

Modelo de Linfoma murino L5178Y en Fase Sólida

OROZCO-BAROCIO, Arturo, PEREGRINA-SANDOVAL, Jorge y VELAZQUEZ-MAGAÑA Salvador

Universidad de Guadalajara. Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA). Camino Ramón Padilla Sánchez 2100, Nextipac, 44600 Zapopan, Jal

Recibido Enero 13, 2017; Aceptado 01 Marzo, 2017

Resumen

El ratón de laboratorio es un modelo importante para abordar las preguntas de la Biología del cáncer. En los últimos años, las preguntas se han vuelto más refinadas, y los modelos de ratón se están utilizando cada vez más para desarrollar y probar la terapéutica del cáncer. Así, la necesidad de modelos de ratones más sofisticados y clínicamente relevantes ha crecido, al igual que la necesidad de herramientas innovadoras para analizarlas y validarlas. En este estudio se presenta un modelo de Linfoma sólido a partir del Linfoma Murino L5178Y de origen ascítico, que permite establecer estados de inmunosupresión del ratón y nos permite valorar sus constantes fisiológicas, y parámetros inmunológicos para conocer la biología del Linfoma y probar fármacos de interés con propiedades inmunoestimulantes y quimioterapéuticas.

Modelo de cáncer en ratón, Linfoma, Inmunosupresión, L5178Y

Abstract

The laboratory mouse is an important model for addressing questions in cancer biology. In recent years, the questions have become more refined, and mouse models are increasingly being used to develop and test cancer therapeutics. Thus, the need for more sophisticated and clinically relevant mouse models has grown, as has the need for innovative tools to analyze and validate them. In this study we present a model of solid lymphoma from the Murine Lymphoma L5178Y of ascitic origin, which allows to establish states of immunosuppression of the mouse and allows us to evaluate its physiological constants and immunological parameters to know the biology of lymphoma and to test drugs of interest with immunostimulating and chemotherapeutic properties.

Mouse cancer models, Lymphoma, Immunosuppression, L5178Y

Citación: OROZCO-BAROCIO, Arturo, PEREGRINA-SANDOVAL, Jorge y VELAZQUEZ-MAGAÑA Salvador. Modelo de Linfoma murino L5178Y en Fase Sólida. *Revista de Ciencias de la Salud*. 2017. 4-10: 23-35.

*Correspondencia al Autor (Correo Electrónico: arorozcob@prodigy.net.mx)

† Investigador contribuyendo como primer autor.

Introducción

El uso de modelos de ratón en la investigación del cáncer ha proporcionado una visión excepcional de la biología y la genética de los cánceres humanos. Los ratones tienen las manifestaciones consistentes de la enfermedad, tienen camadas de buen tamaño y son fáciles de manejar, incluso genéticamente (Frese, et al 2007; Malumbres, 2015). La secuenciación genómica de los ratones ha revelado la magnitud de la similitud con otros mamíferos incluyendo el hombre (Mestas, et al 2004). Estos estudios genómicos, junto con el refinamiento en las técnicas de ingeniería genética, han aumentado grandemente el valor de los modelos del ratón en la investigación sobre cáncer y muchos otros trastornos humanos (Abate-Shen, et al 2014; Malumbres, 2015).

A pesar de su amplio uso en la investigación del cáncer, una cierta cantidad de escepticismo sobre su valor y relevancia para el cáncer humano está presente en la comunidad clínica y científica. Esto es probablemente debido a las diferencias entre los ratones y los seres humanos, los científicos son conscientes de que los modelos de ratón necesitan ser refinados aún más (Haley, 2003; Mestas, et al 2004).

Indudablemente estos sofisticados modelos de ratón alimentarán nuestra comprensión de la iniciación del cáncer, los roles del sistema inmunológico, la angiogénesis, invasión y metástasis tumoral, y la relevancia de la diversidad molecular observada entre los cánceres humanos (López-Lastra, et al 2017; Malumbres, 2015; Zitvogel, et al 2016). Es necesario recordar que los modelos de ratón son sólo eso, modelos. Ellos están destinados a complementar, no a reemplazar, los estudios realizados en humanos.

Sin embargo, estos modelos ofrecen oportunidades únicas para investigar los mecanismos biológicos del cáncer y optimizar el desarrollo de drogas antineoplásicas basadas en sistemas experimentales en los que se puedan estudiar las relaciones entre las células malignas y las células inmunológicas (Drake, 2013; Malumbres, 2015; Zitvogel, et al 2016).

La gran cantidad de investigación hecha en ratones ha permitido generar técnicas, métodos y estrategias para entender más la biología del cáncer, estas incluyen: a) Modelos de ratones genéticamente modificados (GEM), b) Modelos de cáncer trasplantado y c) Modelos de cáncer inducidos por carcinógenos. Cada uno de estos modelos presenta ventajas y desafíos (Zitvogel, et al 2016; Teicher, 2006; Marks, 2015).

Los más comúnmente usados son los modelos de cáncer trasplantado que incluyen diversos sistemas y técnicas para propagar los tejidos tumorales en diferentes hospederos para estudios controlados in vivo. Consisten en la inoculación de células cancerosas que pueden ser originadas del mismo ratón, conocidos como trasplantes allogénicos, o inoculación en ratones de células cancerosas de otra especie, principalmente del humano, a estos se les llaman trasplantes xenogénicos (Frese, et al 2007; Marks, 2015; Zitvogel, et al 2016).

Los primeros modelos de tumores in vivo fueron desarrollados a mediados de los años 60, estos modelos fueron leucemias murinas desarrolladas de forma ascítica. Estos bioensayos permitieron estudiar la distribución anatómica, la proporción de la proliferación de las células leucémica y los efectos de la quimioterapia en ratones con tumor, basados en el principio de que la sobrevivencia de los ratones con leucemia tratados con un fármaco se fundamentaba en la muerte y no en la inhibición del crecimiento de la población de células tumorales (Teicher, 2006; Waud, 1998).

La intención de desarrollar modelos de tumores sólidos en ratones fue para medir la eficiencia de fármacos que retrasaran o inhibieran el crecimiento del tumor, en dosis que produjeran toxicidad tolerable por el tejido normal y que la repuesta del tumor al tratamiento se pudiera observar durante un periodo relativamente largo (Polin et al, 2011; Teicher, 2006).

