

ESTUDIO HISTOLÓGICO DEL MELANOMA B16F1 INOCULADO EN RATONES HEMBRAS C57BL/6//BIOU TRATADOS CON LA FORMULACIÓN CYTOREG.

Rosa De Jesús, Marie Cuervo, Nelson Vicuña-Fernández, Andrés Osorio, Domingo Stea, David Martucci, Lewis Pozo, Williams Jiménez.

Departamento de Biología. Facultad de Ciencias. telefax (0274) 2403128. Mérida. Venezuela.

rosadej@ula.ve. cytozexinc@yahoo.com

Resumen

El melanoma es una neoplasia muy agresiva. A pesar del avance científico en las diferentes formas de tratamiento, para combatir dicha enfermedad como es el uso de quimioterapias y radioterapia, éstas son poco específicas, ya que pueden afectar a las células sanas circundantes al melanoma. En este trabajo se estudió el efecto de la formulación Cytoreg sobre el melanoma B16F1, inoculado en ratones hembras C57BL/6//BIOU. El estudio se realizó través del análisis histopatológico de los siguientes órganos: pulmón, hígado, bazo, corazón y piel del área del tumor, se realizó histología además de los grupos control (enfermo y tratado con INTRONA). Macroscópicamente no se observó la presencia de nódulos metastáticos. El análisis histopatológico de los tumores, reveló la presencia de tejido vivo, ubicado cerca de los vasos sanguíneos funcionales, observándose también, tejido necrótico ubicado cerca de vasos sanguíneo no funcionales. El porcentaje de tejido necrótico en los tumores presentes en cada uno de los grupos fue: de 40% para el enfermo control, de 10% para el de los animales tratados con INT A, y para el grupo de tratamiento con Cytoreg de 95%, conllevando a concluir que la formulación Cytoreg tuvo un efecto antiangiogénico sobre las células del melanoma.

Palabras claves: neoplasia, Cytoreg, histopatología, melanoma, ratón C57BL/6//BIOULA.

Abstract

Histological study of melanoma B16F1 in C57BL/6//BIOU female mice treated with Cytoreg.

Melanoma is a very aggressive type of cancer. In spite of the scientific progress on different treatments to fight the disease, like the use of chemotherapy and radiotherapy, these treatments are not specific since they can affect the healthy cells surrounding the tumor. The aim of this work was to study the effect of Cytoreg® formula on the B16F1 melanoma, which was inoculated in female C57BL/6//BIOU mice, and then a histopathological analysis of the following organs was done: lung, liver, spleen, heart and skin from the tumor area, taken from the control (with the disease and treated with INTRONA) and the Cytoreg®-treated group. According to the histopathological analysis, there was not metastasis from the B16F1 melanoma, since no metastatic nodules were found. The analysis of the tumors confirmed the presence of live tissue located near the functional blood vessels, showing also necrotic tissue located near the non-functional blood vessels. The percentage of necrotic tissue in every group was: 40% for the EC group, 10% for the tumor from animals treated with INT A, and 95% for the Cytoreg® treated group. These results allow to conclude that Cytoreg® provoked an anti-angiogenic effect on the melanoma cells.

Key words: cancer, Cytoreg, histology, pathology, melanoma, C57BL/6//BIOULA mice.

INTRODUCCIÓN.

La piel es el órgano más grande del cuerpo y está involucrado en el desarrollo del melanoma; en ella se encuentran varios tipos de células, entre éstas: los melanocitos, que se ubican en la capa basal de la piel, especializadas en la síntesis del pigmento melanina a partir de la tirosina la cual es transportada finalmente hasta las capas superiores de la piel, donde absorberá la luz visible y protegerá a las células vivas de la piel (Shulz 2005). El melanoma es un tipo de neoplasia (Beers y Berkow 1999), cuyo origen se centra en los melanocitos de la piel (Cabrera y López 2006). La producción del melanoma tiene distintas causas, entre estas la exposición a la radiación ultravioleta que provoca mutaciones a nivel del ADN, conllevando a la presencia de nevus o lunares (Acosta *et al.* 2009). Al realizar un estudio histopatológico del melanoma o de una lesión con características sospechosas se podrá observar en la muestra previamente tratada con técnicas histológicas el crecimiento descontrolado y

sin diferenciación de los melanocitos con una alta producción de melanina o ausencia de ésta (amelánicos).

