each animal and liver were recorded, followed by an assessment of local-regional progression, including the measurement of volume and weight for any tumor recurrence and a count of any macroscopical metastases found in inguinal and axillary nodes, as well as in the retroperitoneum. Finally, the number of macroscopical metastases observed on the lung surface was recorded.

All-trans retinoic acid treatment

ATRA (sigma R-2625) was administered i.p. at doses of 5 mg/kg (0.6 ml of [90% clinoleic[®] + 10% ethanol]). Treatment was begun three days after tumorectomy and then continued until the tenth day post-surgery. To this end, the 14 study rats were randomly separated into two groups, with the control group receiving only the solvent (0.6 ml of [90% Clinoleic[®] + 10% ethanol]) without ATRA.

To evaluate the possible toxicity of the ATRA treatment, animal weight was recorded over the course of the experiment along with the final liver weight.

Statistical analysis

The statistical analysis was performed by using Fisher's exact test to compare the frequency of glandular metastasis development, and applying Student's t-test for other quantitative parameters.

RESULTS

Effects of ATRA on local tumor progression

Treatment with ATRA was well tolerated by the animals, for while the experimental group lost more body weight than the controls, this loss was always less than 15% of initial body weight (Fig. 1A). Moreover, liver mass, expressed as a percentage of total body weight, did not differ as a result of treatment when compared to the control group (Fig. 1B).

The rate of local recurrence was measured ten days after resection of the primary tumor (day 35 of the neoplastic process). A high rate of local recurrence was registered in the control group, with over 70% of animals affected. In the ATRA treatment group, however, the rate of local recurrence was less than half in the control group (33 vs. 71%, $p < 0.05$) (Fig. 2A). Nevertheless, there were no significant differences between the experimental and control groups in mean volume of recurrent tumor mass (1.8 vs. 2.0 cc, $p = 0.89$) (Fig. 2B).

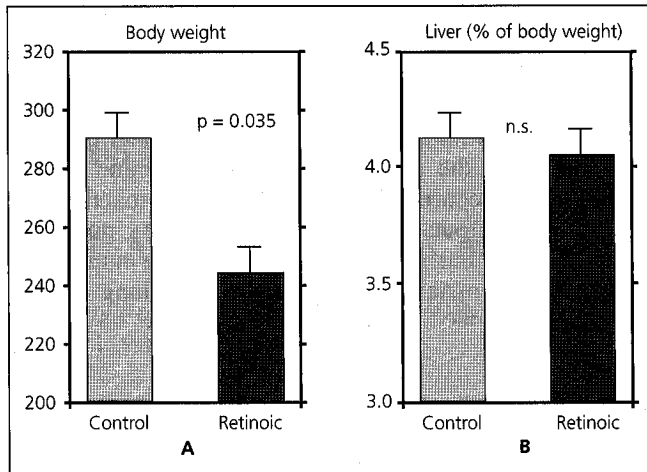


Fig. 1.- Weights at end of treatment. (A) Mean body weight (g). (B) Mean liver weight (% of body weight).
 Datos ponderales al finalizar el tratamiento. (A) Media del peso corporal (en g). (B) Media del peso hepático (en % sobre peso corporal).

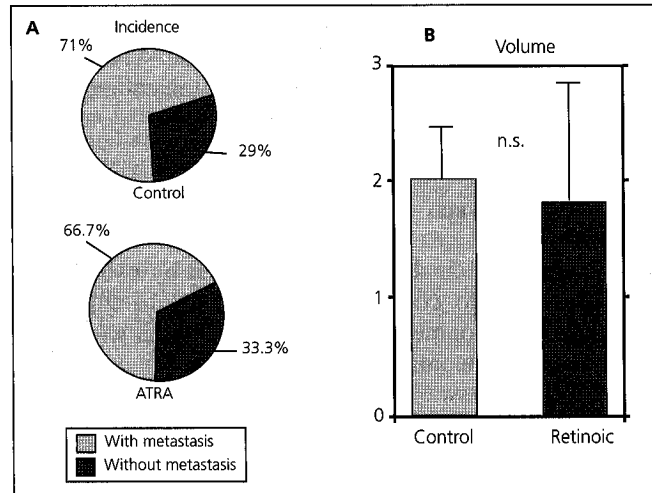


Fig. 2.- Tumor recurrence. (A) Black shows percentage of animals with primary tumor recurrence. (B) Mean volume of local tumor recurrences (cm³).
 Recidiva tumoral. (A) En negro se recoge el porcentaje de animales que presentaron recurrencia del tumor primario. (B) Volumen medio de las recurrencias locales del tumor (cm³).

Effects of ATRA on distant tumor progression

To study the dissemination of disease following resection of the primary lesion, as well as the effects of ATRA on tumor progression, an analysis was made of local-regional neoplastic invasion at the inguinal and retroperitoneal levels and of distant invasion by analyzing the rate of pulmonary infiltration and number of foci in the lungs.