Los cánceres no sólo consisten en células tumorales, sino que comprenden una variedad de tipos de células que juntos forman el microambiente tumoral. Las células inmunes infiltradas son de especial interés debido a su papel paradójico en la progresión del cáncer. Mientras que algunas poblaciones de células inmunes tienen propiedades pro-tumorigénicas otras contrarrestan la tumorigénesis (de Viser et al, 2015; Polin et al, 2011). Muchos tumores son caracterizados por un microambiente tumoral inmunosupresivo, que lo hace desfavorable para la inmunidad antitumoral. Para establecer la inmunidad antitumoral efectiva, los antígenos asociados al tumor necesitan ser mostrados y procesados por Células Presentadoras de Antígeno (APCs por sus siglas en inglés).

Estos antígenos hacen madurar a las APCs que migran a los órganos linfoides que drenan el tumor donde los antígenos son presentados a las Células T. Estas células activadas, proliferan y migran hacia el tumor donde ellas ejercen su función citotóxica (DeNardo et al 2007; Hannahan et al 2012). Los tumores frecuentemente muestran un reclutamiento y activación disfuncional de las Células Dendríticas (DCs por sus siglas en inglés), que son las APCs más eficaces para iniciar las respuestas inmunitarias. Se ha observado que en algunos tumores las DCs presentan fenotipos inmaduros no activados (Pinzon-Charry et al, 2005).

Los factores derivados del tumor parecidos a Interleucinas 6 y 10 (IL-10, IL-6), Factor Estimulante de Colonias 1 (CSF1) y el Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) interfieren con la maduración de la DCs, causando la falla para migrar a los órganos linfoides que drenan el tumor, impidiendo proporcionar las adecuadas señales Co-estimuladoras necesarias para estimular las Células T (Pinzon-Charry et al, 2005; Kersten et al, 2015). Además de esta obstaculización, las Células T activadas ven interrumpido su acceso a la masa tumoral por la desorganización y deterioro de la vascularización y la expresión de moléculas de adhesión en las células endoteliales (Shrimali et al, 2010). Otros factores que promueven la inmunosupresión en individuos con tumor son IL-3, IL-4, Factor de Crecimiento Tumoral beta (TGF β), el Interferón gamma (IFN γ) y la prostaglandina E2 que inhiben las funciones de las Células T, las respuestas humorales y las actividades de las Células Asesinas Naturales (NK) (Aso et al, 1992; Daneri-Navarro et al; Walker et al, 1992).

Objetivos

Objetivo General

Establecer un modelo de inmunosupresión de Linfoma Murino en Fase Sólida con el Linfoma Murino L5178Y que crece de forma ascítica, que nos permita valorar la sobrevida del ratón, las constantes hematológicas y bioquímicas, estimar pruebas inmunológicas y el desarrollo del tumor in vivo, así como evaluar la utilización de nuevas sustancias con propiedades antitumorales e inmunomoduladoras.

Objetivos Específicos

- Establecer la zona más adecuada para implantar el Linfoma murino L5178Y ascítico.
- Conocer el tiempo de sobrevida de los ratones con el linfoma en fase sólida.

- Valorar el desarrollo del tumor en ratones inoculados con el linfoma en fase sólida.
- Estimar la Respuesta Inmune Adaptativa de tipo Celular mediante el Índice de Proliferación de los esplenocitos de ratones sanos y con linfoma en fase sólida.
- Medir las concentraciones de los niveles séricos de la Interleucinas: Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF α), Interferón gamma (IFN γ) e Interleucina 2 (IL-2) de ratones sanos y con linfoma en fase sólida.
- Establecer los valores de los parámetros bioquímicos en suero de ratones sanos y con linfoma en fase sólida.
- Analizar las diferencias histopatológicas del tejido muscular con el Linfoma murino.

Material y Métodos

Ratones

Los ratones de la cepa Balb/c machos de 6 a 8 semanas de edad y con un peso de 22 a 25 g, fueron alojados y mantenidos en condiciones normales del laboratorio con ciclos de luz-obscuridad de 12/12 h con acceso libre a comida y agua estándar para roedores de acuerdo a las directrices para el uso y cuidado de animales de laboratorio de la World Medical Association Declaration of Helsinki (emanada por la 52nd WMA General Assembly, Edinburgh, Scotland, October 2000). Los protocolos del uso de animales fueron aprobados por el Comité de Ética del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (U de G).

Línea celular del Linfoma murino L5178Y

La línea celular del Linfoma Murino L5178Y fue derivada de un linfoma murino de origen tímico de los ratones de la cepa DBA/2 (h-2D/d), y fue mantenido en forma ascítica por inoculación intraperitoneal (i.p.) de 1×10^6 células semanalmente en ratones singénicos Balb/c (h-2D/d) (Fischer et al, 1957; McKinzie et al, 2017; Puebla-Pérez, et al 1998).

Establecimiento de la zona anatómica de inoculación del Linfoma en Fase Sólida

Se tomó 1 ml de células del Linfoma Murino L5178Y por punción peritoneal de un ratón con linfoma ascítico, de forma estéril, se lavaron y centrifugaron 3 veces con 5 ml de Solución Balanceada de Hanks's estéril a 1500 rpm. Se concentraron las células de linfoma en una suspensión de 1×10^7 /ml de Solución Balanceada de Hanks's estéril y se inocularon 100 μ l de la suspensión celular en los ratones en distintos lugares anatómicos tanto subcutáneos (espalda, pierna y el costado) como intramusculares (músculo gastrocnemio y sacrocaudal ventral), para valorar la mejor zona que nos permitiera evaluar el desarrollo del tumor y realizar las pruebas fisiológicas e inmunológicas. Para determinar el estado de inmunosupresión de los ratones; por cada zona se utilizaron 4 ratones.