Cuando el melanoma de piel, es detectado y tratado en fases tempranas existe una gran probabilidad de sanación (Martí 2003). El tratamiento del melanoma depende de la profundidad del tumor según la denominación *Clark's level*, lo cual está relacionado con la invasión del melanoma en la piel. En el nivel 1, el melanoma se encuentra confinado a la epidermis (melanoma *in situ*) y no tiene capacidad de producir metástasis, es tratado con cirugía (Wong *et al.* 1993, Sharpless y Das 1998), ésta puede ser combinada con una terapia adyuvante posquirúrgica para mantener controlada la enfermedad (Fitzpatrick 2009). Cuando el tumor se encuentra en el nivel 2: Invasión dentro de la dermis papilar, se utilizan: quimioterapia, radioterapia e interferón (Masloski *et al.* 2008). También se reconocen los niveles 3, 4 y 5: nivel 3 (invasión a la unión de la dermis reticular y papilar);

nivel 4 (invasión dentro de la dermis reticular) y nivel 5 (invasión dentro de la grasa subcutánea); para el tratamiento de estos se utilizan la quimioterapia y la radioterapia como tratamientos adyuvantes luego de la cirugía, sin embargo, éstos son poco específicos, ya que además de actuar sobre las células cancerígenas también lo hacen sobre las células sanas adyacentes, además de provocar efectos secundarios como náuseas y vómitos (Espinosa 1998). El interferón es una citosina (Abbas 2008), la cual presenta una alta actividad contra el melanoma metastásico, utilizada como tratamiento convencional, produce la apoptosis en diferentes líneas celulares tumorales y en los tumores primarios (Caraglia et al. 2005), entre sus acciones se encuentran, también, ser antiangiogénico (impide la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes), (Raffaella et al. 2002), inmunoestimulador de linfocitos T cooperadores, aumenta la actividad de células natural Killer (células NK) y estimula la diferenciación de células hematopoyéticas como linfocitos B y T, células dendríticas y NK (Menon et al. 2004, Yang et al. 2004).

Los tratamientos usados contra el melanoma han sido poco efectivos, incluso no son lo suficientemente específicos en su acción frente a las células cancerígenas, por lo que se hace necesario indagar en nuevas formas de tratamiento del melanoma que garanticen la eliminación de las células de éste y la conservación de las células sanas; ante este reto el laboratorio Cytorex International Inc. del Zulia, desarrolló una formulación química, la cual se le podría considerar como una quimioterapia alternativa contra las células cancerígenas (Kumi-Diaka et al. 2006), dicha formulación es llamada Cytoreg, definiéndose como una terapia iónica derivada de una mezcla de ácidos fuertes y débiles, ésta se caracteriza por ser un líquido transparente, de pH ácido, de bajo peso molecular, no cambia su concentración con el tiempo, no es fotosensible, puede ser administrado por vía oral, intravenosa o tópica. Los mecanismos de acción que se encuentran en estudio se han orientado bajo los siguientes supuestos: el Cytoreg bombardea la membrana de las células, con los iones de los ácidos que lo conforman alterando la carga eléctrica de la célula (tanto extra como intracelularmente) produciéndose entonces un intercambio de iones a nivel molecular, de esta forma el Cytoreg mantiene el equilibrio y regula el metabolismo de las mismas sin producir la muerte de la célula. En una célula cancerígena donde la apoptosis está inhibida, los ácidos componentes del Cytoreg aportarán iones necesarios para compensar a la célula afectada e inducir el metabolismo que activará la apoptosis de manera inmediata; adicionalmente puede actuar como estimulante del sistema inmunológico. La formulación

Cytoreg ha sido analizada en estudios pre-clínicos realizados en Cáncer Research de Europa y USA. Antes del 2001 la formulación se optimizó y actualmente se hacen estudios en modelos animales en el Bioterio de la Universidad de Los Andes (BIOULA).

En el presente trabajo se probó la efectividad de la formulación Cytoreg sobre el melanoma provocado con células de la línea B16F1 cultivadas *in vivo*, en ratones hembras C57BL/6//BIOU, tomando como parámetro de valoración la histopatología.

Este proyecto fue aprobado por el Comité de Ética del Bioterio de la Universidad de Los Andes bajo el N° Protocolo: CEBIOULA/030.

