

Estandarización de biomodelo de cáncer de ovario con la línea tumoral MOSEC

Pérez-Cutiño M, Alonso-Remedios A, González-Palomo A, Beausoleil-Delgado I

¹Universidad de Ciencias Médicas de la Habana, ICBP “Victoria de Girón”, La Habana;

²Hospital Gustavo Aldereguía, Cienfuegos; ³Centro de Inmunología Molecular, La Habana, Cuba

Email:

RESUMEN

El cáncer de ovario es una de las neoplasias ginecológicas más agresivas y letales. La mortalidad por esta causa se atribuye directamente a la metástasis peritoneal diseminada; lo que resulta un reto para la terapia y requiere de la investigación preclínica, que hace uso de una serie de modelos para recapitular los eventos celulares y moleculares específicos que participan en el proceso de la enfermedad. Este trabajo se realizó con el objetivo de estandarizar un biomodelo de cáncer de ovario murino inducido con la línea tumoral MOSEC. Se determinó la carga tumoral óptima y la singenización de la línea tumoral mediante pases *in vivo*. A través de la expresión de marcadores de proliferación y de apoptosis se determinó el carácter agresivo de la línea tumoral. La presencia del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y el gangliósido NGcGM3 se comprobaron mediante técnicas de inmunohistoquímica. Se determinó que la carga celular de 2×10^6 células/mililitros da lugar a un prendimiento tumoral tan precoz como el día 20 del experimento y una supervivencia de 90 días. La línea singenizada permitió el acortamiento aún mayor del tiempo de prendimiento del tumor al día 10 del experimento. La línea MOSEC singenizada demostró que más del 60% de las células tumorales se encontraban en proliferación, así como la disminución a un 7% del índice apoptótico con respecto a línea original. Se concluyó que el biomodelo de cáncer de ovario murino constituye un modelo ideal de tumor de ovario avanzado por el rápido crecimiento tumoral, las metástasis peritoneales y hepática, el alto índice de proliferación y el bajo índice de apoptosis. La nueva línea singenizada MOSEC expresa los blancos tumorales EGFR y NGcGM3.

Palabras clave: MOSEC, EGFR, NGcGM3, cáncer de ovario, modelo murino.

INTRODUCCIÓN

El cáncer de ovario constituye una de las neoplasias ginecológicas más letales en el mundo. Cada año aproximadamente se diagnostican 238 700 casos nuevos y 151 900 muertes. En Cuba en el año 2014 se registró una mortalidad de 656 x 100 000 mujeres y las tasas de curaciones varían entre el 20 y el 30 % de las pacientes.

El desarrollo de modelos murinos es muy importante para la comprensión de la etiopatogenia de esta enfermedad. Existen modelos de tumor inducido por carcinógenos, por manipulación de genes, modelos de tumor de ovario de células singénicas, entre otros. El modelo murino de cáncer de ovario más utilizado, es el biomodelo con diseminación metastásica en la cavidad abdominal y grandes volúmenes de líquido ascítico, inducido con la línea celular de la superficie del ovario murino MOSEC (del inglés: *murine ovarian surface epithelial cell*).

El estudio de marcadores tumorales en este tipo de neoplasia, ha permitido encontrar no solo moléculas con valor diagnóstico, si no posibles blancos terapéuticos. El EGFR (del inglés: *epidermal growth factor receptor*) se encuentra sobreexpresado en una gran variedad de tumores de origen epitelial; como en los cánceres de ovario y de pulmón de células no pequeñas. Han sido implementadas dos variantes terapéuticas anti-EGFR: anticuerpos monoclonales (AcM) anti-EGFR e inhibidores de la actividad tirosina quinasa.

Los gangliósidos son constituyentes ubicuos de las membranas plasmáticas y están implicados en los eventos de progresión tumoral y metastización. En particular la variante N-glicolilada del gangliósido GM3 (NGcGM3) ha sido observada, con una expresión casi exclusiva en tumores humanos como en el de ovario. La sobreexpresión del EGFR y NGcGM3 se asocia con variantes de peor pronóstico y menor supervivencia, convirtiéndose en un blanco para la Inmunoterapia.