Valoración de la Sobrevida de ratones con Linfoma Murino L5178Y

La tasa de sobrevida fue evaluada in vivo en 16 ratones inoculados con 1×10^6 células de linfoma en el músculo gastrocnemio derecho; al azar se formaron dos grupos con 8 roedores cada uno. A un grupo se les trató con 100 μ l Solución Balanceada de Hanks's estéril y al segundo grupo se les trató con 10 mg/Kg de peso corporal de un extracto acuoso de *Amphipterygium adstringens* (conocido comúnmente como Cuachalalate) disueltos en 100 μ l de Solución Balanceada de Hanks's estéril. Para ambos grupos el tratamiento se inició 48 hrs después de la inoculación del linfoma, y se administró diariamente por vía oral. Los ratones fueron observados diariamente, registrando el día de muerte de cada uno de ellos. El tiempo de sobrevida fue evaluado y representado por las curvas de sobrevida de Kaplan- Meier y la estimación de riesgo (ER) fue valorada con la siguiente fórmula (Fernández, 1995):

$$ER = \frac{\frac{\text{Observados del gpo Ctrl}}{\text{Esperados del gpo Ctrl}}}{\frac{\text{Observados del gpo Gano}}{\text{Esperados del gpo Gano}}} \quad (1)$$

Valoración del desarrollo del tumor en fase sólida

Se utilizaron 2 grupos experimentales de 8 ratones cada uno. Todos los ratones fueron inoculados con 1×10^6 células de linfoma suspendidas en 100 μ l de Solución de Hank's estéril en el músculo gastrocnemio derecho. Los ratones fueron tratados 48 hrs después del inóculo con 10 mg/Kg del extracto acuoso de *Amphipterygium adstringens* disuelto en 100 μ l de Solución de Hank's estéril, para el grupo experimental y el grupo control solo recibió 100 μ l de Solución de Hank's estéril. La vía de administración fue oral, con dosis diarias por 20 días. El volumen del tumor fue medido diariamente usando un vernier electrónico (Digimatic Caliper Mitutoyo Corporation, Japan), iniciando un día antes de la inoculación del linfoma y durante el tiempo del tratamiento. El volumen del tumor (en mm^3) fue estimado mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Vol. Tumor (mm}^3\text{)} = \frac{\text{Largo} \times \text{Ancho}^2}{2} \quad (2)$$

Determinación del Índice de Linfoproliferación ex vivo

Para determinar si la Respuesta Inmune de tipo Celular, en este modelo de inmunosupresión por el Linfoma Murino, fue modificada, se utilizaron 2 grupos experimentales de 4 ratones cada uno, el grupo de ratones sanos sin tumor, y el grupo con linfoma inoculados con 1×10^6 células de linfoma suspendidas en 100 μ l de Solución de Hank's estéril en el músculo gastrocnemio derecho. Se dejó que creciera el tumor por 20 días, al término del plazo los ocho ratones se sacrificaron por dislocación cervical y se les extrajo el Bazo para realizar un cultivo primario de linfocitos. Estos son separados por un gradiente de densidad de polisucrosa (HISTOPAQUE 1083. SIGMA), mediante centrifugación diferencial.

Los linfocitos se cultivaron por 72 hrs, en una incubadora a 37° C y con el 5% de CO₂, con una densidad de 2×10^5 células por pozo, en placas de cultivo de 96 pozos (CORNING), se sembraron 6 pozos por bazo, 3 de ellos se cultivaron con medio de cultivo RPMI 1640 (SIGMA) adicionado con el 10% de Suero Fetal de Ternera, y a los 3 restantes, además del medio de cultivo se les agregó 5 mg de Concanavalina A (SIGMA), un mitógeno que estimula el desarrollo celular.

Al término del tiempo de replicación celular, se les agregaron 40 μ l de 3(4,5- dietildiazol- 2- il) 2, 5 difenil bromuro de tretazolio (MTT) disueltos en solución de buffer de fosfatos (PBS) a una concentración de 5 mg/ml) a cada pozo, se incubó durante 4 horas a 37° C y posteriormente se agregaron 160 μ l de Buffer de Lisis (SDS al 20% en N, N Dimetilformamida al 50% a pH 4.7). Posteriormente, se incubó a 37° C durante toda la noche y se leyó a 550 nm en un espectrofotómetro (Thermo Scientific Multiskan) (Hansen, et al 1989; Mossman, 1983). Se determinó el índice de Proliferación (IP) según el siguiente cociente:

$$IP = \frac{\text{Absorvancia de células con mitógeno}}{\text{Absorvancia de células sin mitógeno}} \quad (3)$$

Determinación de los niveles séricos de Interleucinas TNF α , IFN γ e IL-2

Para valorar la producción de las Interleucinas en suero, se utilizaron 2 grupos experimentales de 4 ratones cada uno, el grupo de ratones sanos sin tumor, y el grupo con linfoma inoculados con 1×10^6 células de linfoma suspendidas en 100 μ l de Solución de Hank's estéril en el músculo gastrocnemio derecho. Se dejó que creciera el tumor por 20 días, al término del plazo, a los ocho ratones, previamente anestesiados con 0.3 ml de Pentobarbital Sódico al 10%, se les obtuvo sangre por punción cardiaca y se centrifugó a 3000 rpm por 10 minutos y el suero fue colectado para detectar los niveles de TNF α , IFN γ e IL-2 mediante kits de ELISA de acuerdo a las indicaciones del fabricante (eBioscience).

OROZCO-BAROCIO, Arturo, PEREGRINA-SANDOVAL, Jorge y VELAZQUEZ-MAGAÑA Salvador. Modelo de Linfoma murino L5178Y en Fase Sólida. Revista de Ciencias de la Salud. 2017.

Identificación de los parámetros bioquímicos en suero de ratones sanos y con linfoma en fase sólida

Se utilizaron 2 grupos experimentales de 4 ratones cada uno, el grupo de ratones sanos sin tumor, y el grupo con linfoma inoculados con 1×10^6 células de linfoma suspendidas en 100 μ l de Solución de Hank's estéril en el músculo gastrocnemio derecho. Se dejó que creciera el tumor por 20 días, al término del plazo, a los ocho ratones, previamente anestesiados con 0.3 ml de Pentobarbital Sódico al 10%, se les obtuvo sangre por punción cardíaca (1 ml), se centrifugó a 3000 rpm por 10 minutos y el suero fue colectado y almacenado en congelación (-20° C) para determinar los parámetros bioquímicos.

Los índices bioquímicos que se analizaron fueron: Glucosa, Urea Sérica, Creatinina Sérica, Bilirrubinas totales, Proteínas totales (Albumina y Globulina), Alanina transaminasa (ALT) y Aspartato transaminasa (AST), en un analizador UniCel DxC 600, marca Beckman Coulter.