METODOLOGÍA.

Material biológico.

Se utilizaron 30 ratones hembras de la línea C57BL/6//BIOU, entre 8 a 10 semanas de edad, producidos y mantenidos en el Bioterio de la Universidad de Los Andes (BIOULA). Alimentados con ratarina comercial, tratada con temperatura de 120 °C por un minuto y suministrada a voluntad, al igual que el agua (esterilizada a 120 °C por 10 minutos). Los grupos de ratones fueron alojados en cajas T2 (26x21x24 cm) y distribuidos como se muestra en la tabla 1.

Tabla 1: Grupos experimentales usados en el estudio.

Grupo	Grupos experimentales	N° de animales	N° de animales por cajas T2
1	Sano Control (SC)	5	5
2	Enfermo Control (EC)	10	
3	Dosis 0.49 ml/kg (D1C)	10	
4	Intron A (INT A)	5	

Obtención de las células de melanoma B16F1.

Las células de cáncer de melanoma *murino* B16F1 fueron donadas por el Dr. Juan Luis Concepción, del Laboratorio de Enzimología de Parásitos de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Los Andes, Mérida. Éstas se extrajeron del tumor proveniente de un ratón C57BL/6 macho. Luego de retirar la cápsula del tumor, se succionaron las células utilizando una jeringa, éstas células se diluyeron en PBS pH 7.4 glucosilado al 0.9%. Posteriormente se llevó a cabo una disociación mecánica de las células extraídas, en una cápsula de Petri, para eliminar cualquier resto de tejido, usando jeringas de calibre decreciente, de forma continua. Eliminado el tejido se procedió a realizar el conteo de las células a inocular, en un volumen de 1 a 1 en PBS pH 7.4 glucosilado al 0.9%.

El conteo de células se realizó en Cámara de Neubauer.

Inoculación de las células cancerígenas.

El trasplante de las células se realizó mediante inocular intramuscular en el muslo posterior izquierdo, en un volumen menor a 0.1 ml contenido de 50.000 células de cáncer de melanoma *murino*. Dicha localización facilitó la replicación eficaz, fácil seguimiento y medición de los tumores. El tiempo de evaluación del crecimiento del tumor fue realizado durante 10 días post-inoculación.

Pruebas de efectividad del Cytoreg

A los 10 días post-inoculación de las células de melanoma, se procedió a la administración por vía oral de la formulación Cytoreg en una dosis de 0.49 ml/kg (dosis letal mínima, determinada en experiencias previas) (tabla 1: grupo D1C). La administración de la formulación se realizó vía intragástrica voluntaria. Al mismo tiempo se comenzó a administrar la introna A (tabla 1: grupo INTA). Ésta se administró vía intraperitoneal, tres veces a la semana con una dosis de 66 UI/μl disueltos PBS pH 7.4. Previo a la administración de los tratamientos, se realizaron las pruebas hematológicas y se pesaron los animales, esta evaluación se realizó semanalmente hasta finalizar los 15 días de tratamiento. Las pruebas fueron realizadas, también a los grupos enfermos control (EC) y al grupo control sano (SC).

Técnica histológica aplicada.

Luego de transcurrir tres semanas administrando el tratamiento, los ratones se sacrificaron en cámara de sacrificio con exceso de euforano, y se tomó para su evaluación histopatológica una proporción del corazón, el pulmón, el bazo y la extremidad afectada por el tumor. El procesamiento histológico se realizó siguiendo la técnica propuesta por Eynard et al. (2008), usando inclusión en parafina; se realizaron cortes (5-10 μm) de tejido en microtomo y se realizó coloración de hematoxilina-eosina.

RESULTADOS.

Descripción anatomopatológica de los órganos blanco del melanoma B16F1 en los diferentes grupos: controles y experimental, y del tumor.

En la observación macroscópica de los órganos que se consideran órganos blanco del melanoma *B16F1*, de forma general se puede decir que todos: hígado, pulmón, bazo y corazón, presentaron una apariencia similar en relación con su morfología y su coloración, entre los ratones del grupo de ratones sanos y los grupos de ratones enfermos, tanto el control como los tratados, a estos últimos no se les observó nódulos metastáticos.