With regard to local and regional progression, there was a significantly higher rate of inguinal node invasion in the ATRA-treated animals *versus* the control group (86 vs. 29%; $p < 0.05$). However, the mean volume of in-

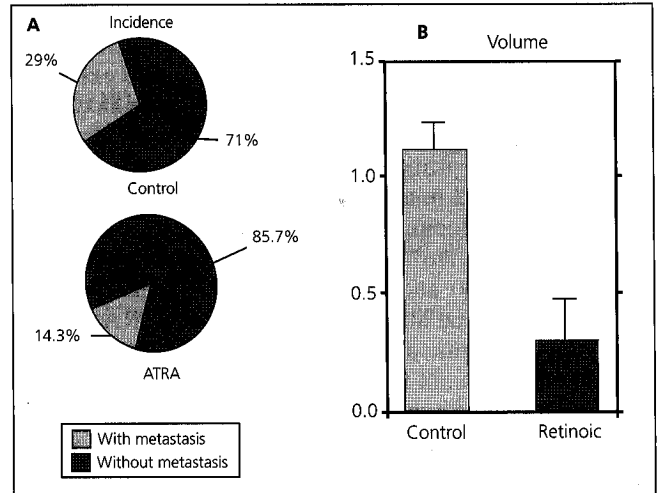


Fig. 3.- Inguinal metastases in experimental and control groups. (A) Percentage of animals with ipsilateral inguinal metastasis. (B) Mean volume of metastases detected.
 Metástasis inguinales en los dos grupos experimentales. (A) Porcentaje de animales que presentaron metástasis en ganglios inguinales ipsilaterales. (B) Volumen medio de las metástasis encontradas.

guinal metastases in treated animals was 6 times smaller than in the control group (0.2 vs. 1.2 cc; $p < 0.05$).

Moreover, as can be seen in figure 4, there was a high rate of retroperitoneal metastasis in both the control and ATRA therapy groups, with no significant differences between the two (71 vs. 67%, $p > 0.05$). However, the mean volume of retroperitoneal tumor mass was 7 times smaller in the ATRA-treated group than in the control animals (0.7 vs. 5.1 cc; $p < 0.05$).

Concerning distant tumor progression, while in the control group all animals exhibited metastatic invasion of

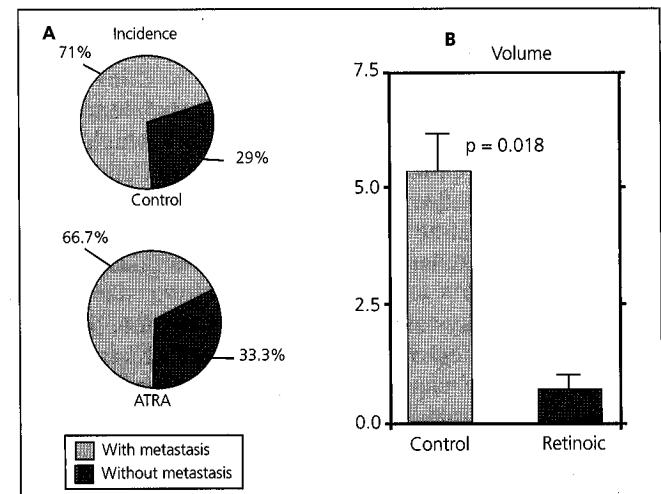


Fig. 4. Retroperitoneal metastasis. (A) Percentage of animals with retroperitoneal metastasis. (B) Mean volume of metastases detected.
 Extensión del tumor al retroperitoneo. (A) Porcentaje de animales que presentaron metástasis retroperitoneales. (B) Volumen medio de las metástasis encontradas.

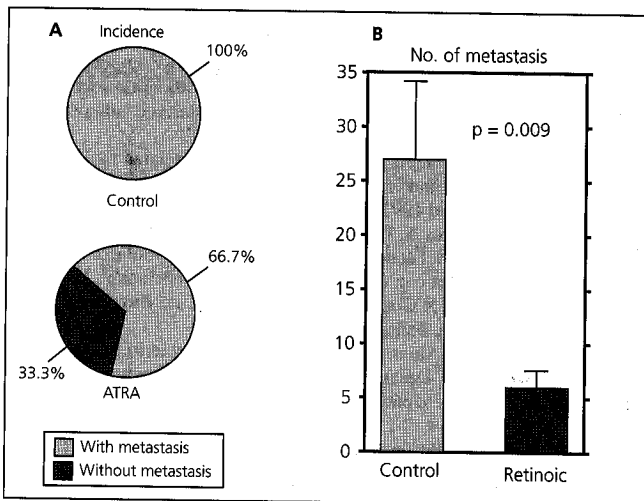


Fig. 5. Pulmonary metastasis. (A) Percentage of animals with pulmonary metastasis. (B) Mean number of metastases per animal. *Estudio de la afectación pulmonar metastática. (A) Porcentaje de animales que presentaron metástasis. (B) Número medio de focos por animal.*

the lungs, in the ATRA-treated group the rate was reduced by 33% ($p < 0.05$) (Fig. 5). Moreover, the count of metastatic foci also showed a 5-fold reduction in the mean number of pulmonary colonies when compared to the control group (5.7 vs. 26.7; $p < 0.05$).