Estudio Histopatológico del Linfoma Murino L5178Y en Fase Sólida

Se realizaron cortes histopatológicos de los tumores con 10, 15 y 20 días de desarrollo, para lo cual se tomó una biopsia de 1 cm³ del tumor y se fijó en Formalina al 30% por 3 días. Luego se incluyeron los tejidos en parafina para enseguida hacer los cortes de 5 micrómetros de espesor, colocarlos en portaobjetos, fijarlos y teñirlos con Hematoxilina y Eosina (H-E), finalmente se observaron a 5x, y 10x de magnitudes en un microscopio de luz Carl Zeiss.

Análisis Estadístico

Para los experimentos de sobrevida se utilizarán las pruebas de Kaplan – Meier y la Estimación de Riesgo con el estadístico $Ji^2 (X^2)$, para el desarrollo del tumor se utilizó la Comparación de Pendientes con el estadístico t de Student y para las pruebas del Índice de Proliferación, los niveles de interleucinas, los valores del recuento diferencial de Leucocitos y los parámetros bioquímicos sanguíneos se utilizó el Análisis de Varianza de una vía (ANOVA), y las Diferencia Significativas Mínimas (DSM). Todos los experimentos comparados a una significancia de $p \leq 0.05$.

Resultados

Establecimiento de la zona anatómica de inoculación del Linfoma en Fase Sólida

En los ratones a los que se les inoculó el tumor de forma subcutánea (espalda, pierna y flanco lateral) no tuvieron un buen desarrollo del tumor que nos permitiera examinar su desarrollo, ya que no se presentaron formación de masa tumoral, sino que a los 10 días \pm 2, los ratones presentaban manifestaciones del tumor ascítico y a los 15 días morían. Por otro lado, los ratones inoculados intramuscularmente, sí formaron una masa tumoral que se puede medir y palpar, solo que los inoculados en el músculo sacrocaudal ventral, a los 8 días se quedan inválidos de los cuartos traseros, parece que hay metástasis a la medula espinal.

Por el contrario, los ratones con la inoculación en el músculo gastrocnemio nos permite evaluar su desarrollo en volumen y valorar el daño sistémico sin que tenga metástasis a peritoneo por un tiempo suficiente (35 días) para su evaluación fisiológica e inmunológica, antes de morir. Por lo que las demás pruebas se realizaron en los ratones inoculados con 1×10^6 células del linfoma en el músculo gastrocnemio.

Estimación de la Sobrevida de ratones con Linfoma Murino L5178Y

La sobrevida de los ratones inoculados con 1×10^6 células de Linfoma Murino L5178Y en el músculo gastrocnemio derecho fue de 31 días, con un promedio de 28 días ($n = 8$), iniciando a morir el día 25 de desarrollo del tumor y muriendo, el último de los ratones, el día 31 (Fig. 1). Este modelo nos permite valorar la sobrevida y la estimación de riesgo de morir de los ratones, y nos permite evaluar los efectos de algún fármaco que quisiéramos probar como anticanceroso.

Para ilustrar esta condición graficamos los datos de sobrevida de ratones tratados con un extracto acuoso de *Amphipterygium adstringens* (Cuachalalate) una planta utilizada en México en el tratamiento de cáncer gástrico y otros padecimientos, obtenidos en nuestro laboratorio (Próspero –Ponce et al, 2016). La sobrevida de los ratones tratados con 10 mg/Kg de Cuachalalate fue significativamente mayor ($p < 0.05$) versus los ratones no tratados (Tumor S/T); el promedio de vida para el grupo tratado fue de 35 días. Por otro lado, la Estimación del Riesgo, para los ratones tratados es de 3.8, veces menos riesgo de morir por el tumor que los ratones no tratados (grafico 1).

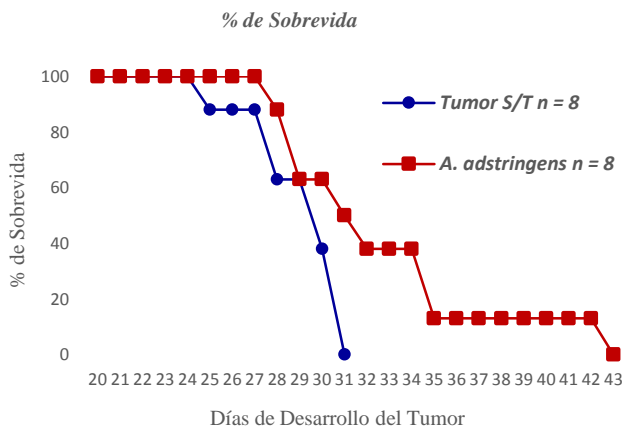


Grafico 1 % Sobrevida de ratones inoculados con 1×10^6 células de Linfoma L5178Y en fase sólida y tratados y no con 10 mg/kg de extracto acuoso de *A. adstringens* ($p < 0.05$)

Valoración del desarrollo del tumor en fase sólida

En cuanto al desarrollo del tumor, se ve claramente que el volumen del tumor crece más lento en los ratones tratados con 10 mg/kg de *A. adstringens* que el tumor de los ratones no tratados, hay una diferencia significativa ($p < 0.05$), en el desarrollo de los tumores de ambos grupos de roedores (grafico 2).

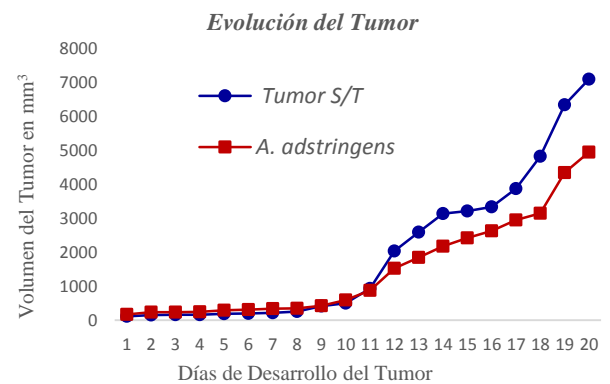


Grafico 2 Curva de desarrollo tumoral de ratones inoculados con 1×10^6 células de Linfoma L5178Y en fase sólida y tratados y no con 10 mg/kg de extracto acuoso de *A. adstringens* durante 20 días ($p < 0.05$), $n = 8$

Determinación del Índice de Linfoproliferación ex vivo

Al valorar el Índice de Proliferación observamos que el modelo de inmunosupresión del Linfoma murino L5178Y es eficaz, ya que reduce considerablemente la Respuesta Inmune de tipo Celular del ratón con Linfoma, en relación a los datos del IP del grupo de ratones sanos sin tratamiento y sin tumor, ($p=0.05$) (grafico 3)

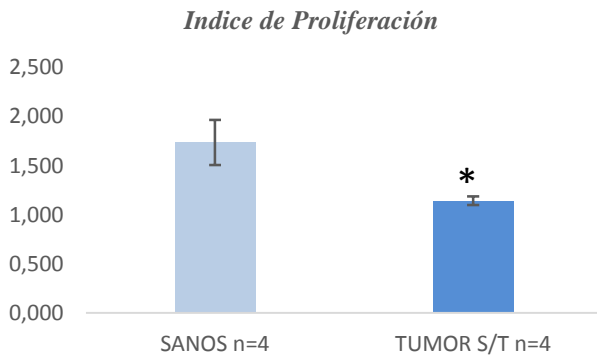


Grafico 3 Indices de proliferación de esplenocitos de ratones sanos e inoculados con 1×10^6 células de Linfoma L5178Y en fase solida con 20 días de evolución del tumor. Se grafican los promedios \pm DS. *Tumor vs Sanos ($p=0.05$)

Cuantificación de los niveles séricos de Citocinas TNF α , IFN γ e IL-2

La cuantificación de los niveles séricos de las Citocinas (pg/ml), mediante la técnica de ELISA, muestra que tanto los valores del Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF α) como los del Interferón gamma (IFN γ) están incrementados significativamente ($p < 0.05$) en los ratones con tumor. Mientras que las concentraciones de la Interleucina 2 (IL-2) son iguales en ambos grupos (Tabla 1).

Citocina	gpo Sano	gpo Tumor S/T
TNF α	38.6 \pm 1.4*	64.6 \pm 4.2
IFN γ	199 \pm 6.1*	667.3 \pm 30.6
IL-2	65.8 \pm 9	68.6 \pm 14
* $p < 0.05$ Sanos vs Tumor		

Tabla 1. Valores séricos en pg/ml de Citocinas Promedio \pm DS (n =4)

Identificación los parámetros bioquímicos en suero de ratones sanos y con linfoma en fase sólida

Los resultados de los parámetros bioquímicos se muestran en la Tabla 2. La valoración de estos fue con la intención de ver posibles daños en órganos como Páncreas, Hígado y Riñones como resultado de las posibles metástasis del Linfoma. Como se observa los valores de Glucosa sanguínea no tienen cambios en ambos grupos, ni en los valores de Urea y Creatinina sanguínea, al igual que los valores de Bilirrubinas y Proteínas totales (Albumina y Globulina); en cambio los valores de las enzimas Transaminasas ALT y AST sí se ven alteradas ($p < 0.05$).

Parámetro	gpo Sano	gpo Tumor S/T
Glucosa	56.3 \pm 11	47 \pm 2.8 mg/dl
Urea	74.3 \pm 16	71.8 \pm 14.8 mg/dl
Creatinina	0.115 \pm 0.05	0.118 \pm 0.04 mg/dl
Bilirrubinas	0.38 \pm 0.06	0.30 \pm 0.08 mg/dl
Prot Totales	4.3 \pm 0.93	4.2 \pm 1.1 g/dl
ALT	34.3 \pm 10 *	65.5 \pm 11.1 UI/L
AST	122 \pm 20 *	1585 \pm 229 UI/L
* $p < 0.05$ Sanos vs Tumor		

Tabla 2 Cambios bioquímicos séricos Promedio \pm DS (n =5)

Valoración del estudio Histopatológico del Linfoma Murino L5178Y en Fase Sólida

En los cortes histológicos (Fig. 4 a – c) se observa como las fibras musculares van perdiendo su integridad tisular, conforme avanza el crecimiento del tumor, hasta desaparecer casi completamente (Fig. 4c). Por el contrario, el infiltrado de los linfoblastos del Linfoma crece conforme pasa el tiempo de desarrollo. En la figura 5 se muestra el tejido muscular íntegro de pierna de un ratón sano y la Figura 6 muestra un frotis de Linfoblastos del Linfoma murino L5178Y en estado ascítico.

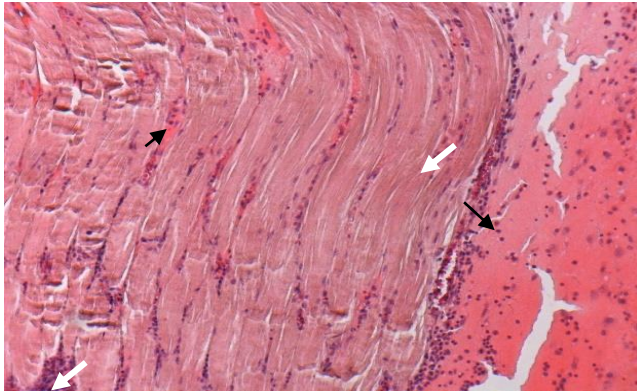


Figura 1 Corte histológico de la pierna con Linfoma L5178Y en fase sólida con 10 días de evolución del tumor (H-E, 10x). Las flechas negras indican el tejido muscular y las flechas blancas, el infiltrado linfoblástico

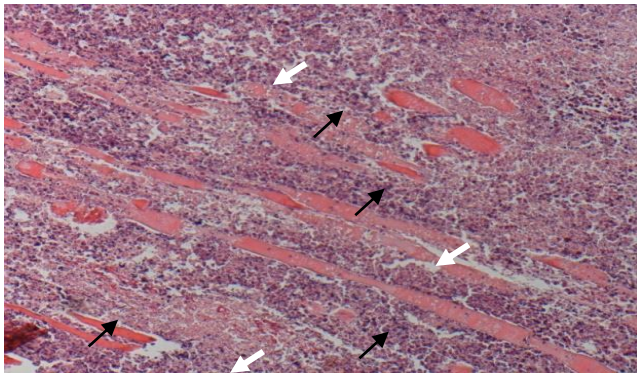


Figura 2 Corte histológico de la pierna con Linfoma L5178Y en fase sólida con 15 días de evolución del tumor (H-E, 10x). Las flechas negras indican el tejido muscular y las flechas blancas, el infiltrado linfoblástico.