Descripción anatomopatológico del tumor

En la figura 1 se pueden observar los tumores extraídos de los grupos de ratones tratados con la formulación Cytoreg D1C (1B) y de los controles EC (1A) e INTA (1C). En los tumores de los ratones no tratados o control enfermo (EC) y los tratados con INTA, se observaron zonas de color claro, mientras que los tumores del tratados con Cytoreg (grupo D1C), mostraron coloraciones desde grisáceas muy claras hasta un color más oscuro que llegaba a ser casi negro. En todos los tumores se observó la presencia de vasos sanguíneos que alimentaban al tumor; la forma de los tumores fue irregular y su consistencia era blanda y poco compacta al retirarlos de la cápsula que los envolvía.

Descripción histopatológica de cada uno de los órganos blancos del melanoma B16F1 en los diferentes grupos experimentales y del tumor.

En la figura 2 se observan los cortes histológicos del pulmón, en ésta se detalla que tanto el control EC como el grupo tratado con Cytoreg D1C, presentaron un parénquima sano, sin embargo, en los ratones enfermos tratados con introna se observan características de una neumonía, mostrando una zona de consolidación donde se produce una sustitución de arquitectura normal con acúmulo de células inflamatorias dentro de los alvéolos específicamente neutrófilos y un engrosamiento de los tabiques bronquiales, una bronquitis crónica de menor intensidad presentando neutrófilos.

En el resto de los órganos blanco: bazo, hígado y corazón, examinados histológicamente, todos presentaron una arquitectura conservada y sin indicios de patología.

En la figura 3 se puede observar el tejido del tumor de melanoma inducido en el muslo de los animales tratados con la formulación Cytoreg y los controles EC e INT A. En éstas se observó una clara diferenciación de dos zonas, una basofílica (de coloración morado oscuro) y otra eosinofílica (de color rosado). En los tumores de los ratones tratados con Cytoreg y en los controles enfermos y tratados con INT A, se pudo observar que el tejido vivo eran las células de melanoma, mientras que el tejido necrótico fueron células de melanoma. Las células de melanoma que lograron sobrevivir se encontraban alrededor de los vasos (flecha pequeña) que alimentaban el tumor, mientras que el resto de tejido necrótico era tejido alejado de los vasos (figuras 3A, B, C: flecha larga). El porcentaje de tejido necrótico en cada uno de los grupos involucrados, fue para el grupo EC de 40%, para el control INT A fue de 10%, y para el grupo de tratamiento D1C fue de 95%. Este porcentaje de necrosis fue determinado de acuerdo

con el tamaño de la muestra de tejido obtenido en cada tratamiento.