El Centro de Inmunología Molecular (CIM) cuenta con diversas terapias contra el EGFR y el NGcGM3, a partir de las cuales se pudieran diseñar estrategias de combinación contra ambos blancos tumorales que se comportan como antígenos tumorales. Sin embargo, para probar estas terapias en humanos se requieren estudios preclínicos en modelos *in vitro* e *in vivo* que simulen la enfermedad en humanos.

OBJETIVOS

General: Estandarizar un biomodelo de tumor de ovario murino con la línea tumoral MOSEC.

Específicos:

- Determinar el carácter invasivo y metastásico del nuevo biomodelo de cáncer de ovario.
- Caracterizar la expresión de los blancos terapéuticos tumorales en este biomodelo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un estudio de desarrollo, explicativo, experimental; donde se estandarizó un modelo murino de cáncer de ovario inducido con la línea celular MOSEC. Al ser un estudio experimental preclínico no es necesario aplicar los conceptos de universo y muestra pues los estudios fueron *in vitro*, mientras que los estudios *in vivo*, solo se realizaron en ratones isogénicos de la cepa C57/BL 6. Se utilizaron 37 ratones hembras C57BL/6 al azar, de 18-20 g procedentes del CENPALAB. Se siguieron los procedimientos operacionales normativos, establecidos en el centro según las regulaciones nacionales e internacionales para el manejo con animales de experimentación (PNO-2005; PNO-2006).

Se dividieron en 4 grupos: un primer grupo control al que no se inocularon células tumorales y al resto se le inocularon células tumorales con diferentes cargas en un volumen de 0.2 mL por vía intraperitoneal. Se midieron las siguientes variables: carga tumoral, peso de los animales, volumen de líquido ascítico, proliferación celular, apoptosis y expresión del EGFR y el NGcGM3.

Se midió el peso de los animales antes de la inoculación de las células tumorales (día 0) y post-inoculación tumoral cada dos días para determinar el prendimiento tumoral. Se realizó extracción de líquido ascítico en los días 36, 56, 70, 79 y 92 del experimento. Las células tumorales obtenidas se analizaron mediante marcadores de proliferación y de apoptosis por técnicas de inmunohistoquímica. Se calcularon los índices de proliferación y apoptosis según las fórmulas siguientes:

$$\% \text{ Células en mitosis} = \frac{\# \text{ Células positivas}}{\# \text{ Células Totales}} \times 100$$

$$\text{Índice apoptótico} = \frac{\# \text{ Figuras apoptóticas}}{\# \text{ Células totales}}$$

La intensidad de la expresión del EGFR y NGcGM3 se determinó a partir de una escala de valores arbitrarios, score: 0 (no inmunotinción, negativo), grado 1 (ligero, menos del 25 % de la membrana plasmática positiva), grado 2 (moderado, 25-50 %) y grado 3 (intenso, más del 50 %), mediante la fórmula:

$$\text{Total Score} = (\% \text{ ligero}) + (\% \text{ moderado}) \times 2 + (\% \text{ intenso}) \times 3$$

En una segunda etapa experimental se realizaron pases *in vivo* de las células tumorales MOSEC (singenización de la línea). Se inoculó 2×10^6 células a un animal de la cepa C57BL/6, una vez constatado el prendimiento tumoral, se extrajo líquido ascítico, el cual se inoculó a dos animales de la misma cepa, constituyendo el primer pase *in vivo*. A continuación, se realizaron dos pases *in vivo* de manera consecutiva.

El análisis estadístico de las variables, se realizó utilizando el programa Graph Pad Prism 4 Demo (San Diego, California, USA). Las diferencias significativas entre grupos se compararon con la prueba no paramétrica de ANOVA. Las diferencias se consideraron significativas si $p < 0,05$.

RESULTADOS

La carga tumoral óptima fue 2×10^6 células lo que permitió un prendimiento a partir del día 20 con una supervivencia de 90 días.

Se logró un acortamiento en el tiempo de prendimiento del tumor, del día 20 hacia el día 10 del experimento luego de tres pases *in vivo*, como se observa en la Figura (Gráfico A). El Gráfico D muestra el incremento del líquido ascítico con el tiempo, asociado a la diseminación metastásica en la cavidad abdominal.

El análisis cuantitativo de la proliferación celular arrojó que en las células MOSEC en cultivo, el 68% se encontraron en mitosis, mientras que las extraídas el día 36 tuvieron un 38% de células positivas al inmunomarcaje. Las células de la línea singenizada mostraron un índice de proliferación de 66 %. (Fotos E-H).