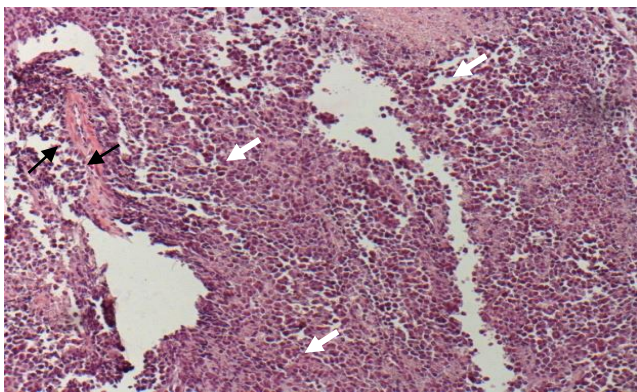


Figura 3 Corte histológico de la pierna con Linfoma L5178Y en fase sólida con 20 días de evolución del tumor (H-E, 10x). Las flechas negras indican el tejido muscular y las flechas blancas, el infiltrado linfoblástico.

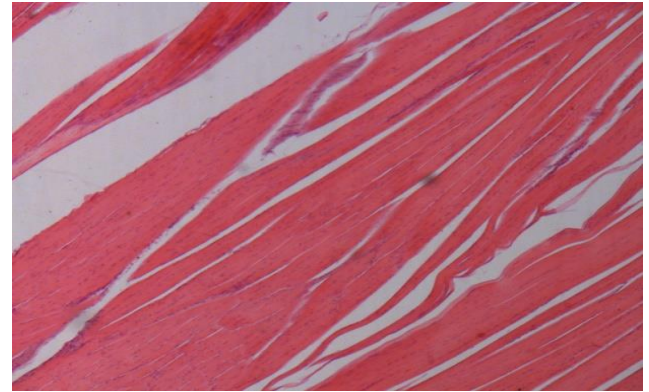


Figura 4 Corte histológico de la pierna de un raton sano (H-E, 10x). Se observan las fibras musculares íntegras

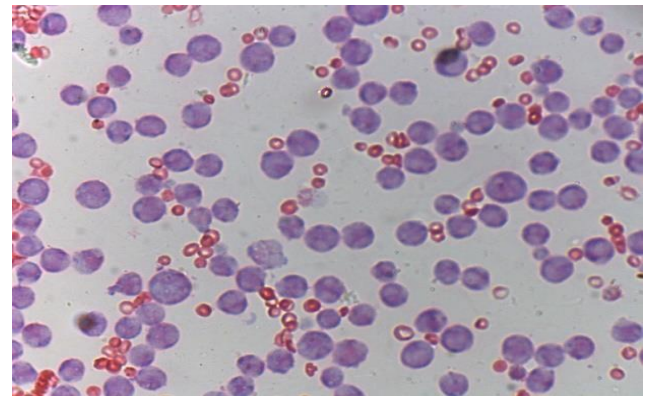


Figura 6 Frotis de linfoblastos del Linfoma Murino L5178Y en fase ascítica (H-E, 40x)

Conclusiones

El progreso en un campo dado a menudo depende en el desarrollo de modelos apropiados y precisos. En estos tiempos, la investigación del cáncer se ha enfocado a la búsqueda de tales modelos por más de 50 años. El problema principal en el desarrollo de estos modelos es que el cáncer son muchas enfermedades que surgen de casi todos los tejidos e invade a muchos más. Un avance importante para el modelo en la investigación del cáncer fue el desarrollo de tumores trasplantables de roedores (Abate-Shen et al, 2014, Malumbres, 2015; Marks, 2015).

Muchas de las primeras líneas tumorales fueron inducidas por carcinógenos, pero otras surgieron naturalmente en animales ancianos de cepas endogámicas de ratones. Estos tumores singénicos crecidos en hospederos endogámicos permitieron que se alcanzara la reproducibilidad del crecimiento del tumor, así como, la de la respuesta a agentes anticancerígenos. Estas líneas tumorales también permitieron el análisis de las metástasis tumorales en el hospedero (Frese et al, 2007; Marks. 2015; Teicher, 2011).

El origen del Linfoma L5178Y se remonta a la década de 1950 cuando sus primeros predecesores ex vivo fueron aislados de una neoplasia de ratones DBA/2 inducida por el 3-methylcholanthreno. La expansión clonal de una única célula de L5178 generó la línea de células en suspensión L5178Y (Fischer et al, 1957, Jaffe et al, 1957; Law et al, 1957; Mckinzie et al, 2017), que se ha mantenido en forma ascítica por inoculación intraperitoneal (i.p.) semanalmente de 1×10^6 células en ratones singénicos Balb/c (h-2D/d) (Daneri-Navarro et al, 1995; Puebla-Pérez et al, 1998).

El modelo ascítico del L5178Y es un buen modelo de inmunosupresión (Orozco-Barocio, 1998), pero su condición soluble permite que invada todos los órganos de la cavidad peritoneal y generar metástasis en estados tempranos, lo que impide que se puedan valorarse parámetros como la sobrevida, el crecimiento directo de la masa tumoral, elucidar el microambiente tumoral y parámetros bioquímicos e inmunológicos. En el presente estudio demostramos que el linfoma L5178Y inoculado en el músculo gastrocnemio es un buen modelo que permite evaluar la sobrevida y el crecimiento del tumor y comparar estos procesos en ratones tratados con algún fármaco de interés.

En los gráficos 1 y 2, se muestran los efectos en la sobrevida y en la disminución del crecimiento del tumor que ofrece la administración del extracto acuoso de *Amphipterygium adstringens*. Ambos procesos biológicos no se podrían valorar en el modelo ascítico de L5178Y con tanta precisión, ya que, además en este experimento se pudo estimar el riesgo de muerte de 3.8 veces más en los ratones no tratados (Próspero-Poche, 2016).

Asimismo, la valoración del Índice de Proliferación (IP) de los esplenocitos de los ratones con el linfoma L5178Y sólido, al compararlo con el IP de los linfocitos esplénicos de los ratones sanos, mostró una inmunosupresión muy evidente ($p < 0.05$), (Gráfico 3) sin tener problemas de contaminación de linfoblastos en los cultivos celulares, y permite utilizarlo como modelo de inmunosupresión para estudiar los efectos de inmunostimulación de drogas de interés como extractos de plantas medicinales entre otras (Orozco-Barocio et al, 2013; Próspero-Ponce, 2016).

El crecimiento controlado del Linfoma en estado sólido en el músculo gastrocnemio, permite hacer tomas de muestra sanguínea y determinar los valores séricos de citosinas, que muestran el estado inmunológico del individuo. Las citosinas son moléculas de señalización producidas y secretadas, principalmente por las células inmunes activadas (Li et al, 2016). La IL-2 promueve la mitosis de las células T, aumenta la función citolítica de las células asesinas naturales (NK) y ayuda en la generación de anticuerpos (Rosenberg, 2014). En los cánceres, el aumento del IFN γ y el TNF α puede mejorar las funciones inmunes y las actividades antitumorales del cuerpo. El IFN γ puede inhibir la proliferación celular y el TNF α puede inhibir y destruir directamente las células tumorales (Chen et al, 2016). En los ratones con tumor se incrementó significativamente ($p < 0.05$) la producción del IFN γ y el TNF α con respecto a los ratones sanos, por el contrario la IL-2 no tubo diferencia entre ambos grupos.

Lo que indica que las células inmunes tratan de compensar el desarrollo tumoral con la producción de estas citosinas (Tabla 1). Por otro lado, los niveles séricos de las constantes bioquímicas (Tabla 2) muestran que, los ratones con un Linfoma sólido de 20 días de evolución, no presentan daño pancreático, ni renal, en cambio los parámetros que indican un posible daño hepático, tampoco están alterados a excepción de las enzimas Transaminasa, y que tanto la ALT y la AST también son secretadas a la sangre cuando hay un daño muscular. Por otra parte, los análisis histopatológicos muestran que el tejido muscular es completamente degradado, en el tumor de 20 días de evolución (Fig 4c) y que se ve esta gradual privación en los cortes histológicos de 10 y 15 días de crecimiento (Fig 4 a y b). Este daño muscular severo puede justificar las concentraciones séricas elevadas de las Transaminasas (ALT y AST).

Finalmente se puede concluir que este modelo de Linfoma sólido es bueno para estudiar los mecanismos biológicos del desarrollo tumoral y sus interacciones con los sistemas del individuo, además de probar fármacos de interés para valorar sus propiedades inmunoestimuladoras o citotóxicas, así como quimioterapéuticas (Kersten et al, 2015; Próspero-Ponce et al, 2016; Orozco-Barocio et al, 2013).

Agradecimiento

Este trabajo se realizó con el apoyo del programa de **Fortalecimiento de Cuerpos Académicos 2015**, de la Subsecretaría de Educación Superior, Dirección General de Educación Superior Universitaria de la SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA, MEXICO. Y del apoyo de P3E de la Universidad de Guadalajara.

Referencias

Abate-Shen, C. y Politi, K. (Ed). (2014). *Mouse models of Cancer. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Aso, H., Tamura, K., Yoshie, O., Nakamura, T., Kikuchi, S. y Ishida, N. (1992). Impaired NK response of cancer patients to IFN α but not to IL-2: correlation with serum immunosuppressive acidic protein (IAP) and role of suppressor macrophage. *Microbiol Immunol* (36), 1087-97.

Berovič, M., Habijanič, J., Zore, I., Wraber, B., Hodžar, D., Boh, B. and Pohleven, F. (2003). Submerged cultivation of *Ganoderma lucidum* biomass and immunostimulatory effects of fungal polysaccharides. *J Biotechnol*. (103), 77-86.

Chen, Q., Yang, L., Han, M., Cai, E. y Zhao, Y. (2016). Synthesis and pharmacological activity evaluation of arctigenin monoester derivatives. *Biomed Pharmacother*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2016.10.093>.

Daneri-Navarro, A., Del Toro-Arreola, A., García-Velazco, J.C., Del Toro-Arreola, S., Orbach-Arbouys, S. y Bravo-Cuellar, A. (1995). L-5178-Y lymphoma associated immunosuppression in Balb/c mice. *Biomed & Pharmacother* (49), 39-44

DeNardo, D.G. y Coussens, L.M. (2007) Inflammation and breast cancer. Balancing immune response: crosstalk between adaptive and innate immune cells during breast cancer progression. *Breast Cancer Res* 9(4), 212. doi:10.1186/bcr1746.

De Visser, K.E., Eichten, A. y Coussens, L.M. (2006). Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nat Rev Cancer* 6(1), 24-37. doi:10.1038/nrc1782.

- Drake, A. (2013). Of mice and men: what rodent models don't tell us. *Cellular and Molecular Immunology*, (10), 284–285. doi:10.1038/cmi.2013.21
- Frese, K.K. y Tuveson D.A. (2007). Maximizing mouse cancer models. *Nature Reviews Cancer*, (7), 645 – 658.
- Fischer, G.A. y Welch, A.D. (1957). Effect of citrovorum factor and peptones on mouse leukemia cells L-5178 in tissue culture. *Science* (126), 1018–1019.
- Gerber, S.A., Sedlacek, A.L., Cron, K.R., Murphy, S.P. et al. (2013). IFN-gamma mediates the antitumor effects of radiation therapy in a murine colon tumor. *Am. J. Pathol.* (182), 2345–2354.
- Haley, P. J. (2003). Species differences in the structure and function of the immune system. *Toxicology*, (188), 49 – 71.
- Hanahan, D. y Coussens, L.M. (2012). Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell* 21(3), 309–22. doi: 10.1016/j.ccr.2012.02.022.
- Hansen, M.B., Nielsen, S.E. and Berg, K. (1989). Re-examination and further develop of precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *Journal Immunol Methods.* (119), 203-210.
- Jaffe, J.J., Handschumacher, R.E. y Welch, A.D. (1957). Studies on the carcinostatic activity in mice of 6-azauracil riboside (azauridine), in comparison with that of 6-azauracil, *Yale J. Biol. Med.* (30), 168–175.
- Kersten, K., Salvagno, C. y de Visser K.E. (2015). Exploiting the immunomodulatory properties of chemotherapeutic drugs to improve the success of cáncer immunotherapy. *Front. Immunol.* (6), 516. doi: 10.3389/fmmu.2015.00516.
- Law, L.W. y Shacter, B. (1957). Azaguaninedeaminase activity of several lymphocytic leukemias of mice. *J. Natl. Cancer Inst.* (18), 77–81
- Li, W., Tian, Y.H., Liu, Y., Wang, Z., Tang, S., Zhang, J. and Wang, Y.P. (2016). Platycodin D exerts anti-tumor efficacy in H22 tumor-bearing mice via improving immune function and inducing apoptosis. *J Toxicol Sci.* 41(3), 417-28. doi: 10.2131/jts.41.417.
- Lopez-Lastra, S. y Di Santo, J.P. (2017). Modeling Natural Killer Cell Targeted Immunotherapies. *Front. Immunol.* (8), 370. doi: 10.3389/fmmu.2017.00370
- Malumbres, M. (2015). Prefacio. En: Eferl, R. and Casanova, E. (Ed). *Mouse Models of Cancer. Methods and Protocols.* (pp v). Heidelberg Dordrecht, London: Humana Press Springer. ISBN 978-1-4939-2296-3 DOI 10.1007/978-1-4939-2297-0
- Marks, Ch. (2015). eMice electronic Models Information, Communication and Education. USA. National Institutes of Health (NIH). Recuperado de: <https://emice.nci.nih.gov/aam/mouse/transplantation-on-mouse-models-1>
- McKinzie, P.B. y Revollo, J.R. (2017). Whole genome sequencing of mouse lymphoma L5178Y-3.7.2C. (TK+/-) reveals millions of mutations and genetic markers *Mutation Research* (814), 1–6.
- Mestas, J. y Hughes, C.W. (2004). Of Mice and Not Men: Differences between Mouse and Human Immunology. *J Immunol*, (172), 2731-2738. doi: 10.4049/jimmunol.172.5.2731
- Mossman, M. (1983). Rapid colorimetric assay for celular growth and survival: aplication to proliferation and citotoxicity assays. *Journal Immunol Methods.* (65), 55 - 63.

Orozco-Barocio, A. (1998). Modulación de la respuesta inmune en ratones BALB/c con linfoma murino L5178Y tratados con acíbar de Aloe vera. (Tesis de Posgrado en Doctorado en Ciencias Biológicas). Universidad de Guadalajara, Zapopan, Jalisco, Mex.

Orozco-Barocio, A., Paniagua-Domínguez, B.L., Benítez-Saldaña, P.A., Flores-Torales, E., Velázquez-Magaña, S. y Arreola Nava, H.J. (2013). Cytotoxic effect of the ethanolic extract of *Lophocereus schottii*: a mexican medicinal plant. *Afr J Tradit Complement Altern Med.* 10(3):397-404. <http://dx.doi.org/10.4314/ajtcam.v10i3.2>

Pinzon-Charry, A., Maxwell, T. y López, J.A. (2005). Dendritic cell dysfunction in cancer: a mechanism for immunosuppression. *Immunol Cell Biol* 83(5), 451–61. doi:10.1111/j.1440-1711.2005.01371.x.

Polin, L., Corbett, T.H., Roberts, B.J., et al. (2011). Transplantable syngeneic rodent tumors: solid tumors in mice. En: Teicher, B.A. (Ed). *Tumor models in cancer research.* (pp 43 –78). Totowa (NJ): Humana Press, Inc.

Próspero Ponce, D.L. (2016). Estudio del efecto de los extractos acuosos de *Amphipterygium adstringens* (schlecht.) Standl, (Cuachalalate) obtenidos mediante remojo, cocción e infusión; en el modelo de Linfoma Murino L5178Y en fase sólida. (Tesis de Pregrado en Licenciado en Biología). Universidad de Guadalajara, Zapopan, Jalisco, Mex.

Puebla-Pérez, A.M., Huacuja-Ruiz, L., Rodríguez-Orozco, G., Villaseñor-García, M.M., Miranda-Beltrán, M.L., Celis, A. and Sandoval-Ramírez, L. (1998). Cytotoxic and antitumor activity from *Bursera fagaroides* ethanol extract in mice with L5178Y lymphoma. *Phytotherapy Research.* (12), 545-548

Rosenberg, S.A. (2014). II-2: the first effective immunotherapy for human cancer, *J. Immunol.* (192), 5451–5458

Ruijun, W., Shi, W., Yijun X., Mengwuliji, T., Lijuan, Z, and Yumin, W. (2015). Antitumor effects and immune regulation activities of a purified polysaccharide extracted from *Juglan regia*. *Int J Biol Macromol.* (72), 771-775 doi: 0.1016/j.ijbiomac.2014.09.026.

Shrimali, R.K., Yu, Z., Teoret, M.R., Chinnasamy, D., Restifo, N.P. y Rosenberg, S.A. (2010). Antiangiogenic agents can increase lymphocyte infiltration into tumor and enhance the effectiveness of adoptive immunotherapy of cancer. *Cancer Res.*70(15), 6171–80. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-0153

Teicher, B.A. (2011). Prefacio. En Teicher, B.A. (Ed). *Tumor models in cancer research.* (pp v -vi). Totowa (NJ): Humana Press, Inc.

Teicher, B.A. (2006). Tumor models for efficacy determination. *Mol Cancer Ther,* 5(10), 2435-2443
Walker, T.M., Yurochko, A.D., Burger, C.J. y Elgert, K.D. (1992). Cytokines and suppressor macrophages cause tumor-bearing host CD8+ T cells to suppress recognition of allogenic and syngenic MHC class II molecules. *J Leuk Biol* (2)52, 661-69.

Waud, W.R. (1998). Murine L1210 and P388 leukemias. En: Teicher B. (Ed). *Anticancer drug development guide: preclinical screening, clinical trials and approval.* (pp 59 –74).Totowa (NJ): Humana Press, Inc.

Zitvogel, L., Pitt, J.M., Daillère, R., Smyth, M.J. y Kroemer, G. (2016). Mouse models in oncoimmunology. *Nature Reviews Cancer,* (16), 759 – 753.