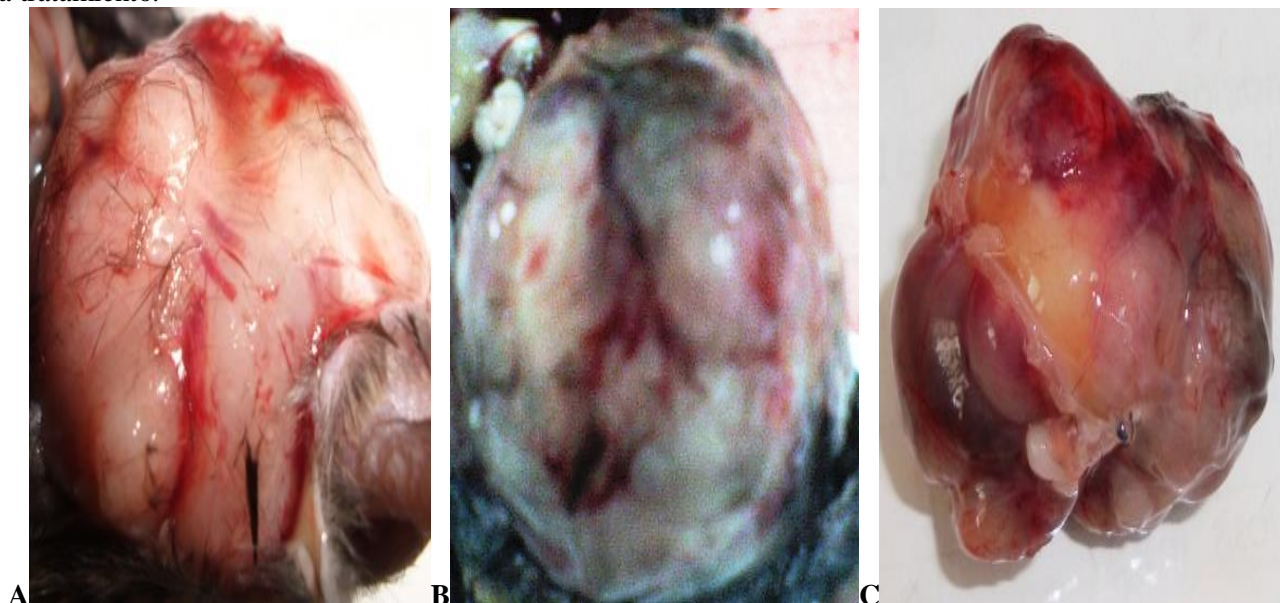


Fig. 1. Características macroscópicas del tumor de melanoma B16F1 de cada uno de los grupos experimentales: (A) Enfermo Control; (B) DIC (0,49ml/kg); (C) control INT A.

DISCUSIÓN.

El melanoma, aunque representa alrededor del 1% de todas las neoplasias y menos del 10% de los cutáneos, es el responsable del 75% de las muertes por cáncer de piel. La mayoría de las defunciones son debido a la propagación de la lesión más allá de otras partes del mismo tejido, en los tejidos vecinos llamado: invasión; y en órganos distantes llamado: metástasis (Chiang y Massagué 2008). Éste tiene la capacidad de producir metástasis en, principalmente, los pulmones y en el hígado a través de la invasión de las células cancerígenas sobre el tejido de dichos órganos, es importante por tanto, en cualquier estudio donde se pretenda observar la efectividad de cualquier formulación, observar si existe metástasis de las células del melanoma sobre los posibles órganos blancos del melanoma B16F1, tales como son: el hígado (Latarjet 2004), el bazo, en el cual altera su función de órgano linfocitario (Alvarez et al. 2008), el pulmón (Cassina et al. 2011), además del corazón (Ozyuncun et al. 2006), siendo estos últimos muy raros, sin embargo, pueden manifestarse ocasionalmente; el término de corazón melánico fue acuñado por William Norris en 1850. La afectación metastásica de melanoma en el corazón se produce frecuentemente en el miocardio con una tasa del 98%, también en epicardio y en el endocardio con tasas de frecuencia de 78% y 73% respectivamente (Kuznitsky et al. 2003). En el estudio realizado como se reportó en los resultados, no se observó, en ninguno de los órganos estudiados anatomopatológicamente, la presencia de ningún nódulo metastático, en ninguno de los grupos transplantados con las células de la línea

celular del melanoma utilizada, línea B16F1, corroborando algunos reportes bibliográficos, sobre la característica de esta línea de melanoma de tener poco potencial metastático en el nivel de los pulmones, este resultado se fortalece al no encontrarse células de melanoma en la histología realizada a estos órganos.

El tumor del melanoma presentó un aumento continuo en todos los ratones en los cuales fueron transplantadas las células del melanoma, sin embargo, el crecimiento a partir de los 10 días pos-transplante fue menor en los ratones a los cuales se les trató con la formulación Cytoreg. En el análisis histopatológico del tumor de melanoma, se observaron áreas de coloraciones negruzcas, en todos los ratones, éstas no fueron como consecuencia de la presencia de melanocitos que producen una hiperpigmentación debido a la melanina que da también un color gris o negruzco y zonas de gris muy claras, tal coloración posiblemente de acuerdo con los resultados de los cortes histológicos del tumor, fue debida a la presencia de zonas necróticas, ya que la células tumorales de melanoma observadas en los cortes fueron del tipo amelanótico que se caracteriza por la falta de pigmentación. Estas zonas necróticas presentaron distintos porcentajes de tejido necrótico, siendo casi del 95% en los ratones tratados con la formulación Cytoreg, infiriéndose entonces que este mayor porcentaje de tejido necrótico pudo ocurrir por la muerte de las células causadas por el efecto del Cytoreg sobre los vasos sanguíneos. Los espacios en los cuales se observaban células del melanoma vivas fueron las encontradas cerca de vasos sanguíneos funcionales, mientras que el tejido necrótico a pesar de presentar vasos sanguíneos, aparentemente no eran