DISCUSSION

Surgery remains the primary treatment for solid tumors. Indeed, their local control depends on appropriate surgical treatment ensuring the removal of the primary lesion together with an ample margin of tumor-free surrounding tissue, and on the biological characteristics of the tumor itself. This is especially true in soft-tissue sarcomas, which still respond poorly to treatment, with little progress having been achieved in recent years (12). In this type of tumor, frequent local invasion greatly complicates surgical excision and gives rise to a high rate of local recurrence (13). Moreover, 40% of soft-tissue sarcoma patients develop distant metastasis, despite apparent local control when the disease is first treated (14). The most important factor for predicting this outcome is histological grade. Indeed, 81% of high-grade sarcomas, such as rhabdomyosarcomas, metastasize within the first year of initial treatment (15). This being the case, tumor type must logically be taken into account in determining the surgical procedure and adjuvant therapy to be followed during the management of the disease.

Furthermore, it should be remembered that the process of invasion and metastasis is influenced by numerous two-way interactions between tumor cells and stromal cells such as fibroblasts, macrophages, lymphocytes and endothelial cells (16,17), and that these interactions are in

turn largely regulated by growth factors (18), whose release is fostered by the surgical act itself.

This means that other approaches in addition to surgery must be developed to reduce the percentage of failed local control through strategies designed to be implemented in combination with the surgical approach, taking into account the actual biology of tumor cells.

In order to experimentally reproduce the clinical problem outlined above, which is characterized by failed local control and the development of metastases following solid tumor surgery, we decided to use as tumor model the S4MH rat rhabdomyosarcoma cell line, because of its high affinity for the development of tumors and metastasis. As a surgical treatment model, we performed a local surgical excision of the primary lesion together with a partial hepatectomy, a combination that prompts the release of a large flow of growth factors into the circulation, thus allowing obtaining a paracrine stimulation to promote invasion and metastasis. Hepatocyte growth factor (HGF), one of the main such factors secreted following hepatectomy, is well known for its role in inducing the growth, motility and invasion of different types of tumor cells (19). To this must be added the tumor-promoting activity of other factors secreted by stromal cells at the surgical wound, such as FGFb, vascular endothelial growth factor (VEGF), TGF- β , interleukins such as IL-6 and IL-8, etc. (20,21).

In designing a treatment to be used in combination with surgery that would take into account the influence of differentiation extent on soft-tissue sarcomas, we decided on all-trans retinoic acid because of its inhibitory effect on tumor cell growth and its ability to stimulate differentiation and apoptosis (22,23). Specifically, ATRA has demonstrated its anti-neoplastic activity on a number of human solid tumors, including mammary carcinomas (24), head and neck tumors (25), ovarian cancer (26), and other malignancies. Moreover, at doses utilized, no adverse side effects worthy of consideration have been described.

It was considered that ATRA therapy should be administered before surgery and continued thereafter to produce differentiation-inductive signaling prior to the release of growth factors due to surgery itself, and also to ensure that the signaling would remain active over a long period of time, so that we could effectively counteract the differentiation-hindering signal -i.e., the cell proliferation stimulus by growth factors.

Our results show that this model results in a high rate of local recurrence and local-regional invasion (characteristic of human soft-tissue tumors), and in the development of metastasis in all animals within the control group. We feel that this confirms the usefulness of our experimental model in assessing the effectiveness of a new anti-neoplastic treatment.

Continuous pre- and post-surgical treatment with ATRA was well tolerated by animals, for although their body weight decreased, the loss amounted to less than 15% of their pre-treatment weight.

Regarding the effectiveness of the treatment strategy tested in this experiment, the addition of ATRA to surgical treatment was associated with a 38% reduction in local recurrence and a 33% drop in the presence of metastasis in the lungs, a preferential target organ for most metastasizing sarcomas (27). This decline in the metastatic capacity of S4MH cells produced by ATRA is reflected not only in the reduced number of animals with metastasis, but also in a drop in the mean number of pulmonary foci, which were only one-fifth the number in the control group. This significant reduction in tumor mass was also observed for retroperitoneal metastases, although their incidence was not reduced.

Regarding node metastases, while their frequency is low (3.9-5.9%) in most sarcomas, in the case of rhabdomyosarcoma it can reach as high as 36% of patients (28). In our experimental model, node invasion was detected in 29% of animals, a percentage that paradoxically increased significantly (86%) in ATRA-receiving rats. However, in this case as well, there was a 6-fold decrease in mean tumor volume in the experimental group when compared to the control group.