El índice de apoptosis resultó de un 11,4 % en las células en cultivo, un 8 % en las células obtenidas del líquido ascítico al día 36 y con los pases *in vivo* disminuyó a un 7 % (figura I-L).

El EGFR se inmunolocalizó sobre la membrana plasmática de todas las células, mostrando un patrón homogéneo de inmunotinción. En el 6,1 % de células no se observó inmunomarcaje mientras que el 93,9 % del total de células, mostró positividad con intensidades diferentes. Se

encontró que más del 50 % de las células presentaron un marcaje grado 3 (67 %) lo que traduce una sobreexpresión del EGFR. No existieron diferencias en la expresión del EGFR entre las células MOSEC en cultivo, las obtenidas del líquido ascítico el día 36 y las de la línea singenizada (figura (M-P)).

Paralelamente, la expresión del gangliósido NGcGM3 se observó en el 90 % de las células obtenidas del líquido ascítico y de la línea singenizada; no así en las células MOSEC en cultivo, figura (Q) donde más del 97 % de estas células mostraron Grado 0 (no tinción). Las células obtenidas el día 36 del experimento y la línea singenizada mostraron una expresión del NGcGM3 con intensidades diferentes, encontrando grado 1(\approx 11 %), grado 2 (\approx 40 %) y grado 3 (\approx 40 %), como se observa en la figura (R-T).

CONCLUSIONES

- El biomodelo de cáncer de ovario murino, constituye un modelo ideal de tumor de ovario avanzado con una gran similitud a la enfermedad en el humano; por el rápido crecimiento tumoral, las metástasis peritoneales y hepáticas, el alto índice de proliferación y el bajo índice de apoptosis.
- La nueva línea singenizada MOSEC expresa los blancos tumorales EGFR y NGcGM3, por lo que constituye un escenario adecuado para evaluar el efecto antitumoral de un esquema de terapia combinada contra ambos antígenos tumorales.

RECOMENDACIONES

- Obtener un modelo de ovario ortotópico en animales C57BL/6.
- Diseñar y evaluar esquemas de tratamientos combinados contra el EGFR y el NGcGM3 en el modelo de cáncer de ovario avanzado *in vivo*.

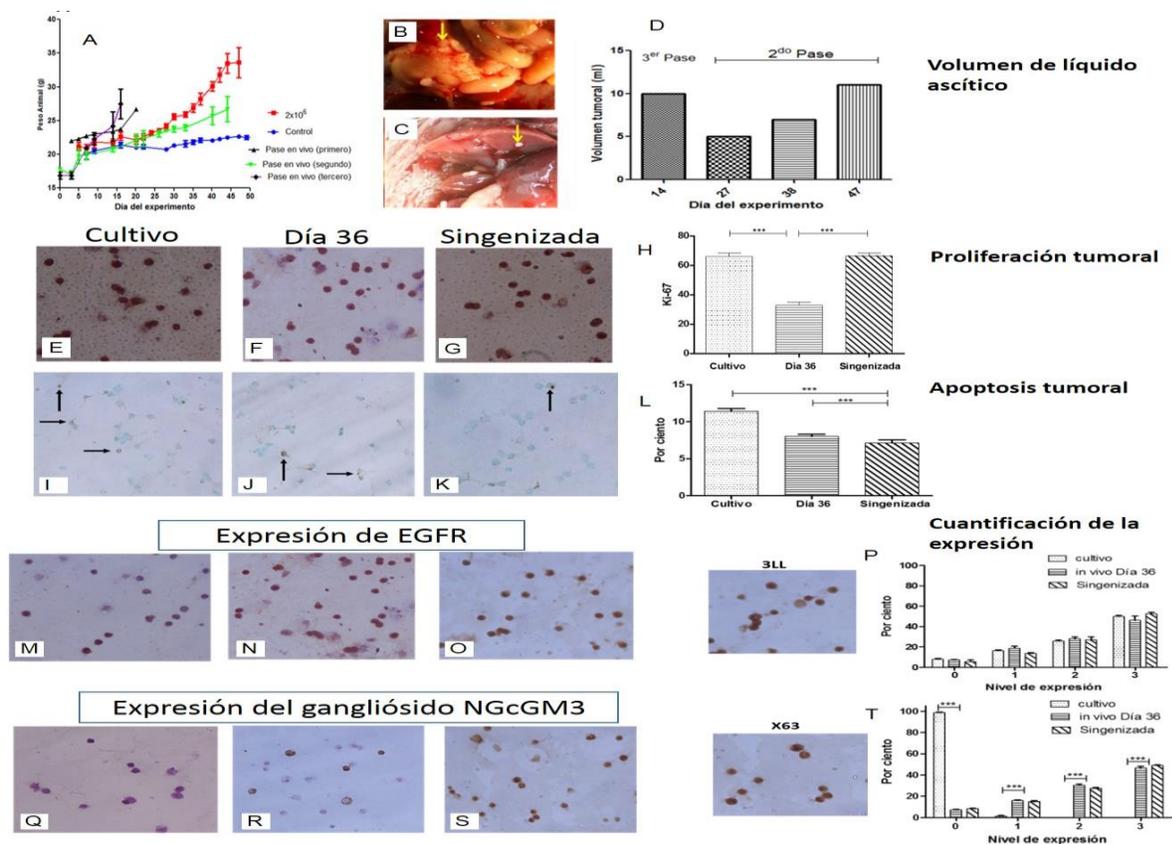


Figura. Establecimiento del modelo murino de cáncer de ovario generado con la línea celular MOSEC singenizada (Tumor no sólido). Ratones C57BL/6 inoculados con las células MOSEC (2×10^6) por vía intraperitoneal. Peso de los animales (A). Colonización metastásica en la cavidad abdominal 10 días post-inoculación tumoral (B-C). Las flechas blancas indican las metástasis. Volumen del líquido ascítico correspondiente al segundo y tercer pase de las células *in vivo* (D). **Carácter agresivo de las células tumorales MOSEC en el modelo murino del tumor no sólido (E-K).** Comparación de la proliferación (E-H) y la apoptosis (I-L) de las células MOSEC en cultivo (Cultivo), extraídas de los animales el día 36 post-inoculación tumoral (Día 36) y las células MOSEC singenizadas (Singenizada). Células tumorales positivas al inmunomarcaje con el AcM Ki67 (Proliferación, E-G) y a la apoptosis mediante el kit de ApopTag (Apoptosis, I-K). Cuantificación de la proliferación (H) y la apoptosis (L) tumoral. **La línea MOSEC singenizada expresa el EGFR y el gangliósido NGcGM3, *in vivo* (M-T).** La línea MOSEC singenizada muestra la expresión de ambos blancos tumorales. Simple marcaje mediante la técnica de inmunohistoquímica sobre células MOSEC. Inmunoreconocimiento del EGFR mediante el AcM 7A7 (M-O). Inmunoreconocimiento del NGcGM3 mediante el AcM 14F7 (Q-S). Controles positivos: EGFR (células 3LL-D122, 3LL) y NGcGM3 (P3-X63-Ag8.653, X63). Cuantificación de la expresión del EGFR (P) y el gangliósido NGcGM3 (T). Las células positivas presentan una coloración pardo-rojiza. Las fotografías mostradas en la figura son láminas representativas del inmunomarcaje de 5 animales por grupo. Cada barra en los gráficos representa la media \pm DE de 10 campos al azar. 40X

BIBLIOGRAFÍA

1. Torre L, Bray F, Siegel R, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 2015; 65: 87-108
2. Zhang M, Zhuang G, Sun X, Shen Y, Zhao A, Di W. Risk prediction model for epithelial ovarian cancer using molecular markers and clinical characteristics. *Carcinogenesis.* 2013; 34(11): 2639-46
3. Pérez K, Osorio M, Hernández J, Carr A, Fernández L. NGcGM3/VSSP vaccine as treatment for melanoma patients. *Hum Vaccin Immunother.* 2013; 9(6): 1237-40
4. Shelly D, Epari S, Arora I, Pai T, Ahmed S, Moiyadi A. Epidermal growth factor receptor (EGFR) gene amplification in high-grade gliomas: Western Indian tertiary cancer center experience. *Neurol India.* 2016; 64(1): 115-20
5. Lengyel E, Burdette J, Kenny H, Matei D, Pilrose J, Haluska P, et al. Epithelial Ovarian Cancer Experimental Models. *Oncogene.* 2014; 33(28): 3619-36