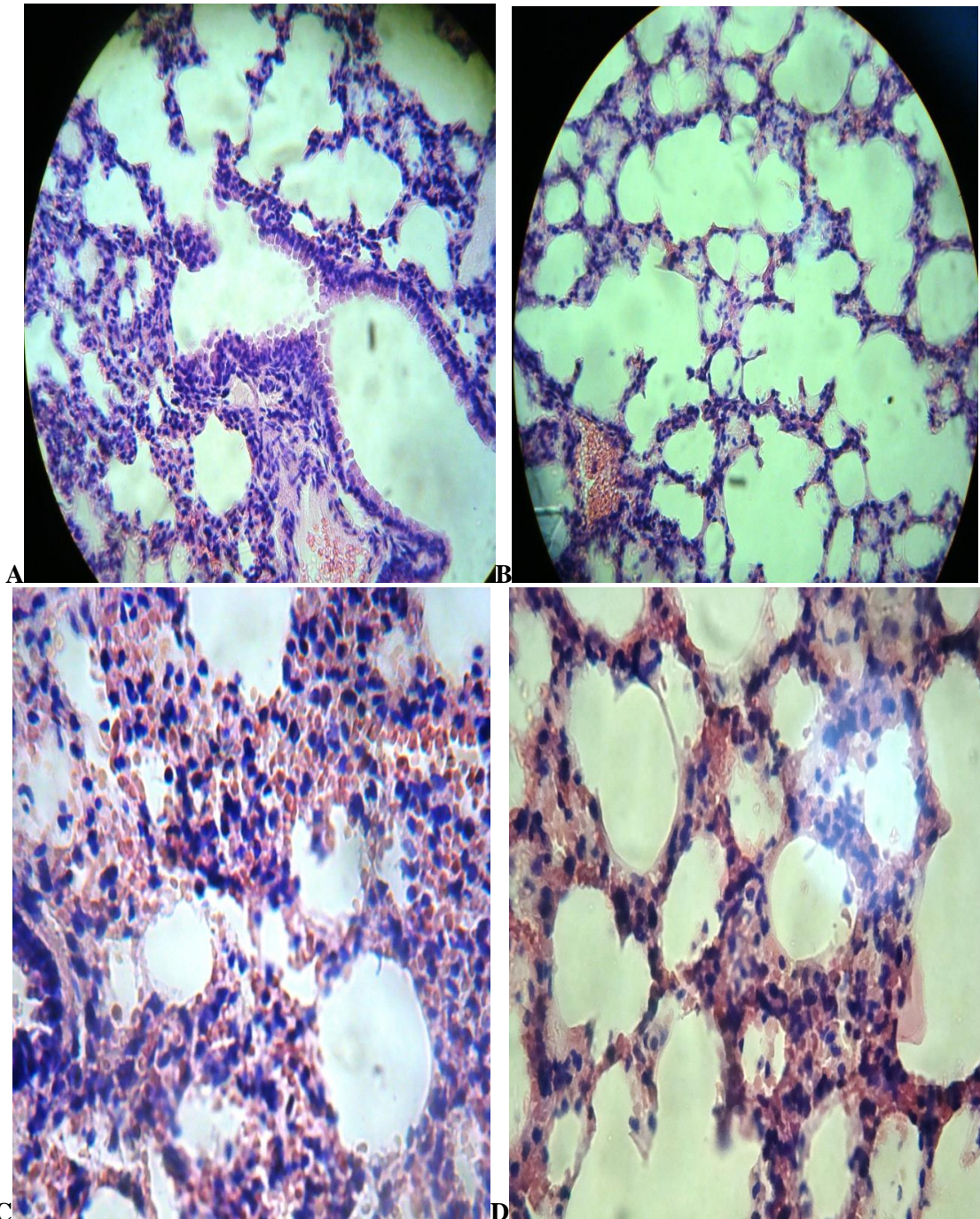


Fig. 2. Cortes histológicas del pulmón de los grupos de tratamientos (A) EC, (B) D1C, (C) INT A, (D) SC (40X; corte transversal).

funcionales, condición necesaria para la sobrevivencia de las células de melanoma, es decir, el Cytoreg estaría afectando tanto a los vasos sanguíneos como a las células tumorales.

CONCLUSIONES.

1. El estudio macroscópico evidenció la ausencia de nódulos metastásicos en órganos blancos del melanoma.
2. La histología de posibles órganos blancos (pulmón, hígado, bazo y corazón) del melanoma *B16F1*, reveló la ausencia de metástasis.