In conclusion, this *in vivo* study shows that treatment with ATRA, administered in combination with primary tumor resection, is associated with a reduction in the metastatic potential of rat S4MH rhabdomyosarcoma, suggesting that a therapeutic approach based on pre- and post-extirpation treatment with retinoids could enhance local control for solid tumors subjected to surgery.

REFERENCES

- Allendorf J, Ippagunta N, Emond J. Management of liver metastases: new horizons for biologically based therapy. *J Surg Res* 2004; 117: 144-53.
- Noguera JF, Amengual I, Plaza A, Tortajada C, Morón JM, Pujol JJ. Influencia de la manipulación quirúrgica del colon en la carcinogénesis cólica inducida en ratas. *Rev Esp Enferm Dig* 2004; 96 (5): 322-30.
- Abramovitch R, Marikovsky M, Meir G, Neeman M. Stimulation of tumour growth by wound-derived growth factors. *Br J Cancer* 1999; 79: 1392-8.
- Yeaman TJ, Risley GL, Brunson ME. Depletion of dietary arginine inhibits growth of metastatic tumor. *Arch Surg* 1991; 126: 1376-82.
- Berger W, Setinek U, Mohr T, Kindas-Mugge I, Vetterlein M, Dekan G, et al. Evidence for a role of FGF-2 and FGF receptors in the proliferation of non-small cell lung cancer cells. *Int J Cancer* 1999; 83 (3): 415-23.
- Uchida D, Kawamata H, Omotehara F, Nakashiro-Ki, Kimura-Yanagawa T, Hino S, et al. Role of HGF/c-met system in invasion and metastasis of oral squamous cell carcinoma cells in vitro and its clinical significance. *Int J Cancer* 2000; 193: 489-96.
- Ponthan F, Lindskog M, Karnehed N, Castro J, Kogner P. Evaluation of anti-tumour effects of oral fenretinide (4-HPR) in rats with human neuroblastoma xenografts. *Oncol-Rep* 2003; 10 (5): 1587-92.
- Tabé Y, Konopleva M, Munsell MF, Marini FC, Zompetta C, McQueen T, et al. PML-RARalpha is associated with leptin-receptor induction: the role of mesenchymal stem cell-derived adipocytes in APL cell survival. *Blood* 2004; 103 (5): 1815-22.
- Lu XP, Fanjul A, Picard N, et al. Novel retinoid-related molecules as apoptosis inducers and effective inhibitors of human lung cancer cells in vivo. *Nature Med* 1997; 3 (6): 686-90.
- Castro B, Palomares T, del Olmo M, González J, Bilbao P, Alonso-Varona A. Efecto del ácido retinoico en dos líneas celulares de rhabdomyosarcoma de rata con diferente grado de diferenciación. En: Libro de Resúmenes del X Congreso de la Sdad. Esp. de Biología Celular. Miguel Lafarga Ed. Santander, 2003. p. 143.
- Alonso A, García-Alonso I, Portugal V, San Emeterio E, Méndez J, López de Tejada I. Desarrollo de un modelo experimental para el estudio de metástasis hepáticas. *Rev Esp Enferm Dig* 1994; 86 (1): 521-55.
- Azzarelli A. Cirugía del tumor primario en los sarcomas de partes blandas. *Rev Cancer* 1998; 12: 144-9.
- Brennan MF, Casper ES, Harrison LB. Soft tissue sarcoma. En: De Vita VT, Hellman S, Rosenberg SA, eds. *Cancer: Principles and Practice of Oncology*. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1997. p. 1738-88.
- García JL, Puertas JL, Buesa JM. Tratamiento complementario de los sarcomas de partes blandas. *Rev Cancer* 1998; 12: 157-62.
- Potter DA, Glenn J, Kinsella T, et al. Patterns of recurrence in patients with high-grade soft-tissue sarcomas. *J Clin Oncol* 1985; 35: 1478-83.
- Tang DG, Honn KV. Adhesion molecules and tumor metastasis: an update. *Invasion Metastasis* 1995; 14: 109.
- Lauffenburger DA, Horwitz AF. Cell migration: a physically integrated molecular process 1996; 84: 359.
- Alonso-Varona A, Palomares T, Bilbao P, Castro B, Calle Y, Barberá Guillem E. Tumor-host interaction in non-random metastatic pattern distribution. *Bull Cancer* 1996; 83: 27-38.
- Uchida D, Kawamata H, Omotehara F, et al. Role of HGF/C-Met system in invasion and metastasis of oral squamous cell carcinoma cells in vitro and its clinical significance. *Int J Cancer* 2001; 93: 489-96.
- Fausto N. Liver regeneration. *J Hepatol* 2000; 32: 19-31.
- Shimizu H, Miyazaki M, Wakabayashi Y, Mitsuhashi N, Kato A, Ito H, et al. Vascular endothelial growth factor secreted by replicating hepatocytes induces sinusoidal endothelial cell proliferation during regeneration after partial hepatectomy in rats. *J Hepatol* 2001; 34: 683-9.
- Smith MA, Parkinson DR, Cheson BD, Friedman MA. Retinoids in cancer therapy. *J Clin Oncol* 1992; 10: 839-64.
- McBurney MW, Costa S, Pratt MA. Retinoids and cancer: a basis for differentiation therapy. *Cancer Invest* 1993; 11: 590-8.
- Wang Q, Yang W, Uytingco MS, Christakos S, Wieder R. 1,25-dihydroxyvitamin D3 and all-trans-retinoic acid sensitize breast cancer cells to chemotherapy-induced cell death. *Cancer Res* 2000; 60: 2040-8.
- Park SH, Gray WC, Hernández I, et al. Phase I trial of all-trans retinoic acid in patients with treated head and neck squamous carcinoma. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 847-54.
- Um SJ, Lee SY, Kim EJ, et al. Antiproliferative mechanism of retinoid derivatives in ovarian cancer cells. *Cancer Lett* 2001; 174: 127-34.
- Sole LA, Bellmunt J. Historia natural y estadiaje de los sarcomas de partes blandas. *Rev Cancer* 1998; 12: 137-42.
- Mazeron JJ, Suit HD. Lymph nodes as sites of metastases from sarcomas of soft tissue. *Cancer* 1987; 60: 1800-8.