3. La histología de los tumores reveló que el grupo de ratones al cual se les administró la formulación Cytoreg, presentó un alto porcentaje de tejido necrótico con respecto a los controles.

4. El tratamiento más eficiente de acuerdo con los resultados obtenidos en el nivel histopatológico fue el del grupo D1C con 95% de necrosis, comparados con los controles EC e INT A con 40% y 10% de necrosis respectivamente.

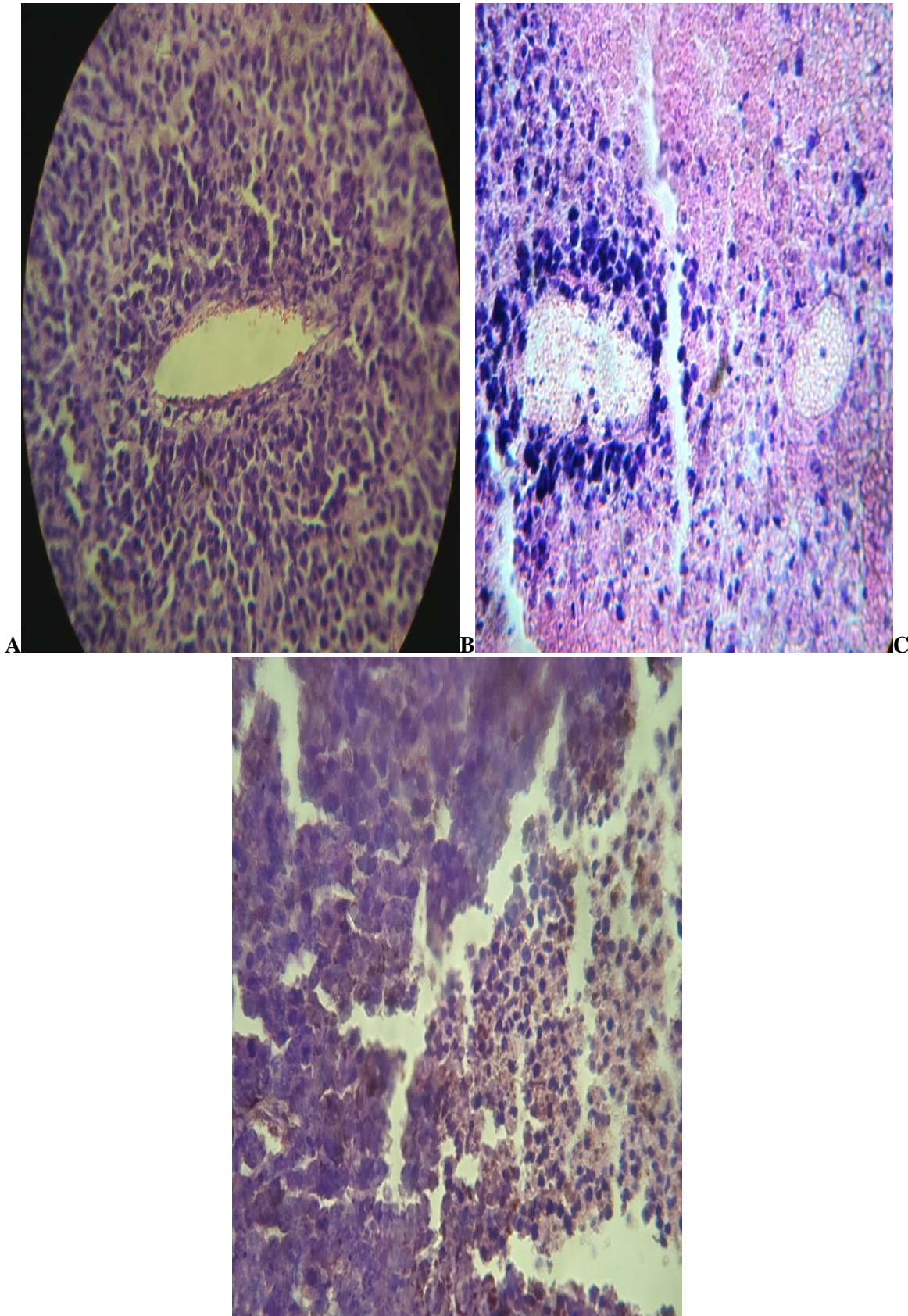


Fig. 3. Cortes histológicos del tumor de melanoma de los grupos de (A) EC, (B) D1C, (C) INT A (40X; corte transversal).