Efecto del ácido trans-retinoico sobre la recidiva tumoral y el desarrollo metastásico

I. García-Alonso, T. Palomares, A. Alonso-Varona¹, B. Castro¹, M. del Olmo¹, V. Portugal y J. Méndez

Laboratorio de Cirugía Experimental. ¹Dpto. de Biología Celular e Histología. Facultad de Medicina y Odontología. Lejona. Vizcaya

RESUMEN

Objetivo: el ácido trans-retinoico (ATRA, "all-trans retinoic acid") es un agente inductor de la diferenciación celular. Se estudió su efecto sobre la recidiva local y la diseminación metastásica de los tumores sólidos.

Diseño experimental: mediante inoculación subcutánea de células de rhabdomyosarcoma (S4MH) se ha inducido un tumor en ratas WAG/RijCrI. Tras 25 días, se practicó una tumorectomía y simultáneamente hepatectomía del 40%. Los animales se sacrificaron el día 35, y fueron sometidos a estudio necrópsico. La mitad de los animales fueron tratados con ATRA (5 mg/kg, i.p.) desde el día 22 al 35, mientras que los controles recibieron el excipiente (Clinoleico®/etanol 90/10).

Resultados: el tratamiento redujo la tasa de recidiva local del 70 al 33% ($p < 0,05$), aunque no afectó a su tamaño (1,8 vs. 2,0 cc). El volumen medio de las metástasis inguinales se redujo a la sexta parte (0,2 vs. 1,2 cc; $p < 0,05$), si bien su frecuencia aumentó con el ATRA (86 vs. 29%; $p < 0,05$). La extensión retroperitoneal del rhabdomyosarcoma también se redujo (0,7 vs. 5,1 cc; $p < 0,05$), aunque no hubo variación en la incidencia (71 vs. 67%). La incidencia de afectación pulmonar (100% en controles) se redujo hasta el 33% ($p < 0,05$), a la vez que el número medio de focos en el pulmón pasó de 26,7 a 5,7 ($p < 0,05$).

Conclusión: la estrategia terapéutica fundamentada en el tratamiento pre y postextirpación quirúrgica con retinoides podría favorecer el control local de rhabdomyosarcomas sometidos a cirugía.

Palabras clave: Rata. Rhabdomyosarcoma. Recidiva. Metástasis. Ácido trans-retinoico.

INTRODUCCIÓN

La terapéutica antineoplásica ha experimentado una gran evolución en la última década, y dentro de ella la cirugía sigue siendo el principal tratamiento con intención curativa. Sin embargo, la recidiva tumoral tras la cirugía de exéresis constituye todavía un problema clínico de

gran relevancia; no sólo por el fallo del control local, sino también por su influencia en la diseminación a distancia de la enfermedad, y en la disminución de la calidad de vida y de la supervivencia de los pacientes (1).

La recidiva tumoral, si bien se ve condicionada en gran medida por la radicalidad de la cirugía, también puede verse inducida por las respuestas biológicas iniciadas tras la agresión tisular del acto quirúrgico. De hecho, en un modelo de carcinogénesis experimental, se pudo observar que la frecuencia de aparición de tumores de colon tras la aplicación de un carcinógeno fue muy superior en el seno de anastomosis cólicas en proceso de cicatrización (2).

Se debe tener presente que en la herida quirúrgica se produce la liberación local de múltiples factores de crecimiento responsables de la cicatrización, que también pueden actuar como factores paracrinos que estimulan la capacidad de desplazamiento y la proliferación de las células tumorales (3). Entre estos factores de crecimiento caben destacar el factor de crecimiento fibroblástico beta (FGFb), el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento hepatocitario (HGF) y otros (4-6). Por lo tanto, resulta importante diseñar tratamientos complementarios a la cirugía que, sin comprometer el proceso de cicatrización, inhiban la proliferación de las células tumorales residuales.

Es un hecho constatado que el comportamiento de un tumor está relacionado con el grado de diferenciación de las células neoplásicas, de manera que cuanto menor es su grado de diferenciación mayor agresividad suele presentar. Por este motivo, en el presente trabajo se ha planteado como estrategia terapéutica complementaria a la cirugía, la inducción de la diferenciación para intentar frenar el desarrollo tumoral, tanto en la localización del tumor primario como de sus metástasis. El ácido retinoico, así como sus moléculas relacionadas, han demostrado ser agentes con capacidad para disminuir la agresividad de diferentes líneas tumorales *in vitro* (7) e *in vivo* (8), a través de la inducción de la diferenciación celular (9) y de la apoptosis. En este sentido, en estudios recientes hemos demostrado que el ácido trans-retinoico (ATRA, "all-trans retinoic acid") reduce la tumorigenicidad de

Este estudio ha sido realizado con el soporte de una Beca para Ayuda a la Investigación del Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS), España, Proyecto n.º 144.327-0364/99, 1999.

células de rhabdiosarcoma en ratas WAG/RijCrl mediante inoculación subcutánea en flanco (10).

Utilizando el mismo modelo experimental, cuya evolución natural ha sido analizada en detalle en estudios previos (11), hemos estudiado el efecto del tratamiento con ATRA sobre la recidiva local tras la exéresis quirúrgica del tumor inducido en el flanco del animal. Con el fin de reforzar la presencia de los factores de crecimiento liberados localmente en el lecho quirúrgico, hemos asociado una hepatectomía parcial del 40%, hecho que con cierta frecuencia se produce en el tratamiento de metástasis hepática única en combinación con la resección quirúrgica del tumor primario. De este modo, los factores de crecimiento se encuentran también presentes en el suero del animal, pudiendo ser transportados a cualquier punto del organismo donde se encuentren las células tumorales.

MÉTODOS

El trabajo se ha realizado con ratas singénicas (WAG/RijCrl) machos, de 8 semanas de edad. Durante toda la experiencia los animales se mantuvieron en condiciones de libre acceso al agua y comida (Panlab A-04), y con un ciclo constante de luz-oscuridad de 12 horas. En todo momento se ha respetado lo establecido en la "Guía nacional española para el cuidado del animal en experimentación y otros fines científicos" (Real Decreto 223/88).

Modelo experimental

Como modelo tumoral se ha utilizado la línea celular de rhabdiosarcoma S4MH (singénica para la ratas WAG/RijCrl), con alta afinidad para el desarrollo de metástasis. Las células ($2,5 \times 10^5$ células, resuspendidas en 250 μ l de PBS [solución salina tamponada con fosfato libre Ca^{++}]) se inocularon por vía subcutánea en el flanco derecho de los animales (1 cm por delante de la cadera).

Veinticinco días después de la inoculación celular tumoral, se extirpó el tumor primario aislándolo mediante disección roma del plano capsular del mismo e incluyendo en la pieza un margen de 0,5 cm de piel no adherida al tumor. En el mismo acto quirúrgico se practicó una hepatectomía del 40% (lóbulo lateral derecho) para simular una resección hepática por metástasis. Para facilitar la recuperación de los animales, al finalizar el acto quirúrgico, se administraron 5 ml de suero glucosado 5% i.p. Desde ese momento, los animales se controlaron durante los diez días siguientes para detectar la posible recidiva tumoral local.

Los animales se sacrificaron el día 35 post-inoculación, realizándose el estudio necrópsico sin que el investigador responsable de dicha tarea conociera el tratamiento recibido por los animales. En primer lugar, se registró el peso tanto del animal, como del hígado. A continua-

ción se valoró la extensión loco-regional del tumor, midiendo en su caso el volumen de la recurrencia tumoral y cuantificando las metástasis macroscópicas en los ganglios inguinales y axilares, así como en el retroperitoneo. Por último, se cuantificaron las metástasis macroscópicas superficiales en el pulmón.

Tratamiento con ácido trans-retinoico

El ATRA (Sigma R-2625) se administró por vía i.p. en dosis de 5 mg/kg disuelto en 0,6 ml de [Clinoleico® 90% + etanol 10%]. El tratamiento se inició tres días antes de la tumorectomía y se prolongó hasta diez días post-cirugía. Para ello, los 14 animales del estudio se distribuyeron aleatoriamente en dos grupos, recibiendo uno de ellos el fármaco y el otro únicamente el solvente (0,6 ml de una mezcla de [Clinoleico® 90% + etanol 10%]).

Para valorar la posible toxicidad del tratamiento con ATRA, se llevó a cabo un control de la evolución ponderal de los animales y del peso hepático final de los mismos.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el test exacto de Fisher para la comparación de la frecuencia de aparición de metástasis ganglionares, y aplicando el test de la t de Student para el resto de los parámetros cuantitativos.

RESULTADOS

Efecto del ATRA sobre la evolución tumoral local

El tratamiento con ATRA fue bien tolerado por los animales, ya que si bien indujo una pérdida del peso global de los animales tratados respecto al grupo control, dicha pérdida fue siempre inferior al 15% respecto a su peso al inicio del tratamiento (Fig. 1A). Por otro lado, la masa hepática, expresada como porcentaje del peso corporal total, no sufrió modificación alguna por dicho tratamiento respecto al grupo control (Fig. 1B).

La incidencia de recidiva local se valoró diez días después de la resección del tumor primario (día 35 de evolución del proceso neoplásico). En el grupo control se registró una elevada tasa de recurrencia local, viéndose afectados más del 70% de los animales. En cambio, en los animales tratados con ATRA la incidencia de recidiva local se redujo a menos de la mitad respecto al grupo control (33 vs. 71%, $p < 0,05$) (Fig. 2A). Y sin embargo, el volumen medio de las masas tumorales recidivantes no mostró diferencias significativas entre los animales del grupo tratado y los del control (1,8 vs. 2,0 cc, $p = 0,89$) (Fig. 2B).

Efecto del ATRA sobre la evolución tumoral a distancia

Para el estudio de la diseminación de la enfermedad tumoral que se produce tras la resección del tumor primario, así como la influencia del tratamiento con ATRA en dicho proceso, se procedió, por un lado, al análisis de la invasión neoplásica locorregional a nivel inguinal y retroperitoneal, y por otro lado, al estudio de la invasión a distancia mediante el análisis de la incidencia de infiltración tumoral pulmonar, así como a la cuantificación del número de focos pulmonares.

En cuanto a la evolución de la enfermedad a nivel locorregional, al analizar la incidencia de invasión tumoral de ganglios inguinales regionales (Fig. 3), se pudo observar que en la serie de los animales tratados con ATRA se produjo una incidencia significativamente superior que en el grupo control (86 vs. 29%; $p < 0,05$). Sin embargo, el volumen medio de las metástasis ganglionares de los animales tratados fue 6 veces menor que las de los animales del grupo control (0,2 vs. 1,2 cc; $p < 0,05$).

Por otro lado, tal como se puede observar en la figura 4, se produjo una elevada incidencia de extensión tumoral retroperitoneal tanto en el grupo control como el grupo tratado con ATRA, no existiendo diferencias significativas entre los mismos (71 vs. 67%, $p > 0,05$). Sin embargo, el tratamiento con ATRA redujo en más de 7 veces el volumen tumoral medio de las masas retroperitoneales respecto al del grupo control (0,7 vs. 5,1 cc; $p < 0,05$).

En relación a la evolución de la enfermedad a distancia, mientras en el grupo control todos los animales presentaban infiltración tumoral pulmonar, en el grupo de animales tratados con ATRA dicha incidencia se redujo en un 33% ($p < 0,05$) (Fig. 5). Además, la cuantificación del número de focos metastásicos demostró también una disminución de 5 veces en el número medio de focos pulmonares respecto al grupo control (5,7 vs. 26,7; $p < 0,05$).

DISCUSIÓN

La cirugía es la principal arma terapéutica de los tumores sólidos; de hecho, su control local depende de un tratamiento quirúrgico adecuado que asegure márgenes quirúrgicos amplios libres de tumor tras la exéresis de la lesión primaria, y de las características biológicas del propio tumor. Esto resulta especialmente cierto en los sarcomas de tejidos blandos, en los que la respuesta al tratamiento sigue siendo baja, habiéndose producido pocos avances en los últimos años (12). En este tipo de tumores es habitual la invasión local, lo que complica de forma importante la exéresis quirúrgica y da lugar a una alta tasa de recidivas locales (13). Por otra parte, el 40% de los pacientes con sarcomas de partes blandas presentan metástasis a distancia a pesar del aparente control local inicial de la enfermedad (14), siendo el grado histoló-

gico el factor más relevante. De hecho, el 81% de los sarcomas de alto grado, como los rhabdomiosarcomas, metastatizan dentro del primer año tras el tratamiento inicial (15). Siendo esto así, parece lógico que el tipo tumoral debería ser tomado en consideración a la hora de establecer el procedimiento quirúrgico y la terapia adyuvante.

Por otro lado, es preciso recordar que el proceso de invasión y metástasis está influido por múltiples interacciones bidireccionales entre las células tumorales y las células estromales, como son los fibroblastos, macrófagos, linfocitos y las células endoteliales (16,17). A su vez, estas interacciones se regulan, en gran medida, a través de factores de crecimiento (18), cuya liberación al medio se ve favorecida por el propio acto quirúrgico.

Todo ello hace preciso plantear nuevas terapias complementarias a la cirugía que intenten reducir el porcentaje del fallo del control local, mediante estrategias que sean implementadas en concomitancia con el planteamiento quirúrgico y que tengan en consideración la propia biología de las células tumorales.

Con la intención de reproducir a nivel experimental el problema clínico anteriormente señalado, caracterizado por el fallo del control local tras la cirugía de tumores sólidos y su influencia en la aparición de metástasis, decidimos utilizar la línea de rhabdomiosarcoma de rata S4MH, ya que es altamente tumorigénica y metastatizante. Como modelo de tratamiento quirúrgico realizamos una extirpación quirúrgica local del tumor primario, a la que se añadió una hepatectomía parcial, lo que en conjunto da lugar a la liberación de un importante flujo de factores de crecimiento al torrente circulatorio, permitiendo así obtener el estímulo paracrino promotor de la invasión y metástasis. De hecho, es bien conocido el papel inductor del crecimiento, motilidad e invasión de diferentes tipos de células tumorales que ejerce uno de los principales factores de crecimiento secretados tras la hepatectomía, el factor de crecimiento hepatocitario, HGF (19), a lo que hay que añadir la actividad protumoral de otros factores secretados por las células estromales de la herida quirúrgica, como el FGFb, el factor de crecimiento endotelio-vascular (VEGF), el TGF- β , interleucinas como la IL-6 e IL-8, etc (20,21).

Por otro lado, a la hora de diseñar un tratamiento complementario a la cirugía que tuviera en cuenta la influencia del grado de diferenciación en los sarcomas de partes blandas, hemos recurrido al ácido retinoico, ya que este fármaco actúa inhibiendo el crecimiento de las células tumorales a la vez que potencia su diferenciación y capacidad apoptótica (22,23). En particular, el ATRA ha demostrado su actividad antitumoral en diferentes tumores sólidos humanos, tales como carcinomas de mama (24), tumores de cabeza y cuello (25), ovario (26) y otros, sin que a las dosis utilizadas se describan efectos adversos de consideración.

En relación a la pauta de administración de este agente, consideramos la necesidad de comenzar su administración de forma previa al acto quirúrgico, y man-

tener dicho tratamiento de forma continuada, con el objetivo de producir la señalización inductora de la diferenciación de forma previa a la presencia de los factores de crecimiento liberados tras la cirugía, y de que dicha señalización permaneciese activa durante un periodo de tiempo prolongado, de tal forma que pudiéramos contrarrestar eficazmente la señal contraria a la de diferenciación celular, es decir, el estímulo proliferativo de dichos factores.

Nuestros resultados han puesto de manifiesto que este modelo presenta una alta frecuencia de recidiva local e invasión locoregional (característica de los tumores de partes blandas en clínica humana), así como la aparición de metástasis en el total de animales que constituyeron el grupo control. Así pues, se confirma la utilidad de nuestro modelo experimental a la hora de evaluar la eficacia de un nuevo tratamiento antitumoral.

El tratamiento continuo pre y postcirugía con ATRA fue bien tolerado por los animales, de forma que, si bien redujo el peso de los mismos, dicha reducción fue inferior al 15% con respecto al peso de las ratas pretratamiento.

En relación a la eficacia de la estrategia terapéutica ensayada, la adición de ATRA al tratamiento quirúrgico redujo en un 38% la aparición de recidiva local y en un 33% la presencia de metástasis pulmonares, localización preferente de asentamiento de las metástasis en la mayoría de los sarcomas (27). Dicha disminución de la capaci-

dad metastática de las células S4MH producida por el ATRA se ve reflejada no sólo en la reducción del número de animales con metástasis, sino también en la disminución a la quinta parte del número medio de focos pulmonares con respecto a los animales del grupo control. Esta reducción significativa de la masa tumoral producida por el ATRA se pudo observar también en las masas retroperitoneales, a pesar de que su frecuencia de aparición no se vio reducida.

Con respecto a la afectación ganglionar, si bien es poco frecuente (3,9-5,9%) en la mayoría de los sarcomas, en el caso del rhabdomyosarcoma dicha afectación ganglionar puede alcanzar al 36% de los pacientes (28). En nuestro modelo experimental, el 29% de los animales presentaron invasión ganglionar, porcentaje que paradójicamente se incrementó de forma significativa (86%) en los animales tratados con ATRA. Sin embargo, también en este caso se redujo (6 veces) el volumen tumoral medio en los animales tratados con ATRA respecto al de los animales control.

En conclusión, el presente estudio *in vivo* demuestra que el tratamiento con ATRA, administrado de forma conjunta con la resección del tumor primario, da lugar a una reducción de la capacidad tumorigénica del rhabdomyosarcoma de rata S4MH, lo que sugiere que la estrategia terapéutica fundamentada en el tratamiento pre y postextirpación quirúrgica con retinoides podría favorecer el control local de los tumores sólidos sometidos a cirugía.