REFERENCIAS.

Abbas A, Lichtman A, Pillai S. 2008. Inmunología celular y molecular. Editorial Elsevier. Madrid. p 576.

Acosta A, Fierro E, Velásquez V et al. 2009. Melanoma: Patogénesis, clínica e histopatología. Revista AsoColDerma 17: 87-108.

Álvarez N, Martínez C, Ortega V. 2008. Efectos del IFN alpha y la diosmina en el melanoma

metastásico pulmonar murino paper interferon. *Repatología*. 41: 123-129.

Cabrera C, López M. 2006. Efectos de la radiación ultravioleta (UV) en la inducción de mutaciones de p53 en tumores de piel. *Oncología*. 29: 291-298.

Caraglia M, Marra M, Pelaia G et al. 2005. Alpha-interferon and its effects on signal transduction pathways. *Cell Phyiol*. 202: 323-235.

Cassina J, Gallardo A, Valbuena J et al. 2011. Intususcepción intestinal secundaria a metástasis de melanoma. Caso Clínico. *Rev Chil Cir*. 63:194-199.

Chiang A, Massagué J. 2008. Molecular Basis of Metastasis. *Nengl J Med*. 360: 359-426.

Díaz S, Salguero M, Jiménez J. 2011. Muerte súbita por metástasis de melanoma en aurícula derecha. Revisión de los tumores cardiacos. *Cuad Med Forense*. 17: 13-20.

Eynard A, Valentich M, Rovasio R. 2008. Histología y embriología del ser humano. Bases celulares y moleculares. Editorial Médica Panamericana. ISBN: 9789500606028. p 654.

Fitzpatrick T. 2009. Dermatología en medicina general. Editorial Médica Panamericana.

Kuznitzky R, Garay I, Kurpis M. 2003. Melanoma amelanótico. *Rev Med Cutánea Ibero-Latino-Americana*. 31: 202-205.

Kumi-Diaka J, Hassanhi M, Brown J et al. 2006. Cytoreg® inhibits growth and proliferation of human adenocarcinoma cells via induction of apoptosis. *Journal of Carcinogenesis*. 5:1.

Latarjet M, Ruiz A. 2004. Anatomía Humana. Editorial Médica Panamericana. Distrito Federal. México. p 67-89.

Martí R. 2003. Tratamiento del melanoma metastásico. *Piel*. 18: 216-228.

Masloski J, Piat G, Lujan A et al. 2008. Melanoma. *Revista de Postgrado de la Cátedra de Medicina*. Buenos Aires.183:

Menon Y, Cucurull E, Reisin E et al. 2004. Interferon alpha-associated sarcoidosis responsive to infliximab therapy. *Am J Med Sci*. 328: 173-175.

Ozyuncu N, Menekse S, Altin T et al. 2006. Cardiac metástasis of malignant melanoma: a rare cause of complete atrioventricular block. *Europace*. 8: 545-548.

Quiñones B, Urbina E, Pérez M. 1994. Acción del Piroxicam en ratones hembras cepa C57BL6 con Melanoma B16F1. *Med-ULA, Revista de la Facultad de Medicina, Universidad de Los Andes*. 3: 47-52.

Raffaella R, Gioia D, De Andrea M et al. 2004. The interferon-inducible IFI 16 gene inhibits tuve morphogenesis and proliferation of primary, nut not HPV16 E6/E7-immortalized human endotelial cells. *Exp Cell Res*. 293: 331-345.

Roitt I, Staff W, Delves P. 2003. Inmunología. Fundamentos. Editorial Panamericana. Distrito Federal. México. p 456.

Ross M, Pawlina W. 2007. Histología: texto y atlas color con biología celular y molecular. Editorial Médica Panamericana. Distrito Federal. México. p 67-98.

Shulz W. 2005. Molecular biology of human cancers. An advanced student's textbook. Editorial Springer Science. United States of America. p 25-40.

Yang H, Dithmar S, Grossniklaus H. 2003. Interferon alpha 2b decreases hepatic micrometastasis in a murine model of ocular melanoma by activation of intrinsic hepatic natural killer cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 45: 2056-2064.

Recibido: Aceptado: