



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
THE AMERICAN BRITISH COWDRAY MEDICAL CENTER I.A.P

“XENOTRANSPLANTE DE CELULAS TUMORALES HUMANAS EN ORGANO PRIVILEGIADO DE MODELO ANIMAL: PRUEBA DE CONCEPTO.”

TESIS DE POSGRADO PARA OBTENER EL TÍTULO DE ESPECIALISTA EN CIRUGÍA GENERAL.

PRESENTA:

DR. AVI AFYA

ASESOR DE TESIS:

DR. ALBERTO CHOUSLEB KALACH

PROFESOR TITULAR DEL CURSO DE CIRUGÍA GENERAL:

DR. CESAR OSCAR DECANINI TERÁN

CIUDAD DE MÉXICO, 2019.





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

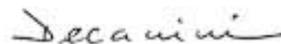
Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DR. JUAN OSVALDO TALAVERA PIÑA
JEFE DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN
CENTRO MÉDICO ABC



DR. CESAR OSCAR DECANINI TERAN
PROFESOR TITULAR DEL CURSO DE CIRUGÍA GENERAL
CENTRO MÉDICO ABC



DR. ALBERTO CHOUSLEB KALACH
ASESOR DE TESIS
CENTRO MÉDICO ABC



DR. AVI AFYA
RESIDENTE 4º AÑO DE CIRUGÍA GENERAL
JEFE DE RESIDENTES
AUTOR DE TESIS
CENTRO MÉDICO ABC



Investigadores participantes.

Dr. Avi Afya, CM ABC.

Dr. Alberto Chousleb Kalach, CM ABC.

Dr. Alejandro Zentella Dehesa, CM ABC, IIB UNAM, INCMN SZ.

Dr. César Lara Torres, CM ABC.

Agradecimientos.

A mi esposa Daniela, por ser mi motor, gracias por tu apoyo, paciencia, y siempre brindarme tu amor incondicional.

A mis padres por ser siempre ejemplos a seguir y su apoyo en todos los ámbitos a lo largo de mi carrera profesional.

Agradezco infinitamente a todos mis profesores y maestros, dentro y fuera del hospital. Por su paciencia, confianza y enseñanza, y formar parte fundamental en mi desarrollo personal y profesional.

Gracias a mis amigos y compañeros de residencia porque de cada uno de ustedes aprendí cosas muy valiosas y son parte fundamental en mi vida.

Agradecimiento especial al Dr. Alejandro Zentella, Dr. Alberto Chousleb, Dr. César Lara y a la Dra. Lucía Isaías Hernández por el esfuerzo, apoyo y dedicación en la realización de mi tesis.



México, Ciudad de México a 7 mayo 2019

DR. AVI AFYA
RESIDENTE DE CIRUGIA GENERAL

PRESENTE

Nos permitimos informarle que el Comité de Investigación y el Comité de Ética en Investigación, en sus sesiones de los días 29 y 30 de abril han revisado su protocolo de tesis:

“XENOTRASPLANTE DE CELULAS TUMORALES HUMANAS EN ORGANOS
PRIVILEGIADO DE MODELO ANIMAL: PRUEBA DE CONCEPTO.”

Con clave de registro:

TABC-19-12

El dictamen de ambos comités fué:

APROBADO PARA SU REALIZACION EN EL CENTRO MÉDICO ABC

Le recordamos que su trabajo de graduación deberá ser entregado en la División de Enseñanza e investigación a mas tardar el 10 de Agosto del presente año para que sea registrado en la UNAM antes del 20 de dicho mes.

Atentamente,

Dr. Elías Horta Bustillo

Vicepresidente Médico y Responsable Sanitario

Centro Médico ABC



Dr. José Eduardo San Esteban Sosa

Presidente del Comité de Ética en Investigación

Centro Médico ABC



CENTRO MÉDICO ABC
Campus Observatorio

Sur 136 No. 116
Col. Las Américas
01120, Álvaro Obregón, Cd. de México.
5230-8000
Licencia Sanitaria 2001003633

www.abchospital.com

Campus Santa Fe

Av. Carlos Graef Fernández 154
Col. Santa Fe
05300, Cuajimalpa, Cd. de México.
1103-1600
Licencia Sanitaria 1005001030

Centro de Especialidades ABC

En el sur:
Periférico Sur 4305
Col. Jardines en la Montaña
14210, Tlalpan, Cd. de México.
5230-3702

En el norte:
C.C. Espacio Esmeralda, L-70
Av. Jorge Jiménez Cantú M.1, L.1
Fracc. Bosque Esmeralda
52930, Atzacán, Estado de México.
5230-3831





Presupuesto destinado al protocolo de tesis

"Xenotransplante de células tumorales humanas en órgano inmunoprivilegiado de modelo animal: Prueba de concepto."

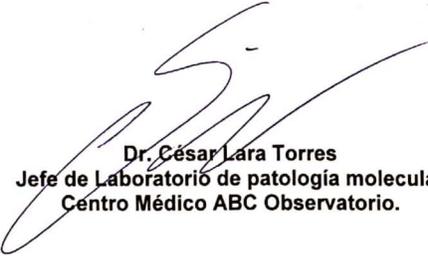
Autor principal: Dr. Avi Afya, CM ABC
Tutor: Dr. Alberto Chousleb Kalach, CM ABC
Investigadores participantes:
Dr. Alejandro Zentella Dehesa, CM ABC, IIB UNAM, INCMN SZ
Dra. Mayte Guadalupe Cervantes Badillo, IIB, UNAM
Dr. Cesar Lara Torres, CM ABC

Obtención y mantenimiento de los sujetos de experimentación:

Los animales de experimentación se comprarán del bioterio de la Facultad de Medicina de la UNAM. Todos los reactivos y materiales de cultivo serán donados y en su caso adquiridos por el laboratorio del Dr. Alejandro Zentella Dehesa del IIB, UNAM & INCMN SZ. Los materiales para los estudios de patología y análisis histopatológico se comprarán con recursos del Programa Institucional de Cáncer de Mama del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, y se realizarán en colaboración con el departamento de patología del Centro Médico ABC.

Los materiales quirúrgicos como hoja de bisturí, sutura de polipropileno 3-0, anestésicos utilizados para la inducción y mantenimiento de la anestesia, así como los materiales del laparoscopia, incluyendo la cámara, los trocares de trabajo y el CO2 utilizado para el neumoperitoneo serán proporcionados al investigador de parte del departamento de Cirugía Experimental del Centro Médico ABC, estimando un costo de \$5,000.00 pesos mexicanos.

Los costos que corresponden a la analgesia postoperatoria con paracetamol en gotas y el alimento para los animales de investigación correrán a cargo del investigador, estimando un costo de \$1,100.00 pesos mexicanos.


Dr. César Lara Torres
Jefe de Laboratorio de patología molecular
Centro Médico ABC Observatorio.

CENTRO MÉDICO ABC
Campus Observatorio
Sur 136 No. 116, Col. Las Américas, 01120, Álvaro Obregón, Cd. de México.
5230-8000 www.abchospital.com
Licencia Sanitaria 2001003633



Scanned by CamScanner



Presupuesto destinado al protocolo de tesis

"Xenotransplante de células tumorales humanas en órgano inmunoprivilegiado de modelo animal: Prueba de concepto."

Autor principal: Dr. Avi Afya, CM ABC

Tutor: Dr. Alberto Chousleb Kalach, CM ABC

Investigadores participantes:

Dr. Alejandro Zentella Dehesa, CM ABC, IIB UNAM, INCMN SZ

Dra. Mayte Guadalupe Cervantes Badillo, IIB, UNAM

Dr. Cesar Lara Torres, CM ABC

Obtención y mantenimiento de los sujetos de experimentación:

Los animales de experimentación se comprarán del bioterio de la Facultad de Medicina de la UNAM. Todos los reactivos y materiales de cultivo serán donados y en su caso adquiridos por el laboratorio del Dr. Alejandro Zentella Dehesa del IIB, UNAM & INCMN SZ. Los materiales para los estudios de patología y análisis histopatológico se comprarán con recursos del Programa Institucional de Cáncer de Mama del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, y se realizarán en colaboración con el departamento de patología del Centro Médico ABC.

Los materiales quirúrgicos como hoja de bisturí, sutura de polipropileno 3-0, anestésicos utilizados para la inducción y mantenimiento de la anestesia, así como los materiales del laparoscopia, incluyendo la cámara, los trocares de trabajo y el CO2 utilizado para el neumoperitoneo serán proporcionados al investigador de parte del departamento de Cirugía Experimental del Centro Médico ABC, estimando un costo de \$5,000.00 pesos mexicanos.

Los costos que corresponden a la analgesia postoperatoria con paracetamol en gotas y el alimento para los animales de investigación correrán a cargo del investigador, estimando un costo de \$1,100.00 pesos mexicanos.

**Dr. Alejandro Zentella Dehesa
CM ABC, IIB UNAM, INCMN SZ**

CENTRO MÉDICO ABC
Campus Observatorio

Sur 136 No. 116, Col. Las Américas, 01120, Álvaro Obregón, Cd. de México.
5230-8000 www.abchospital.com

Licencia Sanitaria 2001003633





Presupuesto destinado al protocolo de tesis

"Xenotransplante de células tumorales humanas en órgano inmunoprivilegiado de modelo animal: Prueba de concepto."

Autor principal: Dr. Avi Afya, CM ABC

Tutor: Dr. Alberto Chousleb Kalach, CM ABC

Investigadores participantes:

Dr. Alejandro Zentella Dehesa, CM ABC, IIB UNAM, INCMN SZ

Dra. Mayte Guadalupe Cervantes Badillo, IIB, UNAM

Dr. Cesar Lara Torres, CM ABC

Obtención y mantenimiento de los sujetos de experimentación:

Los animales de experimentación se comprarán del bioterio de la Facultad de Medicina de la UNAM. Todos los reactivos y materiales de cultivo serán donados y en su caso adquiridos por el laboratorio del Dr. Alejandro Zentella Dehesa del IIB, UNAM & INCMN SZ. Los materiales para los estudios de patología y análisis histopatológico se comprarán con recursos del Programa Institucional de Cáncer de Mama del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, y se realizarán en colaboración con el departamento de patología del Centro Médico ABC.

Los materiales quirúrgicos como hoja de bisturí, sutura de polipropileno 3-0, anestésicos utilizados para la inducción y mantenimiento de la anestesia, así como los materiales del laparoscopia, incluyendo la cámara, los trocares de trabajo y el CO2 utilizado para el neumoperitoneo serán proporcionados al investigador de parte del departamento de Cirugía Experimental del Centro Médico ABC, estimando un costo de \$5,000.00 pesos mexicanos.

Los costos que corresponden a la analgesia postoperatoria con paracetamol en gotas y el alimento para los animales de investigación correrán a cargo del investigador, estimando un costo de \$1,100.00 pesos mexicanos.

**Dra. Lucía Carmen Isais Hernández
Jefe de Cirugía Experimental
Centro Médico ABC Observatorio.**

Indice.

Introducción.....	9.
Marco teórico.....	10.
Objetivos generales.....	14
Objetivos específicos.....	14
Pregunta de investigación.....	14
Hipótesis.....	15
Justificación.....	15
Materiales y métodos.....	16
Resultados.....	36
Discusión.....	62
Conclusiones.....	63
Bibliografía.....	64

Introducción.

Ciertos factores son capaces de originar cáncer en un porcentaje de los individuos expuestos a ellos. Entre dichos factores se encuentran la herencia, los productos químicos, las radiaciones ionizantes, las infecciones o virus y los traumas. Los investigadores estudian cómo estos diferentes factores pueden interactuar de una manera multifactorial y secuencial para producir tumores malignos. (1) El cáncer es, en esencia, un proceso genético. Las alteraciones genéticas pueden ser heredadas o producidas en alguna célula por un virus o por una lesión provocada de manera externa. (2)

El siglo XXI se presenta como uno de los más asombrosos periodos en la historia de la humanidad. Los grandes cambios que puso en marcha la revolución industrial están llegando a su culminación. La población mundial, que se triplicó en el siglo pasado, se está estabilizando y se estima que para mediados de este siglo se quedará en unos nueve mil millones. La expectativa de vida se ha casi duplicado, la población de mayores de 65 supera el 15%, y el envejecimiento de la población ha impactado la salud pública en muchos países. (3)

La Agencia Internacional para Investigación en Cáncer (IARC) ha estimado que el año 2002 hubieron 10.9 millones de casos nuevos de cáncer y 6.723.887 muertes por cáncer en todo el globo. Estas cifras representan un incremento de 22% en la incidencia y mortalidad por cáncer en comparación con las cifras del año 1990 y según la OMS el número de casos se elevará a 15 millones para el año 2020. El Cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de mama y cáncer de la próstata conforman el 60% de todos los casos de cáncer en el mundo desarrollado; en cambio cáncer del estómago, hepatocarcinoma y cáncer de cuello uterino son tan poco frecuentes que sumados no alcanzan al 10% de los casos de cáncer en los países afluentes. (4, 5)

Es de suma importante seguir realizando investigaciones acerca del diagnóstico oportuno, y tratamiento en el cáncer. Este trabajo de investigación fue realizado con el objetivo de poder estudiar el microambiente de la implantación tumoral en órganos inmunoprivilegiados como el testículo, con la finalidad de evitar el rechazo tisular y finalmente en caso de conseguir el crecimiento tumoral, evaluar la respuesta del tumor a diferentes fármacos de quimioterapia administrados in vivo, y de esta manera abrir un panorama nuevo en la investigación en el tratamiento del cáncer.

Marco Teórico:

El cáncer es una de las primeras causas de muerte a nivel mundial, por lo que constituye un gran campo clínico para la investigación de nuevas estrategias diagnósticas y terapéuticas. Según la Organización mundial de la salud cada año se le atribuyen 8,2 millones de muertes a nivel mundial debido a esta enfermedad. Los cánceres que causan un mayor número anual de muertes son los de pulmón, hígado, estómago, colon y mama.

El aumento de la prevalencia del cáncer se debe a varios factores, entre ellos el crecimiento y el envejecimiento de la población, así como el desarrollo social y económico a nivel mundial. Esto es particularmente cierto en economías de rápido crecimiento, donde se observa un cambio de cánceres relacionados con la pobreza e infecciones por cánceres asociados a estilos de vida adaptados de países industrializados. El incremento constante de la proporción de adultos mayores en la población se traducirá en un incremento del orden del 50 % de los casos de cáncer en los próximos 20 años. Se estima que la carga mundial de cáncer ha aumentado a 18,1 millones de casos nuevos y a 9,6 millones de muertes en el año 2018. Uno de cada 5 hombres y una de cada 6 mujeres en todo el mundo desarrollan cáncer durante su vida, y uno de cada 8 hombres y una de cada 11 mujeres muere a causa de esta enfermedad. El número total de supervivencia a 5 años se estima en 43.8 millones personas en todo el mundo. (6)

El uso de modelos preclínicos es un componente central en todos los aspectos de la investigación del cáncer, desde la comprensión biológica de la enfermedad hasta el desarrollo de nuevos tratamientos. (2) El uso de modelos animales para el desarrollo de células tumorales humanas para la detección de los efectos de los fármacos comenzó en 1970, y posteriormente en un período de casi tres décadas se realizó la investigación de nuevos fármacos en modelos murinos de rápido crecimiento. En los últimos 40 años, varios estudios han establecido una metodología básica y un enfoque sistemático para las pruebas preclínicas de los agentes anticancerosos tanto in vitro como in vivo. (7)

Se han realizado distintos cultivos de líneas de células tumorales en el mundo con la finalidad de utilizarlos para el cribado y desarrollo de fármacos in vivo o in-vitro. Los xenotransplantes desarrollados mediante el crecimiento de estas líneas celulares por vía subcutánea en ratones inmunodeficientes son las plataformas in vivo más utilizadas en

el desarrollo de fármacos preclínicos en la actualidad. Estas líneas celulares convencionales, son accesibles y fáciles de usar, sin embargo a pesar de ser una herramienta de investigación común, tienen importantes limitaciones en el desarrollo de fármacos preclínicos. Lo más relevante es su falta de valor predictivo con respecto a la actividad en tipos específicos de cáncer en ensayos clínicos. (8)

Se sugiere que el proceso de generación de líneas celulares de cáncer produce alteraciones importantes e irreversibles en las propiedades biológicas del tumor, incluidas la ganancia y pérdida de información genética, la alteración en el crecimiento y las propiedades de invasión, y pérdida de poblaciones celulares específicas. Con la finalidad de evitar estos desafíos en la investigación preclínica se ha desarrollado desde 1980 la aplicación de modelos preclínicos más avanzados para el cáncer, incluido el xenoinjerto o xenotransplante de tumor derivado del paciente, así como los modelos de ratón alterados genéticamente. (9) La posibilidad de obtener células tumorales derivadas de biopsias de tumor sólido, ganglios o derrames pleurales y líquidos de ascitis ha extendido la posibilidad de realizar estudios personalizados genéticos, moleculares y farmacológicos en cultivos in vitro de estas células así como en modelos animales con xenotransplantes.

Con la finalidad de evitar el rechazo tisular de las células de cáncer derivadas del humano en los modelos animales se implementaron en la investigación clínica los xenotransplantes subcutáneos en ratones inmunocomprometidos. El primer modelo murino generado fueron los ratones de la cepa Nu/Nu que tienen una delección homóciga del gene FOXP1 que carecen de timo y de folículos pilosos por lo que también se denominan ratones desnudos. Estos ratones han demostrado estar mejor alineados con la enfermedad humana, ya que el tejido intacto que conserva la arquitectura del tumor se transfiere directamente a los ratones receptores y no se ve comprometido por la adaptación celular de manera in vitro. Los modelos con xenotransplante derivado de pacientes se han visto impulsados por mejoras significativas en el acceso a las muestras clínicas, aislamiento, caracterización y expansión in vitro y en la tecnología de trasplante para la evaluación terapéutica, ya que pueden retener la composición estromal, la heterogeneidad histológica y molecular característica de los pacientes. (10)

En relación con los trasplantes subcutáneos, las biopsias de cáncer transferidas a los mismos órganos de origen del humano al modelo animal (trasplante ortotópico) tienen más probabilidades de mantener las características microambientales del tumor que

afectan positivamente los resultados terapéuticos. Sin embargo, el trasplante ortotópico resulta técnicamente desafiante y, para la mayoría de los tipos de cáncer, el crecimiento y las respuestas del tumor deben ser monitoreados a través de imágenes longitudinales costosas y a menudo laboriosas. Por lo tanto, los estudios terapéuticos preclínicos actualmente utilizan exclusivamente la implantación subcutánea del tumor, por lo general en la región subescapular (11) El xenotrasplante derivado del paciente se realiza mediante la colocación de células tumorales de manera seriada y, dada la probabilidad de cambio con cada trasplante, los estudios terapéuticos son más representativos en los modelos donde se haya realizado el menor número de trasplantes. Además, los componentes del estroma humano se mantienen solo por 2 a 3 trasplantes, y los elementos del estroma del ratón se vuelven dominantes a partir de entonces. (12)

Para evitar el rechazo inmunológico, los cánceres humanos se comenzaron a trasplantar en ratones inmunocomprometidos. Los ratones inmunocomprometidos varían en su extensión del daño inmunológico. Los ratones NOD / SCID deficientes en IL-2R γ (cepas de NSG y NOG) son los que actualmente están en mayor utilidad y, a menudo, producen tasas de toma de muestra mejoradas. Las respuestas terapéuticas en general están probablemente influenciadas por los fenotipos inmunes dependientes de cáncer preexistentes y las respuestas inmunes provocadas por la perturbación tumoral inducida por terapia. (13)

De todos los modelos murinos, los ratones genéticamente diseñados, proporcionan la representación más completa del desarrollo del cáncer. En estos modelos se han inducido tumores que han permitido la iniciación hasta la progresión, y evolucionan conjuntamente con el estroma intrínseco, conservando un sistema inmune intacto. Sin embargo, la presencia de un sistema inmune competente no es posible estudiar la biología y la toxicología de tumores humanos xenotransplantados. Por tanto, estos modelos de cáncer son los más desafiantes ya que los resultados obtenidos con tumores murinos son difíciles de extrapolar a los tumores humanos. Sin embargo, los modelos genéticamente alterados ofrecen la única oportunidad de evaluar la administración de fármacos, la respuesta terapéutica y la expresión de biomarcadores para los cánceres que evolucionan dentro de su microambiente natural (cánceres autóctonos). Estos complejos procesos dinámicos contribuyen a las propiedades generales de la enfermedad y, en particular, constituyen una fuente de la heterogeneidad inter e intratumoral que desafía el desarrollo terapéutico exitoso. (14)

Otro aspecto crítico es la sustitución del tumor humano por el estroma murino durante el crecimiento del tumor en ratones. En diferentes estudios en los que se ha abordado este aspecto, se ha demostrado sistemáticamente que el estroma de cáncer humano incluido en las piezas tumorales implantadas se reemplaza rápidamente por estroma murino, de modo que después de tres a cinco implantes tumorales, cuando los modelos se pueden usar para las pruebas de drogas, el estroma es en esencia de origen murino. Esto incluye la matriz extracelular, los fibroblastos asociados con el cáncer, los vasos sanguíneos y las células inflamatorias y mediadoras del sistema inmunitario, como los leucocitos y los macrófagos. Este nuevo estroma murino probablemente produce cambios en la regulación parácrina del tumor, así como en propiedades físicas como la presión intersticial, que pueden limitar el estudio de agentes dirigidos contra este compartimento tumoral. (15)

En los últimos años, ha habido un creciente interés en desarrollar colecciones de xenotransplantes de células tumorales humanas en modelo animal y usarlas para diferentes aplicaciones de investigación del cáncer. Si bien han habido avances importantes en este campo, hay varias áreas cruciales que se beneficiarán de la investigación adicional. Estos incluyen temas tan diversos como los procedimientos de implantación, la consideración de la cepa del ratón, la selección del sitio y órgano del trasplante, las manipulaciones posteriores al injerto, la aplicación de las modalidades de imagen traslacional en la evaluación de modelos animales para la identificación de biomarcadores de respuesta de imagen entre otros. (16)

Se requiere amplia experiencia e infraestructura para garantizar el uso de modelos de precisión óptima y para lograr estudios preclínicos suficientemente poblados y bien controlados. (17)

Objetivo General:

Conseguir el crecimiento tumoral mediante trasplante de células tumorales humanas en testículo de rata como órgano inmunoprivilegiado con la finalidad de realizar pruebas diagnósticas y terapéuticas.

Objetivos específicos:

1. Establecer los índices de tumorigenicidad y las tasas de crecimiento tumoral de líneas celulares y cultivos primarios de células tumorales humanas en testículo de rata como órgano inmunoprivilegiado.
2. Establecer la proliferación in vivo en modelo animal de células tumorales humanas, sin necesidad de someter al animal de experimentación a procedimientos farmacológicos o manipulación genética para inducir un estado de inmunosupresión.
3. Estudiar el microambiente de la implantación tumoral en órganos inmunoprivilegiados como el testículo, con la finalidad de evitar el rechazo tisular.
4. Análisis histológico del crecimiento tumoral trasplantado en testículo de rata como órganos inmunoprivilegiados de modelo animal.
5. En caso de conseguir el crecimiento tumoral en el testículo de rata, evaluar la respuesta del tumor a diferentes fármacos de quimioterapia administrados in vivo.
6. En caso de conseguir el crecimiento tumoral, se abre el campo para realizar a futuro pruebas diagnósticas genéticas, moleculares o inmunofenotípicas.
7. Posible aplicación futura de este modelo como un antibiograma como apoyo en la terapia dirigida, evaluando in-vivo de la mejor respuesta a quimioterapéuticos u otros fármacos de elección contra células tumorales derivadas de pacientes con cáncer.

Pregunta de investigación: ¿Será posible implantar células tumorales humanas en la condición inmunoprivilegiada del testículo de rata evitando el rechazo tisular y permitiendo su proliferación y la formación de tumores, sin necesidad de alterar el microambiente tisular?

Hipótesis: La condición inmunoprivilegiada del testículo de la rata permitirá que las células tumorales humanas proliferarán adecuadamente y así mismo se evitará el rechazo tisular sin la necesidad de alterar el microambiente.

Justificación:

A pesar de grandes avances en el uso experimental de modelos animales para lograr el crecimiento de células tumorales humanas, siguen existiendo desafíos para evitar el rechazo inmunológico del xenotransplante y lograr el microambiente idóneo, con la finalidad de conseguir el crecimiento y desarrollo de células tumorales humanas. Se han realizado múltiples ensayos en animales inmunocomprometidos, como ratones atímicos o animales genéticamente alterados, sin embargo, el cuidado, seguimiento y costos de expansión y mantenimiento de estos mismos limitan el acceso y uso de estos modelos animales en muchos centros de investigación.

Es por eso que se propone en este trabajo experimental la utilización del testículo de la rata considerando este órgano como inmunoprivilegiado. Este mecanismo es atribuido principalmente a la presencia de la barrera hemato-testicular, que protege las células germinales y los injertos contra la respuesta inmune, evitando así el rechazo tisular. Además de las propiedades mencionadas de la barrera hemato-testicular, la baja capacidad de los macrófagos locales para montar una respuesta inflamatoria y la expresión constitutiva de citocinas y otros mediadores anti-inflamatorias en el testículo por células inmunes y estromales. Estas características particulares del testículo representan elementos esenciales del mecanismo responsable de la inmunosupresión local.

De esta manera se propone que al realizar el trasplante de células humanas de cáncer (xenotransplante) en el testículo de las ratas, estas no serán rechazadas, ya que la condición inmunoprivilegiada del órgano evitará que sean eliminadas mientras que el microambiente tisular permitirá su proliferación y la formación de masas tumorales sin la necesidad de utilizar modelos de inmunosupresión farmacológica o genética.

Materiales y Métodos:

Se utilizaron modelos animales correspondientes a ratas de la cepa Wistar®, con características físicas y de edad homogéneas (animales macho de 250 gramos de peso en promedio), siendo un número total poblacional de 12 ratas, de las cuales se analizaron un total de 24 testículos, en el Centro de Cirugía Experimental y Capacitación Quirúrgica del American British Cowdray Medical Center I.A.P.

Los animales de experimentación se compraron del bioterio de la Facultad de Medicina de la UNAM. Todos los reactivos y materiales de cultivo fueron donados y en su caso adquiridos por el laboratorio del Dr. Alejandro Zentella Dehesa del IIB, UNAM & INCMN SZ. Los materiales para el uso de laparoscopia y materiales quirúrgicos fueron proporcionados por parte del Centro de Cirugía Experimental y Capacitación Quirúrgica del American British Cowdray Medical Center I.A.P. Los estudios de patología se compraron con recursos del Programa Institucional de Cáncer de Mama del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.

Se obtuvieron las células tumorales para xenotransplante de la línea celular la línea celular MDA-MB-231 del tipo triple negativo obtenida del American Type Culture Collection y los cultivos primarios DSG-BC1 y 2 de tipo luminal y ECL-1 del tipo triple negativo, previamente establecidas por nuestro grupo de trabajo a partir de tumores de pacientes del centro de cáncer del centro médico ABC (protocolo ABC16-14). Se seleccionó a estos tipos de células de cáncer de mama humano por tener una alta capacidad tumorigénica e invasiva en los modelo ratones Nu/Nu.

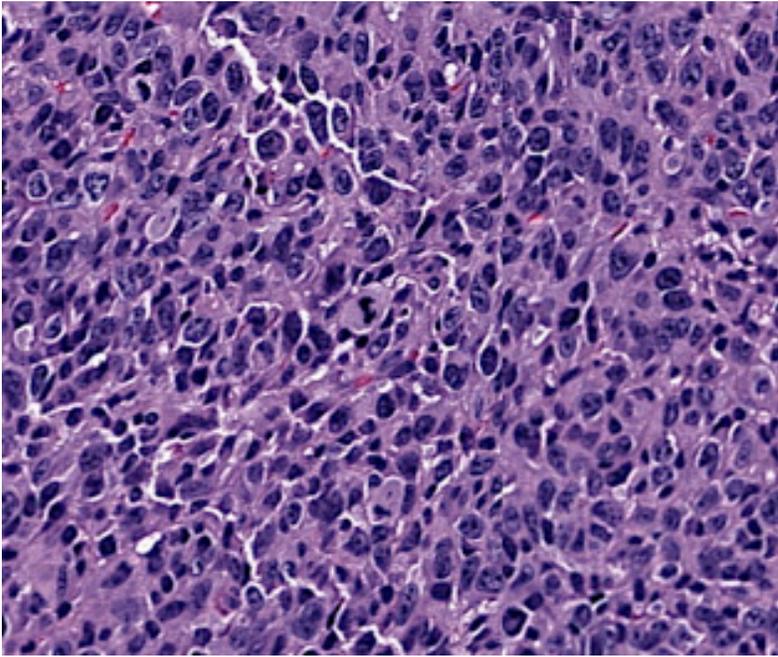


Imagen 1. *Tinción con Hematoxilina-Eosina de cepa tumoral DSG-BC1.*

Las células se crecen en medio de cultivo estéril RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino. Las células se mantienen almacenadas en estado congelado en nitrógeno líquido dentro de crio viales con 1 mL de medio de cultivo completo suplementado con 10% de dimetilsulfóxido. Los cultivos se mantienen y se expande sembrando a las células en cajas Petri de plástico estériles a una densidad inicial de 10,000 células por cm^2 y se cosechan de las cajas cuando alcanzan una densidad del 90%. Las células empleadas para los xenotransplantes deben venir de cultivos a una densidad máxima del 75% para favorecer la presencia de células en fase logarítmica de proliferación. Se prepararán suspensiones en medio RPMI 1640 sin suero fetal bovino con una densidad variable desde 0.8 hasta 20 millones de células tumorales en 0.2 ml.

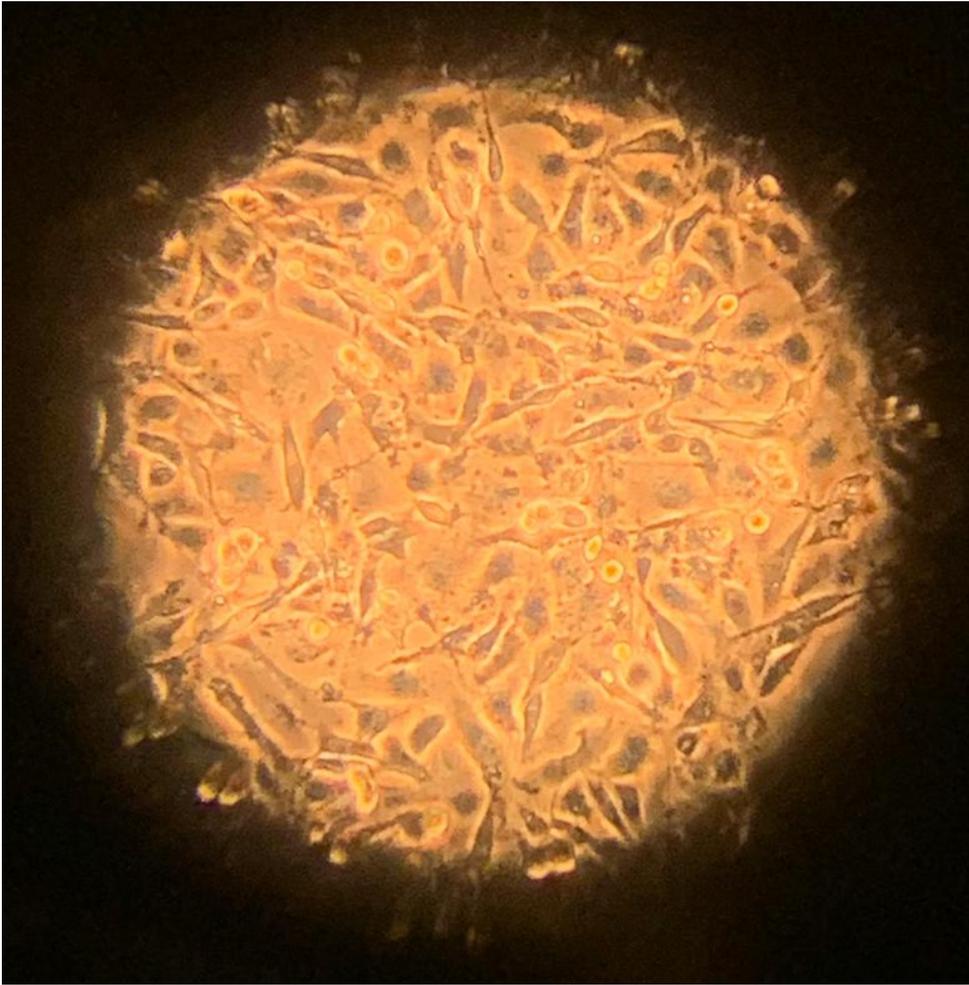


Imagen 2. *Células tumorales obtenidas mediante el cultivo celular de DSG-BC1 previa a su xenotrasplante.*

Se mantuvieron a las ratas en jaulas especializadas policarbonato con 3 animales por jaula con agua de bebedero y alimento ad libitum (pellets de alimento Chow de la marca Purina) asegurándose del adecuado suministro de alimento específico para ratas y agua, así como las adecuadas medidas de seguridad con cambio de cama cada tercer día en los anaqueles del Centro de Cirugía Experimental y Capacitación Quirúrgica del American British Cowdray Medical Center I.A.P.

Montaje de la técnica:

Se utilizaron 3 modelos animales correspondientes a ratas de la cepa Wistar®, con características físicas y de edad homogéneas (animales macho de 250 gramos de peso en promedio).

En los 3 casos se realizó tricotomía de la región por operar en abdomen desde apófisis xifoides hasta el límite con el hemiabdomen inferior incluyendo los flancos. Se infiltraron con anestésico local a base lidocaína simple a dosis de 0.5 ml intradérmicos en los sitios a incidir siendo estos en un principio epigastrio y ambos flancos.



Imagen 3. *Tricotomía y Colocación de anestesia general y local.*

Se colocaron las ratas en decúbito supino en posición de trendelemburg, fijando las patas con tela adhesiva al campo de trabajo. Se realizó antisepsia de la región por operar con Chloraprep® (Digluconato de clorhexidina 20 mg/ml / Alcohol isopropílico al 70%). Se colocaron campos estériles y posteriormente gasas estériles en la región abdominal con la finalidad de delimitar el campo quirúrgico.



Imagen 4. *Posicionamiento y fijación.*

Se accedió en la primera rata a cavidad abdominal con una incisión de 10 mm con tijeras de metzenbaum en epigastrio, disecando por planos bajo visión directa, y se introdujo trocar. Posteriormente se insufló neumoperitoneo a presión y velocidad de flujo mínimos. Se introdujo lente de laparoscopia de 10 mm y ángulo de 30° y se realizó laparoscopia diagnóstica, evidenciando ausencia de anomalía anatómicas y lesiones a órganos adyacentes. Posteriormente se colocaron 2 trocares accesorios de trabajo de 5 mm a cada lado en línea axilar anterior y a través de ellos se introdujeron pinzas Babcock y Grasper laparoscópicos.



Imagen 5. Acceso a cavidad abdominal con incisión epigástrico de 10 mm mediante técnica abierta.



Imagen 6. *Colocación de trócares de 5 mm accesorios en flanco derecho e izquierdo.*

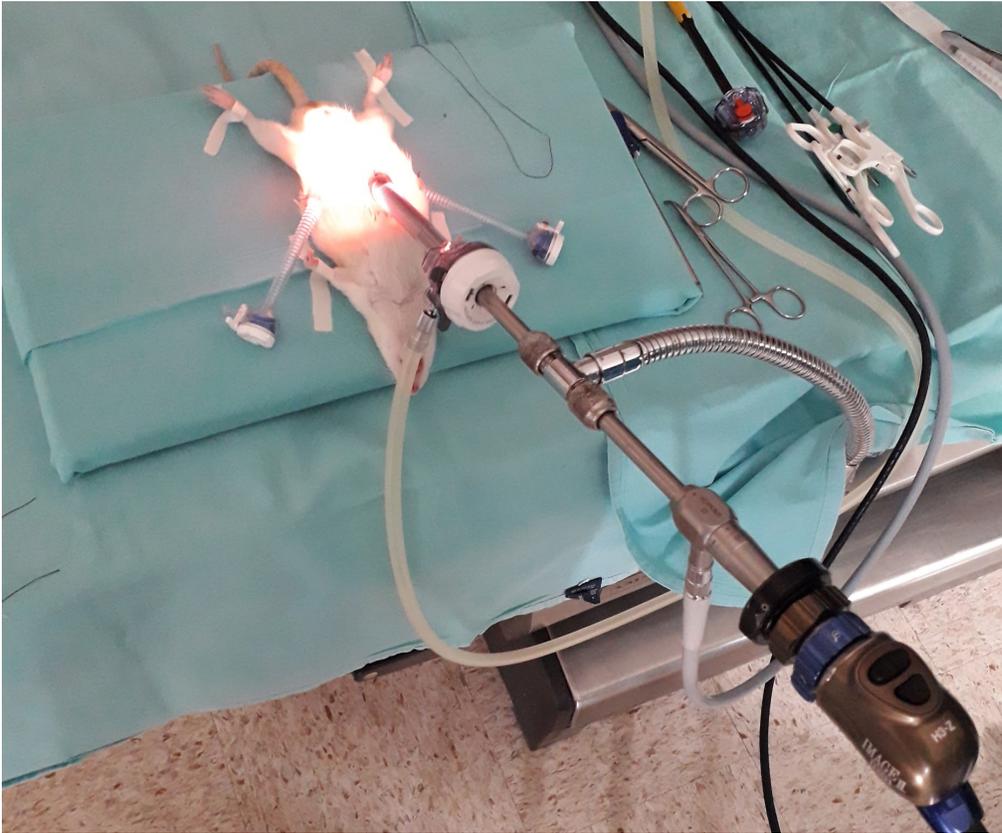


Imagen 7. *Insuflación del neumoperitoneo e introducción de la cámara de laparoscopia por el trocar epigástrico.*

Se realizó una modificación en la técnica quirúrgica durante la colocación de los trocares de trabajo en las siguientes 2 ratas, con la finalidad de causar menor trauma quirúrgico. Se colocó el primer trocar con técnica abierta, sin embargo en esta ocasión de 5 mm, y posteriormente se utilizó lente de laparoscopia de 5 mm y ángulo de 30°. Otra modificación fue colocar únicamente 1 trocar accesorio de trabajo en flanco derecho en la línea axilar anterior de 5 mm, y de esta manera se obtuvo menor número y tamaño en las incisiones quirúrgicas con la finalidad de disminuir la respuesta metabólica al trauma, así como complicaciones relacionadas a las heridas como infección, dehiscencia, formación de abscesos, seroma, hematoma, hernia incisional o evisceración, siendo algunas de ellas potencialmente mortales para el organismo.

Una vez colocado los trocares, se busca de manera intencionada el anillo inguinal profundo siendo primero el derecho y se tracciona el testículo hacia la cavidad abdominal exponiendo su totalidad.

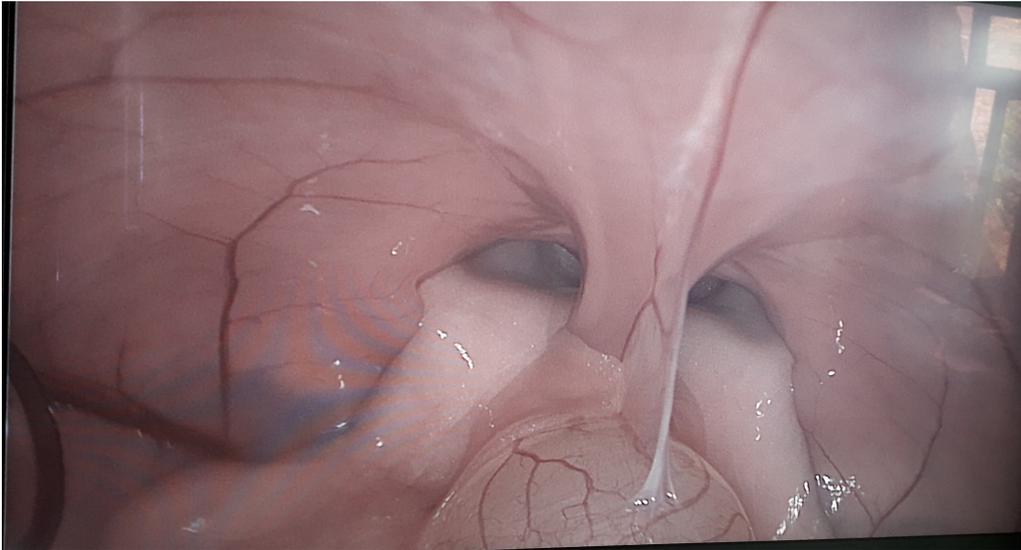
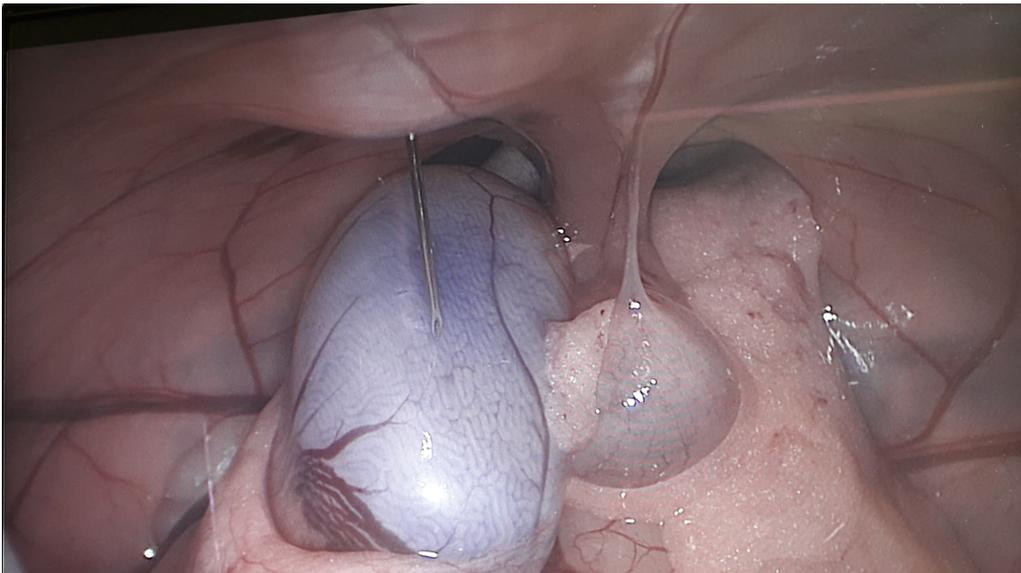


Imagen 8. *Visualización del anillo inguinal por laparoscopia.*

Se utilizó para el montaje de la técnica quirúrgica violeta de Genciana cargadas a diferentes dosis en jeringas para insulina ultra-fine de 0.5 ml. Se realizó bajo visión directa una punción percutánea a nivel de la fosa iliaca derecha y se introdujo en la cara anterior del testículo violeta de Genciana y se valoró la uniformidad y características que se adquieren al inyectar el material en el testículo. Posterior a la inyección en ausencia de complicaciones se introduce nuevamente el testículo hacia el escroto a través del anillo inguinal, y se realizó el mismo procedimiento del testículo contralateral.



Punción percutánea a nivel de la fosa iliaca bajo visión directa mediante laparoscopia e inyección de violeta de Genciana en la cara anterior del testículo. Se nota el aspecto violeta del parénquima testicular de manera homogénea.

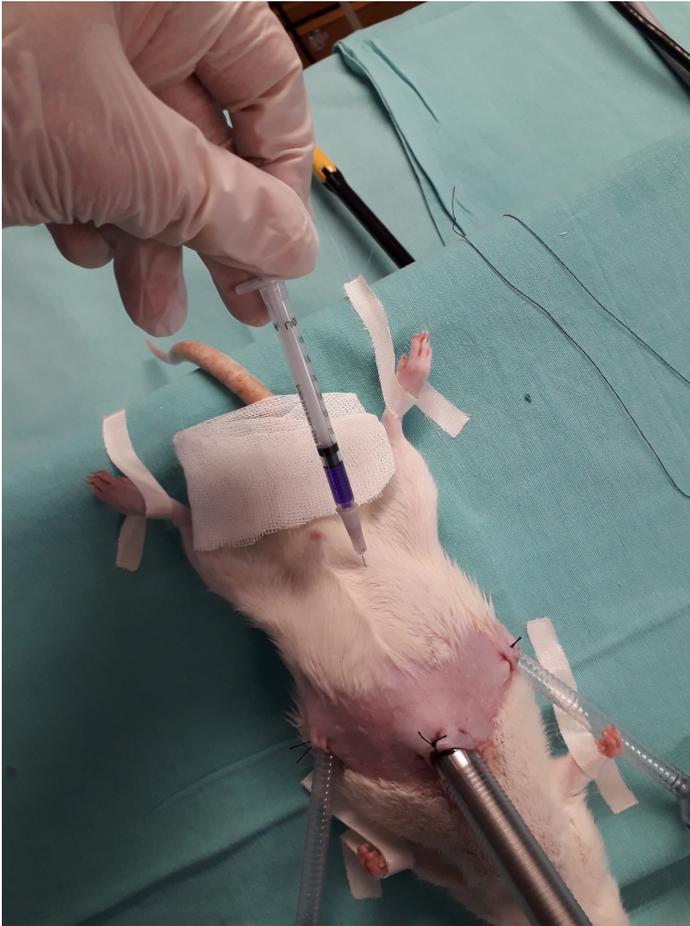


Imagen 9. *Visión externa de la punción percutánea a nivel de la fosa iliaca derecha e inyección de violeta de Genciana en la cara anterior del testículo.*

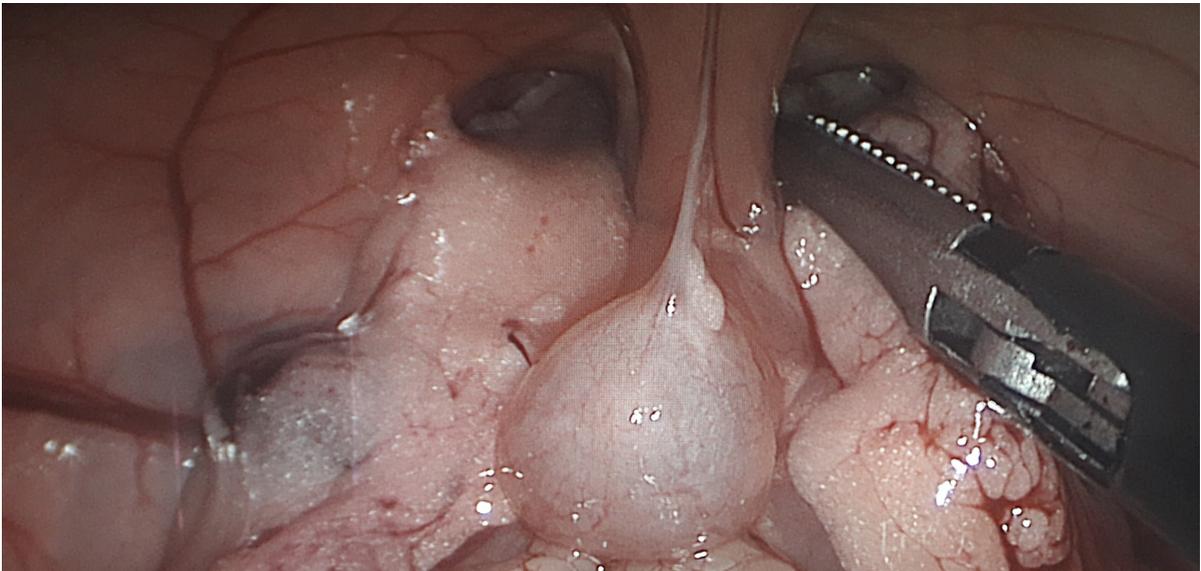


Imagen 10. *Reinserción del testículo hacia el escroto a través del anillo inguinal.*

Se observó que al introducir un contenido líquido con un volumen > 0.3 ml, dentro del testículo, este presentaba disrupción de la cápsula con exposición de conductos

seminíferos hacia el exterior del órgano, por lo que se decidió que el volúmen máximo a introducir debe ser de 0.2 ml.

Posterior a realizar el procedimiento quirúrgico se retiraron los trócares bajo visión directa, y se extrajo el neumoperitoneo. Se procedió al cierre de las heridas en dos planos, siendo el primero plano la aponeurosis con sutura absorbible monofilamento Poliglecaprone 25 aguja no cortante con 3 puntos simples, y posteriormente se cerró la piel con sutura monofilamento no absorbible polipropileno 3-0 con aguja cortante con 3 puntos simples.



Imagen 11. *Cierre de la aponeurosis y piel.*

Anestesia y analgesia:

Se administró a cada rata de manera preoperatoria anestesia general con pentobarbital a dosis calculada de 25 mg/kg. Posteriormente con la finalidad de conseguir un efecto miorrelejante y sedante se aplicó 1 mg de Xilacina dosis total por rata. Posterior a la inducción de anestesia se consiguió el mantenimiento de anestesia a base de Sevoflurano inhalado dosis-respuesta. Se utilizó de igual manera anestesia local con lidocaína simple al 2% administrado de manera subcutánea en los sitios de incisión con previo marcaje 5 minutos al procedimiento quirúrgico.

Se utilizó analgesia profiláctica previa a la incisión con 0.1 ml de Tramadol subcutáneo. Posterior al procedimiento quirúrgica las ratas se mantuvieron en posición de seguridad en decúbito lateral izquierdo y se monitorizaron hasta la recuperación de la anestesia.

La analgesia postoperatoria se consiguió con anti-inflamatorios no esteroides, siendo específicamente utilizado en nuestro protocolo el Ketorolaco, en presentación ampolleta de 30 mg/1 ml, con una dosis calculada por peso 0.03 ml. Se continuó la analgesia postoperatoria durante 72 horas posteriores al procedimiento quirúrgico, con la dosis mencionada aplicada de manera subcutánea una vez al día.

Técnica quirúrgica final:

Se registró previo al procedimiento quirúrgico el peso inicial de la rata y se realizó marcaje de la cola del animal con plumón indeleble para la identificación adecuada en el postoperatorio. Se llevó un registro físico electrónico donde se especificó la cepa tumoral por ser administrada en cada testículo de la rata, así como la carga tumoral y la anotación de las observaciones transoperatorias.

Se colocaron las ratas en decúbito supino en posición de trendelenburg, fijando las patas con tela adhesiva al campo de trabajo. Se realizó antisepsia de la región por operar con Chloraprep® (Digluconato de clorhexidina 20 mg/ml / Alcohol isopropílico al 70%). Se colocaron campos estériles y posteriormente gasas estériles en la región abdominal con la finalidad de delimitar el campo quirúrgico.

Se accedió en la primera rata a cavidad abdominal con una incisión de 5 mm con tijeras de metzenbaum en epigastrio, disecando por planos bajo visión directa, y se introdujo trocar con técnica abierta de Hasson. Posteriormente se insufló neumoperitoneo a presión y velocidad de flujo mínimos. Se introdujo lente de laparoscopia de 5 mm y ángulo de 30° y se realizó laparoscopia diagnóstica, evidenciando ausencia de anormalidad anatómicas y lesiones a órganos adyacentes. Posteriormente se colocó 1 trocar accesorios de trabajo de 5 mm en situación del flanco abdominal localizado en línea axilar anterior y a través de ellos se introdujeron pinzas Babcock y Grasper laparoscópicos.

Una vez accesado a cavidad abdominal, se protocolizó siempre iniciar con el testículo derecho la implantación de células tumorales con la finalidad de disminuir el margen de error y continuar una técnica metódica.

Se traccionó el testículo derecho hacia la cavidad abdominal a través del orificio inguinal profundo con pinzas de Babcock con gentileza. Posteriormente se introdujo bajo visión

laparoscópica una aguja de insulina con diferentes cepas y dosis de células tumorales en jeringas para insulina ultra-fine de 0.5 ml de manera percutánea en fosa iliaca derecha, localizando la punta de la aguja la cápsula del testículo. La cantidad de líquido implantado en cada testículo fue de 0.2 ml.

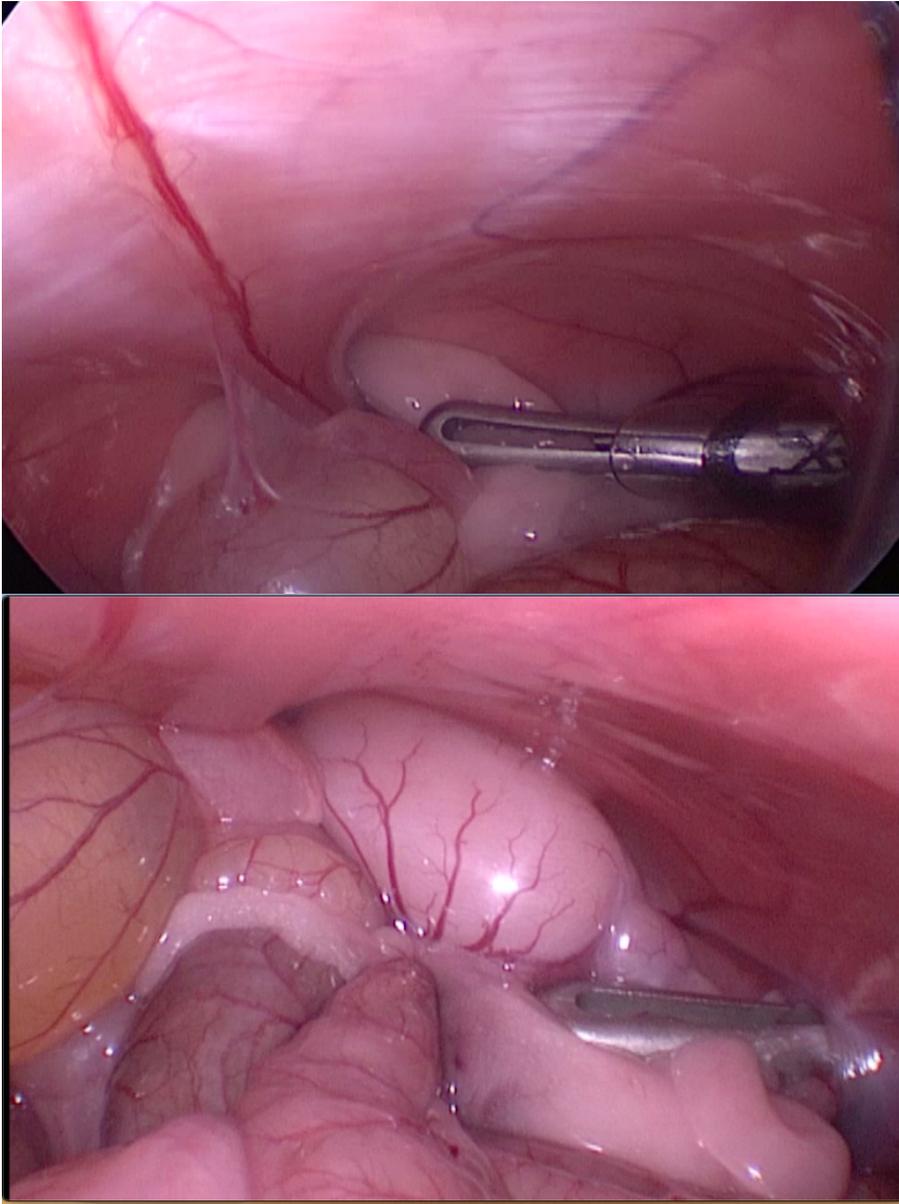


Imagen 12 y 13. *Tracción del testículo derecho hacia cavidad abdominal.*

La implantación del tejido tumoral se realizó atravesando por completo la cápsula del testículo y accediendo hacia el parénquima, con previa aspiración del contenido para evitar la entrada de la aguja en un vaso sanguíneo. Una vez corroborado esta maniobra de seguridad, se inyecta lentamente en un lapso de tiempo entre 20-30 segundos el contenido tumoral de la jeringa, y posteriormente se mantuvo la jeringa en el parénquima testicular por otros 15 segundos, para asegurarse de la distribución

homogénea de la inyección en el sitio deseado y prevenir la extrapolación del líquido introducido hacia la cavidad abdominal.

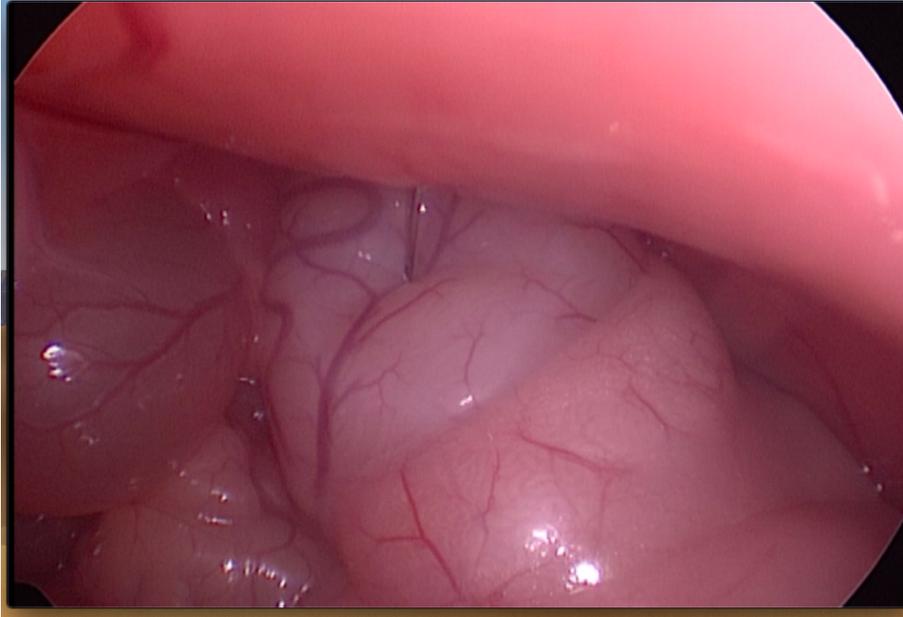


Imagen 14. *Xenotrasplante de células tumorales de manera percutánea guiada por laparoscopia, en cara anterior del testículo.*

Posterior a la realización de este procedimiento, se reintrodujo en su totalidad el testículo hacia la bolsa escrotal con pinzas endoscópicas de Babcock a través del orificio inguinal profundo, manteniendo la integridad total del tejido con mínima manipulación, y asegurándose de evitar complicaciones asociadas a esta maniobra como sangrado, desgarro capsular o torsión testicular.

Una vez concluido en su totalidad este procedimiento en el testículo derecho, se procedió a realizar lo mismo en el testículo contralateral. Se traccionó el testículo izquierdo hacia la cavidad abdominal a través del orificio inguinal profundo con pinzas de Babcock con gentileza. Posteriormente se introdujo bajo visión laparoscópica una aguja de insulina con diferentes cepas y dosis de células tumorales en jeringas para insulina ultra-fine de 0.5 ml de manera percutánea en fosa iliaca derecha, localizando la punta de la aguja la cápsula del testículo. La cantidad de líquido implantado en cada testículo fue de 0.2 ml. La implantación del tejido tumoral se realizó atravesando por completo la cápsula del testículo y accediendo hacia el parénquima, con previa aspiración del contenido para evitar la entrada de la aguja en un vaso sanguíneo. Una vez corroborado esta maniobra de seguridad, se inyecta lentamente en un lapso de tiempo entre 20-30 segundos el contenido tumoral de la jeringa, y posteriormente se mantuvo la jeringa en el parénquima testicular por otros 15 segundos, para asegurarse

de la distribución homogénea de la inyección en el sitio deseado y prevenir la extrapolación del líquido introducido hacia la cavidad abdominal.

Posterior a la realización de este procedimiento, se reintrodujo en su totalidad el testículo izquierdo hacia la bolsa escrotal con pinzas endoscópicas de Babcock a través del orificio inguinal profundo, manteniendo la integridad total del tejido con mínima manipulación, y asegurándose de evitar complicaciones asociadas previamente mencionadas.

Una vez concluido el procedimiento laparoscópico, se realizó revisión de la cavidad abdominal, para verificar ausencia de lesión a órganos adyacentes, y se retiraron los trócares de trabajo bajo visión directa concluyendo ausencia de sangrado activo hacia la cavidad peritoneal, y finalmente se desinfló el neumoperitoneo en su totalidad.

Se lavaron las heridas quirúrgicas con solución salina al 0.9% para evitar la infección de herida postquirúrgica y tratar de remover en lo posible implantes celular en los sitios de los trócares. Se cerró la aponeurosis con 2-3 puntos simples con una separación de 2 mm entre cada punto con material de sutura monofilamento no absorbible polipropileno del 4-0 de aguja no cortante. Finalmente se procedió al cierre de la piel con 1 punto de afrontamiento de seguridad, de manera intradérmica, con material de sutura de absorción lenta poliglicaprone 25, 4-0 y posteriormente con material de sutura monofilamento no absorbible siendo el polipropileno del 4-0 de aguja cortante se colocaron 2-3 puntos simples con una separación de 2 mm entre cada uno.

Una vez concluido el procedimiento quirúrgico inició la vigilancia clínica en área de recuperación post-anestésica por lo que las ratas se trasladaron a jaulas separadas con campos de confort y se colocaron en posición de seguridad en decúbito lateral izquierdo. Se obtuvieron en monitorización clínica durante 2 horas, hasta la resolución total del efecto anestésico. En esta etapa se observó la coloración de tegumentos y mucosas, la frecuencia respiratoria, el grado de relajación muscular y la deambulación integrando la coordinación psico-motora posterior al efecto de la anestesia.

Ningún animal presentó complicaciones ni defunciones relacionadas a la administración de los anestésicos generales, local, o medicamentos aplicados en el pre, trans, o postoperatorio.

De igual manera ningún animal presentó complicaciones ni defunciones relacionadas al procedimiento quirúrgico *per se* durante el transoperatorio, y el sangrado estimado fue mínimo.

Seguimiento postquirúrgico y complicaciones:

Los animales de experimentación se mantuvieron en cajas de policarbonato con 3 animales por jaula con agua de bebedero y alimento ad libitum (pellets de alimento Chow de la marca Purina) con cambio de cama cada tercer día en los anaqueles del Centro de Cirugía Experimental y Capacitación Quirúrgica del American British Cowdray Medical Center I.A.P.

Se llevó a cabo el registro de su comportamiento individual y social así como de desplazamiento, alimentación y consumo de agua como indicadores generales de su buen estado de salud todos los días durante 6 semanas (42 días).

Se concordó en el protocolo que aquellos animales que presentaran hipotonía, piloerección, asilamiento y/o diarrea se asilarían para determinar si hay un posible proceso infeccioso. Los animales que mostraran todos estos signos se someterían a un examen detallado y si se determina que están infectados o sépticos serían sacrificados para evitar sufrimiento y no introducir tratamiento con antibióticos que podría ser un agente confusor en el estudio.

Los animales que deban ser sacrificados por razones previamente mencionadas se anestesiarían con pentobarbital y xilacina y se colocarán en una caja con un flujo continuo de CO₂ hasta el punto final. En todos ellos se realizaría una necropsia para determinar la presencia de infección y si ésta estaba asociada al xenotransplante.

Sin embargo en nuestro estudio de experimentación ninguno de los animales presentó los criterios previamente mencionados por lo que no hubo necesidad de sacrificar ninguna rata.

Se realizó curación de herida quirúrgica con Microdacyn® solución y gasas estériles, todos los días hasta conseguir la cicatrización completa de las mismas. Ninguno de los animales presentó como complicación postoperatoria una infección de herida quirúrgica.

Es importante mencionar que la rata catalogada como R6, presentó en el día de postoperatorio 1 dehiscencia total de la herida localizada en epigastrio y ausencia de material de sutura, por lo que fue necesario el cierre de la herida quirúrgica por tercera intención realizando una sedación con sevoflurano inhalado y aplicación de anestésico local a base de lidocaína al 2%. Se realizó curación de la herida con Microdacyn® solución y gasas estériles y se colocaron 3 puntos con material de sutura monofilamento no absorbible siendo el polipropileno del 4-0 de aguja cortante, con una separación de 2 mm entre cada uno.

El resto de los animales presentaron una adecuada evolución clínica en el periodo postquirúrgico y no se evidenciaron complicaciones asociadas.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación del tumor establecido, 6 semanas posteriores al implante de células tumorales, los modelos animales se introdujeron nuevamente al mismo procedimiento quirúrgico con anestesia general con pentobarbital efecto miorelajante y sedante con Xilacina, así como Sevoflurano inhalado dosis-respuesta. Se utilizó de igual manera anestesia local con lidocaína simple al 2% administrado de manera subcutánea en los sitios de incisión con previo marcaje 5 minutos al procedimiento quirúrgico.

Se realizó este segundo procedimiento quirúrgico con la finalidad de documentar in-vivo mediante una laparoscopia diagnóstica los cambios morfológicos macroscópicos establecidos tanto en la cavidad peritoneal como en los testículos manipulados. Se documentó el peso final de cada animal así como el número de rata establecido con la primera letra del testículo analizado (Ej. R1-D, corresponde a la rata no. 1, testículo derecho), y las observaciones morfológicas encontradas durante el acto quirúrgico.

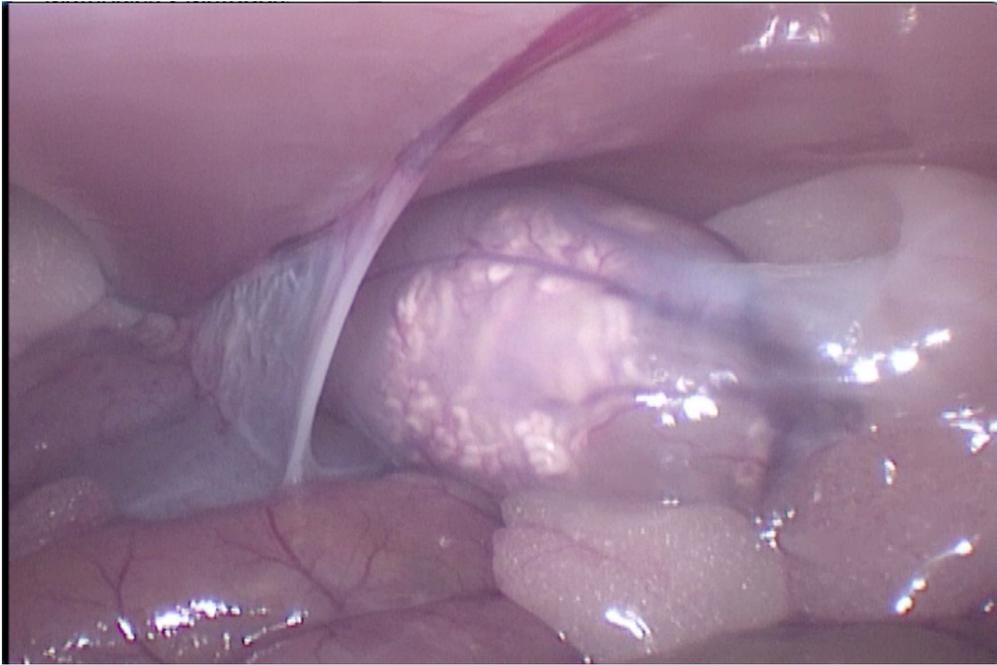


Imagen 15. Testículo R6-D. Laparoscopia diagnóstica a las 6 semanas posterior al xenotrasplante. Aspecto macroscópico con Lesión de 10 mm blanquecino que respeta la cápsula testicular.

Se realizó inmediatamente posterior a la laparoscopia diagnóstica, una incisión de laparotomía de aproximadamente 4 cm en línea media, y se disecó por planos y se abrió la aponeurosis con tijeras hasta acceder a cavidad peritoneal. Se exteriorizaron los testículos a través del conducto inguinal profundo hacia la herida de la laparotomía y se realizó ligadura proximal del cordón espermático, con seda 4-0, el cual incluye los vasos espermáticos y conducto deferente, y posteriormente se realizó ligadura del gubernaculum testis de igual manera.

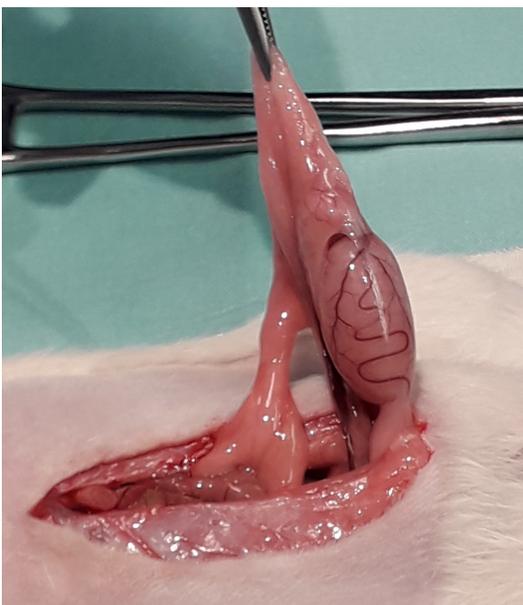


Imagen 16. Extirpación del tejido mediante laparotomía infraumbilical.

Los tejidos obtenidos se colocaron en frasco con formol etiquetados con los nombres establecidos para su análisis, y se enviaron al departamento de patología del Centro Médico ABC, para su posterior análisis macro y microscópico.

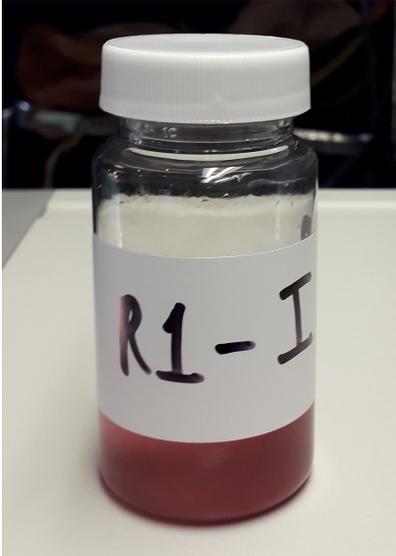


Imagen 17. Frascos con formol etiquetados según la pieza quirúrgica a analizar.

Se procedió al cierre de las heridas con sutura no absorbible trenzado de seda del 0 en un solo plano incluyendo la aponeurosis y la piel con surgete.

Posteriormente las ratas se sacrificaron con sobredosis de pentobarbital y sevoflurano. Una vez documentado el paro cardiorrespiratorio, se procedió a la colocación del animal en bolsas de tejidos amarillos siguiendo el protocolo de sacrificio y desecho de los animales de experimentación establecidos según las normas de ética del Centro de Cirugía Experimental y Capacitación Quirúrgica del American British Cowdray Medical Center I.A.P.

No. Rata	Peso	Testículo	Cepa tumoral	Carga Tumoral	Observaciones
1	250 gramos.	Der. Tumor. Izquierdo. Medio RPMI (Control).	ECL1	5 millones de células. 30 microlitros.	Sin complicaciones.
2	250 gramos	Der. Tumor. Izquierdo. Medio RPMI (Control).	DSG-BC1	5 millones de células. 30 microlitros.	Sin complicaciones.
3	200 gramos	Der. Tumor. Izquierdo. Medio RPMI (Control).	MDA-MB231	5 millones de células. 30 microlitros.	Sin complicaciones.
4	200 gramos	Der. Tumor. Izquierdo sin control, sano.	DSG-BC2	5 millones de células. 30 microlitros.	Se inyectó escaso medio de control en el testículo izquierdo.

Tabla 1. Registro xenotrasplante 26 de abril del 2019, Ciudad de México.

No. Rata	Peso	Testículo	Cepa tumoral	Carga Tumoral	Observaciones
5	300 gramos	Derecho e izquierdo	MCF7	Derecho = 2.5 Millones Izquierdo = 5 millones.	Sin complicaciones.
6	250 gramos	Derecho e izquierdo.	MCF7	Derecho = 10 millones. Izquierdo = 20 millones.	Sin complicaciones.
7	220 gramos	Derecho e izquierdo.	MDA MB 231	Derecho = 2.5 millones. Izquierdo = 5 millones	Sin complicaciones.
8	300 gramos	Derecho e izquierdo.	MDA MB 231	Derecho = 10 millones. Izquierdo = 20 millones.	Sin complicaciones.

Tabla 2. Registro xenotrasplante 3 de mayo del 2019, Ciudad de México.

No. Rata	Peso	Testículo	Cepa tumoral	Carga Tumoral	Observaciones
9	320 gramos	Derecho e izquierdo	DSBSC-1	Derecho = 0.8 millones Izquierdo = 1.75 millones	Sin complicaciones.
10	315 gramos	Derecho e izquierdo.	DSBSC-1	Derecho = 3.5 millones Izquierdo = 7.5 millones	Sin complicaciones.
11	300 gramos	Derecho e izquierdo.	ECLI	Derecho = 0.8 millones. Izquierdo = 1.75 millones.	Sin complicaciones.
12	250 gramos	Derecho e izquierdo.	ECLI	Derecho = 3.5 millones Izquierdo = 7.5 millones.	Sin complicaciones.

Tabla 3. Registro xenotrasplante 10 de mayo del 2019, Ciudad de México.

Resultados:

Se estudiaron 24 piezas (testículos), con xenotrasplante de células tumorales humanas. Se mantuvieron las piezas en frascos con formol, y se entregaron al departamento de patología del Centro Médico ABC.

Se procedió en primer lugar a realizar un análisis macroscópico de los testículos xenotransplantados, y se documentaron los hallazgos, posteriormente se sometieron las piezas quirúrgicas al análisis histopatológico con la finalidad de documentar la detección de células tumorales y cambios morfológicos asociados en el tejido.

Análisis Macroscópico:

Se extrajeron las piezas quirúrgicas de los frascos membretados y se procedió a realizar la medición de cada testículo. Se extrajo todo aquel tejido externo al testículo para su análisis incluyendo el conducto deferente, los vasos espermáticos y el epidídimo.



Imágen 18. *Extracción del cordón espermático y epidídimo.*

Se realizaron 5 cortes finos de manera coronal al tejido y se procedió a realizar la inclusión de los cortes.



Imágen 19 y 20. *Corte coronal del testículo previo a su inclusión.*

Se realizó un registro de los hallazgos encontrados en los cortes histológicos, anotando la presencia o ausencia de alteraciones, y las características de las mismas en caso de encontrarlas. Se documentaron los hallazgos encontrados de igual manera con fotografías tomadas por medio de la cámara digital especializada de la marca Macropath Pro-X, a un aumento del 100x.

Posteriormente se colocaron los cortes de 1 mm representativos del tejido en cartuchos membretados, y se mandaron para la realización de microcortes en el microtomo del departamento de patología. En esta etapa, los tejidos y la parafina integran un solo bloque que, posee la dureza y la consistencia suficientes para obtener secciones delgadas y transparentes.



Imágen 21 y 22. *Fotografías capturadas por medio de la cámara digital especializada de la marca MacroPath Pro-X, a un aumento del 100x.*

Una vez realizados los cortes necesarios se procedió a la tinción del tejido.

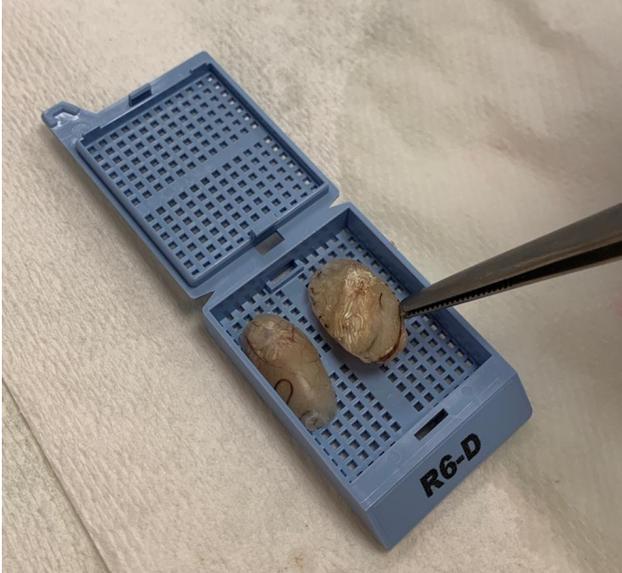
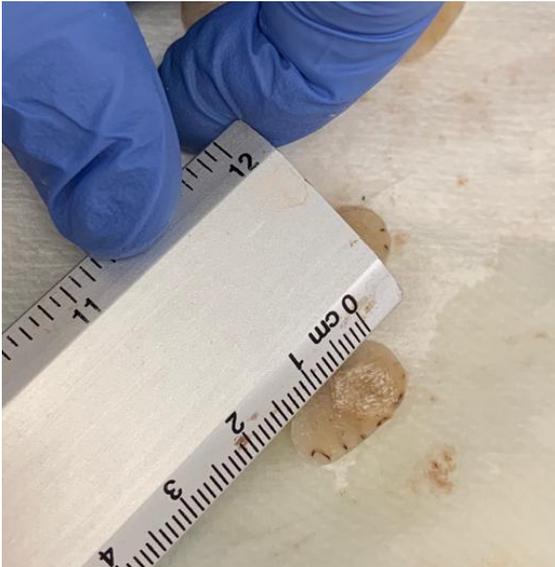
La coloración de hematoxilina - eosina se considera como la técnica de tinción de uso más frecuente en el estudio de células y tejidos, a través del microscopio fotónico, por lo que fue el método de tinción elegido para el análisis de los tejidos en nuestro protocolo de estudio.

La tinción con hematoxilina - eosina consiste en lo siguiente:

a) los núcleos mediante una hematoxilina, previamente oxidada y transformada en hemateína a la que se le añade una sustancia mordiente para formar una laca (para tal fin se usan sales metálicas de aluminio, plomo o hierro).

Los núcleos se colorean de azul, azul morado, violeta, pardo oscuro o negro, dependiendo de los agentes oxidantes y mordientes que se utilizaron.

b) El citoplasma y material extracelular utilizando la eosina que les confiere diversos grados de color rosado.



Imágen 23 y 24. *Medición de alteraciones encontradas en el análisis macroscópico.*

Testículo	Tamaño del testículo	Lesión
R1-D	2.5x1x1 cm	No.
R1-I	2.5x1x1 cm	No.
R2-D	3x1.5x1 cm	No.
R2-I	2.5x1x1 cm	No.

R3-D	3x1.5x1 cm	No.
R3-I	2.5x1x1 cm	No.
R4-D	2.5x1x1 cm	No.
R4-I	3x1x1 cm	No.
R5-D	2.5x1x1 cm	Lesión de 7 mm.
R5-I	2.5x1x1 cm	Lesión de 6 mm.
R6-D	3x1x1 cm	Lesión de 10 mm.
R6-I	3x1x1 cm	Lesión de 12 mm.
R7-D	3x1x1 cm	No.
R8-D	2.5x1x1 cm	No.
R8-I	2.3x1x1 cm	No.
R9-D	2.5x1x1 cm	Lesión de 5 mm.
R9-I	3x1x1 cm	Lesión de 5 mm.
R10-D	3x1x1 cm	No.
R10-I	3x1x1 cm	Lesión de 5 mm.
R11-D	2.5x1x1 cm	No.
R11-I	2.5x1x1 cm	No.
R12-D	3x1x1 cm	No.
R12-I	3x1x1 cm	No.

Registro de los hallazgos macroscópicos.

Fotos del análisis macroscópico:

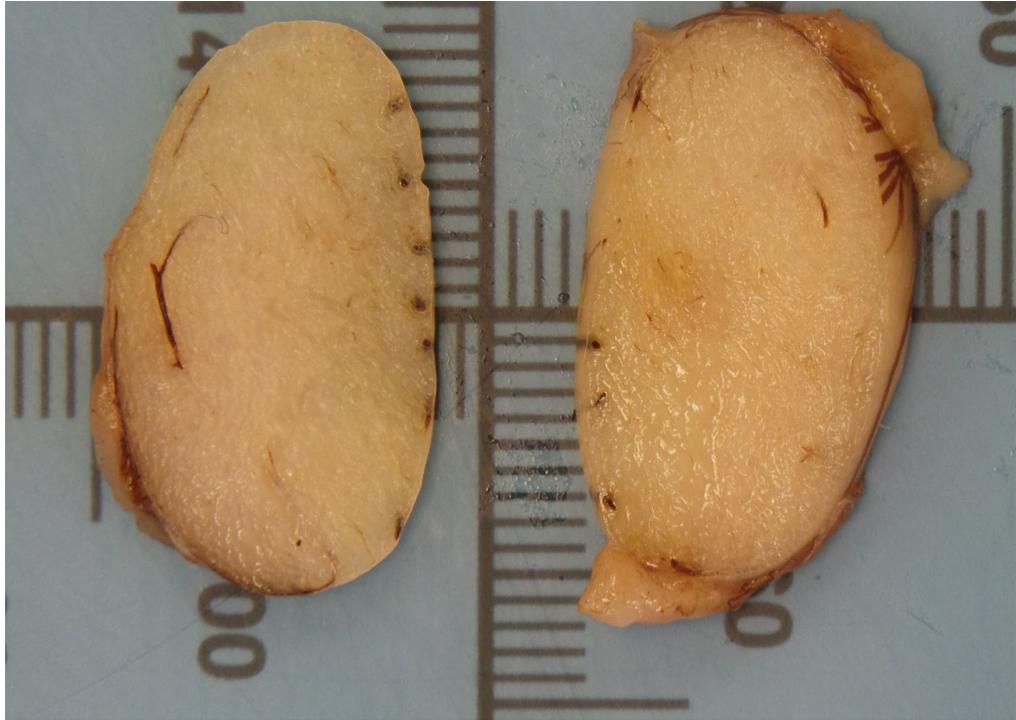


Imagen 25. *Testículo R1-D. Morfología macroscópica normal.*

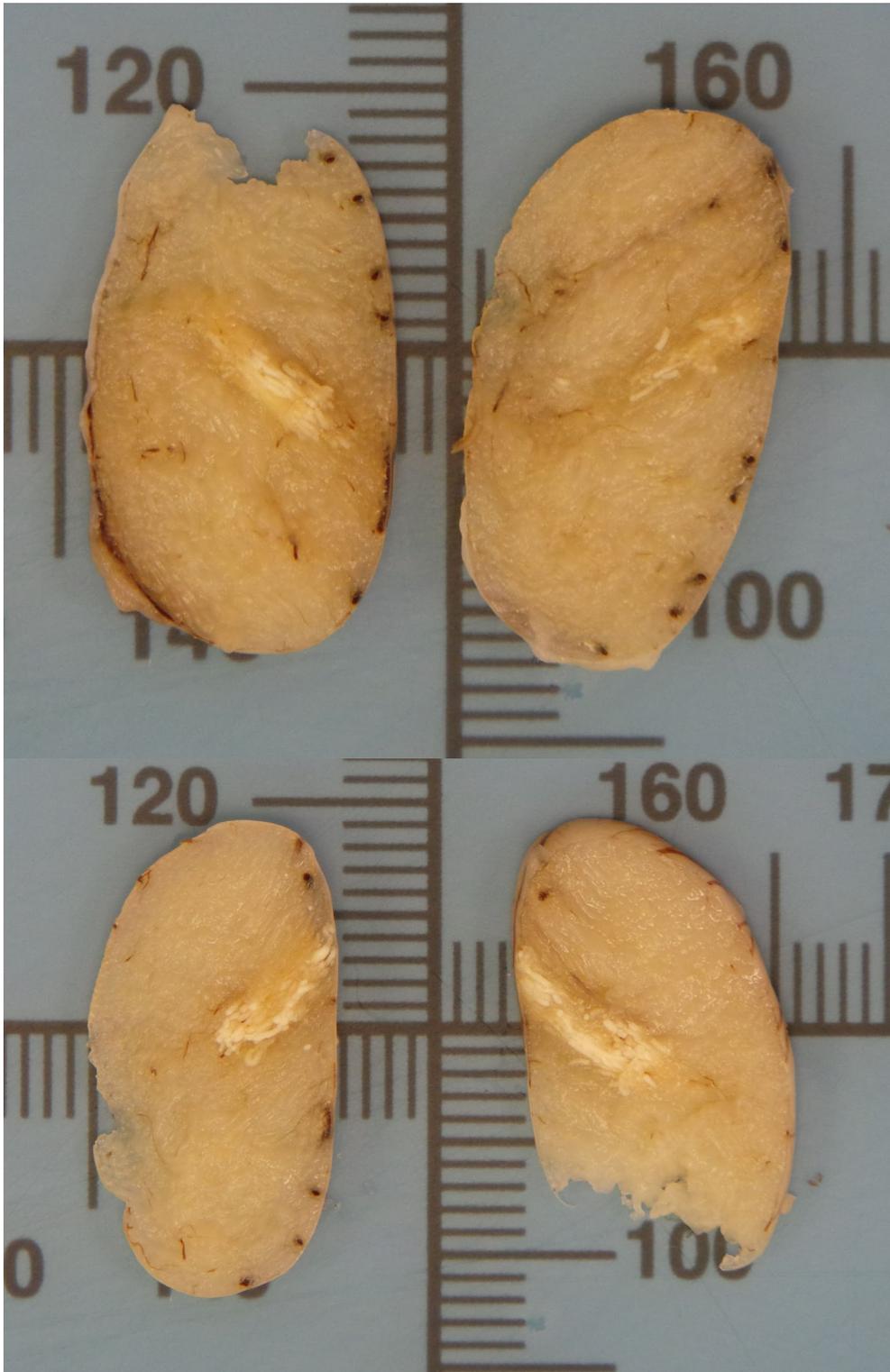


Imagen 26 y 27. Testículos R5-D y R5-I. Alteraciones en la morfología macroscópica. Identificación de una zona con presencia de lesión circular color blanco-ocre de 6 y 7 mm respectivamente.



Imagen 28. Testículo R6-D. Alteraciones en la morfología macroscópica. Identificación de una zona con presencia de lesión circular color blanco-ocre de 10 mm.

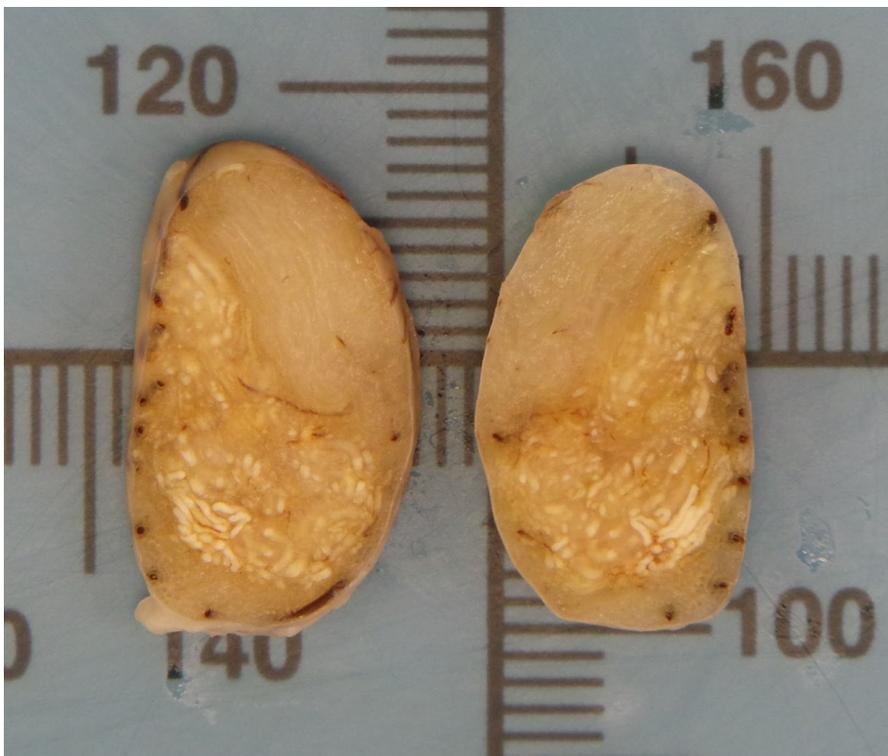


Imagen 29. Testículo R6-I. Alteraciones en la morfología macroscópica. Identificación de una zona con presencia de lesión de bordes mal limitados, que ocupa el 70% de parénquima, color blanco-ocre de 12 mm.

Análisis microscópico:

Una vez obtenido los cortes y adecuados de los tejidos para su análisis se colocaron en tinción con hematoxilina-eosina y se fijaron en laminillas de vidrio para poder realizar el análisis histológico.

Se realizó el diagnóstico histopatológico por parte de personal experta del departamento de patología del Centro Médico ABC. Se llevo a cabo un registro del testículo analizado, junto con la cepa tumoral xenotransplantada, la carga tumoral y las observaciones realizadas por parte de patología.

Los hallazgos fueron buscados intencionadamente en base a las características celulares, morfología celular, modificaciones en el núcleo o citoplasma de las células, alteraciones documentadas en la espermatogénesis, la reacción y cambios en el tejido intersticial adyacente y por último, la presencia o ausencia de células neoplásicas en el tejido.

Testículo	Cepa	Carga tumoral	Observaciones	Fotos
R1-D	ECL1	5 millones de células.	Calcificación focal intratubular. Sin tumor.	
R1-I	Medio	Ausente.	Normal.	Imagen 30 y 31.

R2-D	DSG-BC1	5 millones de células.	Atrofia tubular, calcificación multifocal intratubular, fibrosis intersticial y peritubular con células gigantes tipo cuerpo extraño. Espermatogénesis ausente, inflamación multofocal leve	
R2-I	Medio	Ausente.	Normal.	
R3-D	MDA-MB231	5 millones de células.	Células grandes multinucleadas intratubulares. Alteración en la maduración de las espermatogonias, con escasos espermatozoides, atrofia tubular	Imagen 32 y 33.
R3-I	Medio	Ausente.	Normal.	
R4-D	DSG-BC2	5 millones de células.	Fibrosis intersticial y atrofia tubular, calcificación multifocal intratubular. Células grandes multinucleadas intratubulares. Espermatogénesis preservada hasta forma madura.	Imagen 34 y 35.

R4-I	Medio.	Ausente.	Escasas células grandes multinucleadas intratubulares.	
R5-D	MCF7	2.5 millones de células.	Calcificación distrófica intratubular, atrofia tubular, espermatogénesis preservada.	Imagen 36 y 37.
R5-I	MCF7	5 millones de células	Calcificación distrófica intratubular, fibrosis peritubular, inflamación crónica con células gigantes, atrofia tubular focal, espermatogénesis preservada.	Imagen 38
R6-D	MCF7	10 millones de células	Respuesta inflamatoria intersticial intensa, inflamación aguda con microabscesos, células gigantes tipo cuerpo extraño, Calcificación distrófica intratubular, atrofia tubular, espermatogénesis disminuida.	Imagen 39, 40 y 41.

R6-I	MCF7	20 millones de células	Respuesta inflamatoria intersticial intensa, inflamación aguda con microabscesos, células gigantes tipos cuerpo extraño, Calcificación distrófica intratubular, atrofia tubular, espermatogénesis disminuida.	Imagen 42.
R7-D	MDA MB 231	2.5 millones de células	Normal.	
R7-I	MDA MB 231	5 millones de células	Calcificación distrófica intratubular.	
R8-D	MDA MB 231	10 millones de células	Calcificación distrófica intratubular, con fibrosis peritubular, espermatogénesis normal.	
R8-I	MDA MB 231	20 millones de células	Calcificación distrófica intratubular, con fibrosis intersticial, inflamación crónica intersticial leve, con células gigantes tipo	

			cuerpo extraño. Atrofia tubular leve y espermatogénesis preservada.	
R9-D	DSBSC-1	0.8 millones de células	Calcificación distrófica intratubular, inflamación crónica leve intratubular, atrofia tubular, células grandes multinucleadas escasas intratubulares, espermatogénesis preservada.	
R9-I	DSBSC-1	1.75 millones de células	Calcificación distrófica en mayor cantidad, atrofia tubular, células grandes multinucleadas escasas intratubulares,	
R10-D	DSBSC-1	3.5 millones de células	Calcificación distrófica focal.	
R10-I	DSBSC-1	7.5 millones de células	Inflamación crónica peritubular, inflamación aguda microabscedada con calcificación distrófica, atrofia	

			tubular, espermatogénesis preservada.	
R11-D	ECLI	0.8 millones de células	Calcificación distrófica focal y fibrosis focal. Espermatogénesis conservada.	
R11-I	ECLI	1.75 millones de células	Inflamación aguda microabscedada y crónica con células gigantes tipo cuerpo extraño con fibrosis intersticial peritubular, calcificación distrófica intratubular. Espermatogénesis preservada.	
R12-D	ECLI	3.5 millones de células	Inflamación aguda microabscedada y crónica con células gigantes tipo cuerpo extraño. Mayor distrofia intratubular y fibrosis intersticial y espermatogénesis disminuida.	

R12-I	ECLI	7.5 millones de células	Inflamación crónica con células gigantes tipo cuerpo extraño, calcificación distrófica intratubular. Abundantes células gigantes tipo cuerpo extraño intratubulares.	Imagen 43 y 44.
-------	------	-------------------------	--	-----------------

Tabla 4. Registro del análisis histopatológico.

Fotografías de los hallazgos histopatológicos:



Imagen 30. Testículo R1-I. Grupo control con inyección de medio de cultivo estéril RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino.

Tejido testicular normal, sin evidencia de alteraciones microscópicas a nivel panorámico.

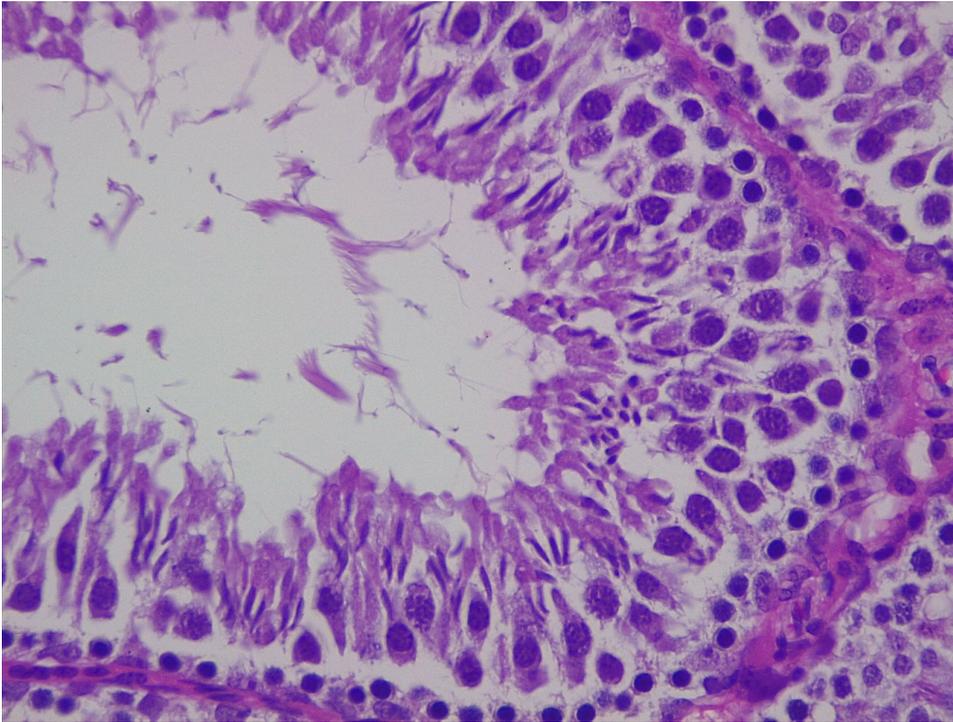


Imagen 31. Testículo R1-I. Grupo control con inyección de medio de cultivo estéril RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino. Tejido testicular normal, sin evidencia de alteraciones microscópicas al realizar acercamiento.

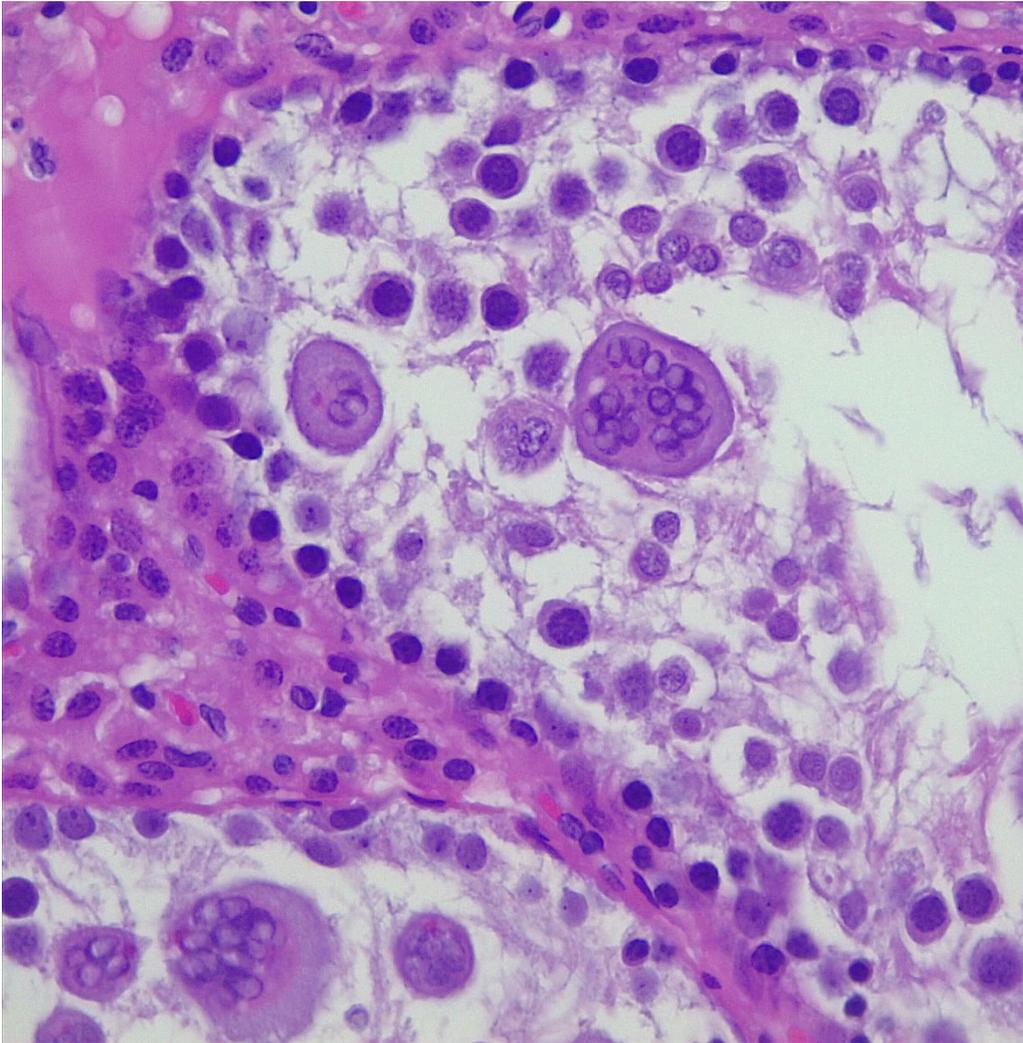


Imagen 32. Testículo R3-D. Cepa tumoral MDA-MB231, a concentración de 5 millones de células. Presencia de células grandes multinucleadas intratubulares. Alteración en la maduración de las espermatogonias, con escasos espermatozoides, y atrofia tubular.

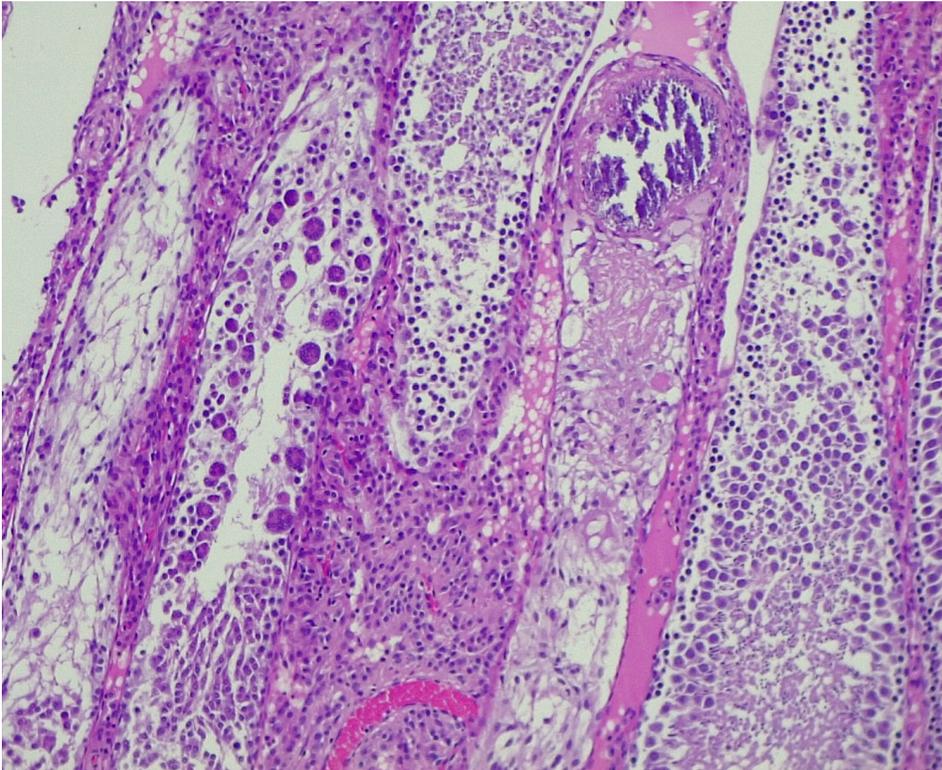


Imagen 33. Testículo R3-D. Cepa tumoral MDA-MB231, a concentración de 5 millones de células. Presencia de células grandes multinucleadas intratubulares. Alteración en la maduración de las espermatogonias, con escasos espermatozoides, y atrofia tubular.

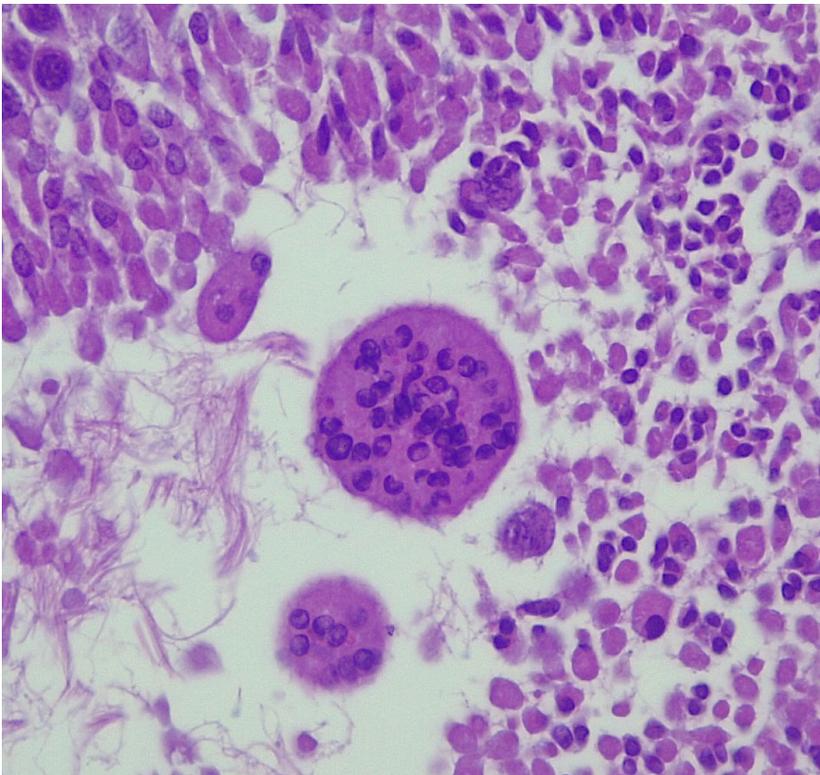


Imagen 34. Testículo R4-D. Cepa tumoral DSG-BC2, concentración de 5 millones de células.

Células grandes multinucleadas intratubulares. Espermatogénesis preservada hasta forma madura.

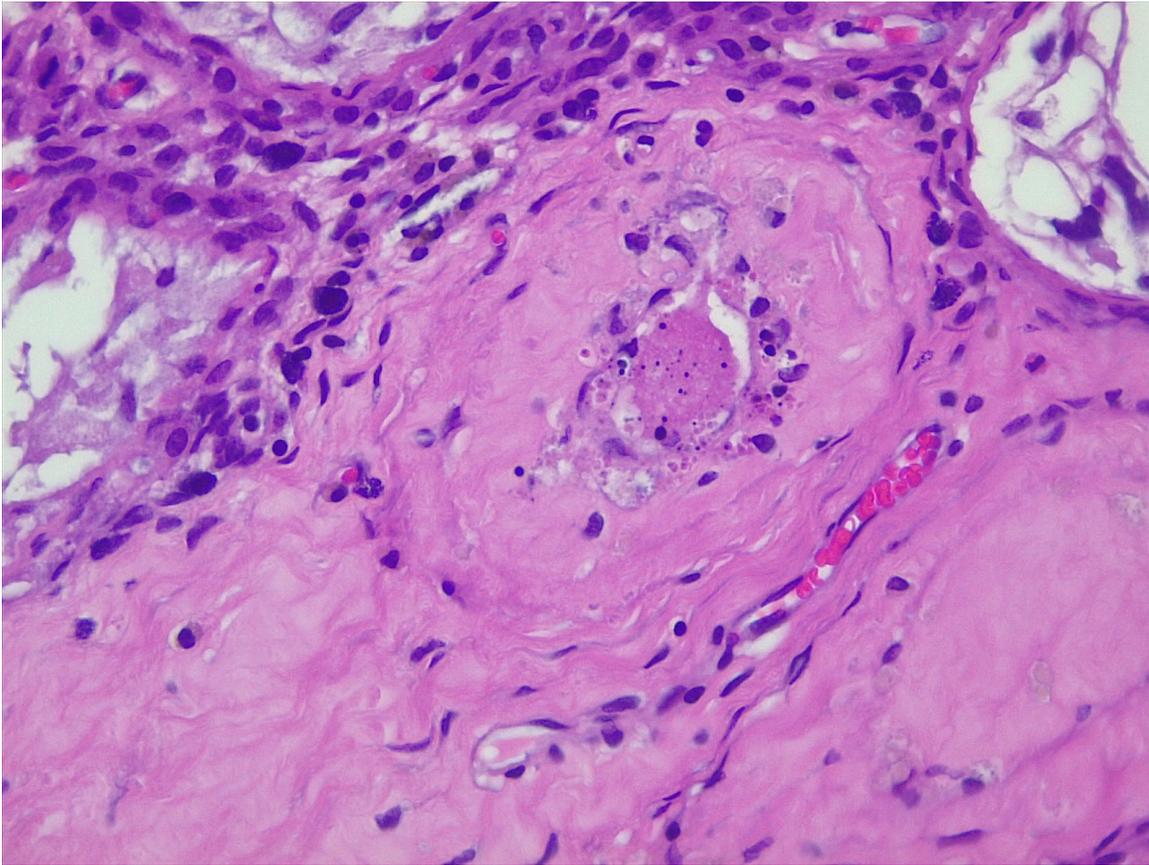


Imagen 35. *Testículo R4-D. Cepa tumoral DSG-BC2, concentración de 5 millones de células.*

Fibrosis intersticial y atrofia tubular, calcificación multifocal intratubular. Células grandes multinucleadas intratubulares.

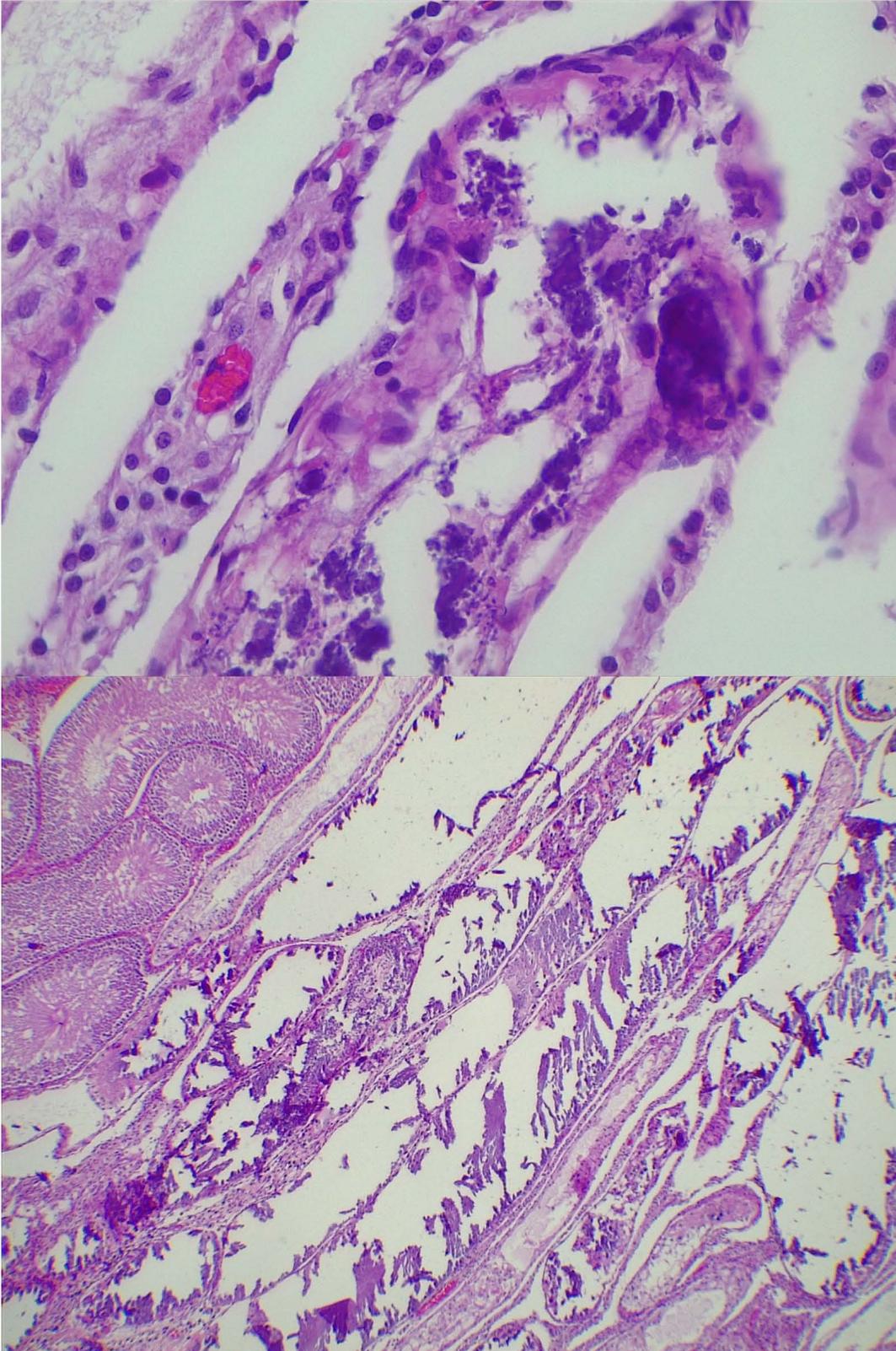


Imagen 36 y 37. Testículo R5-D. Cepa tumoral MCF7, carga tumoral de 2.5 millones de células. Calcificación distrófica intratubular, atrofia tubular, espermatogénesis preservada.

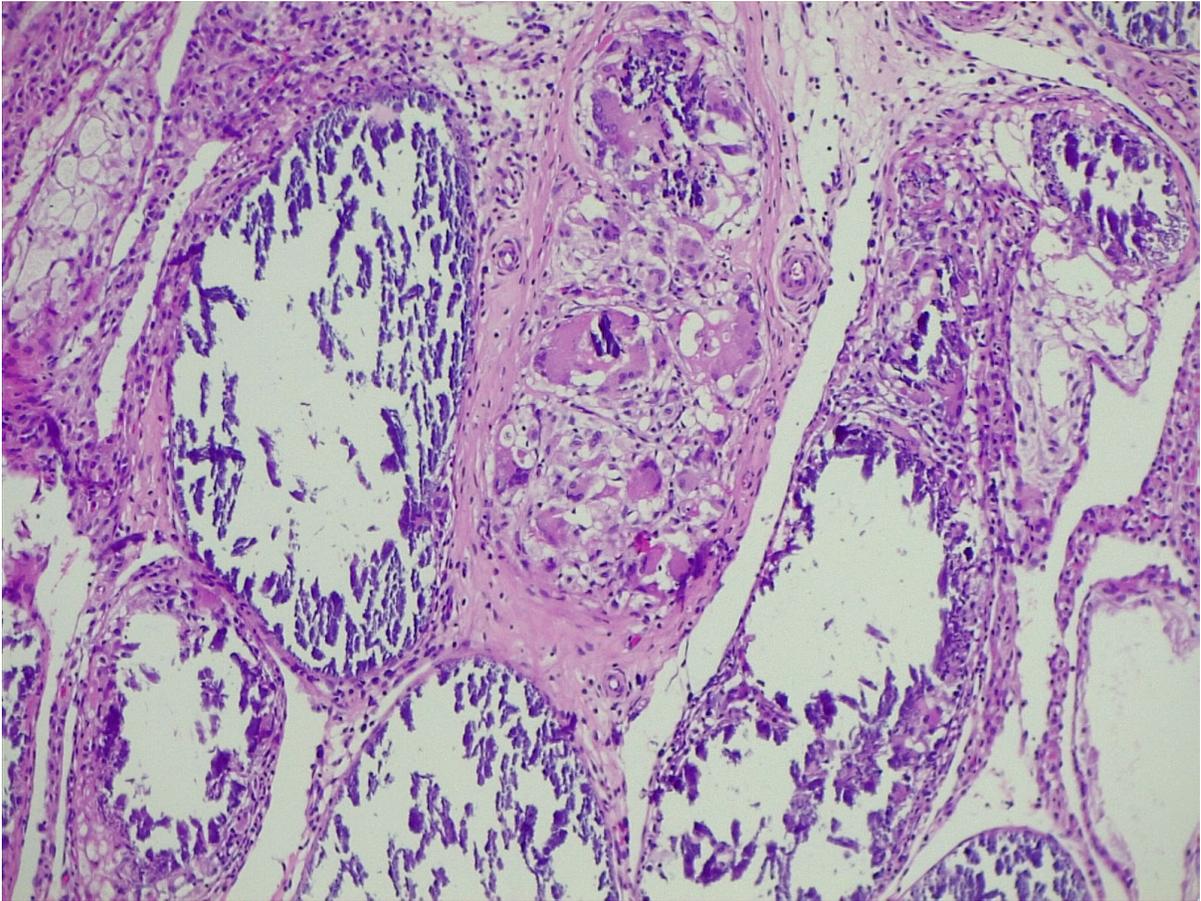
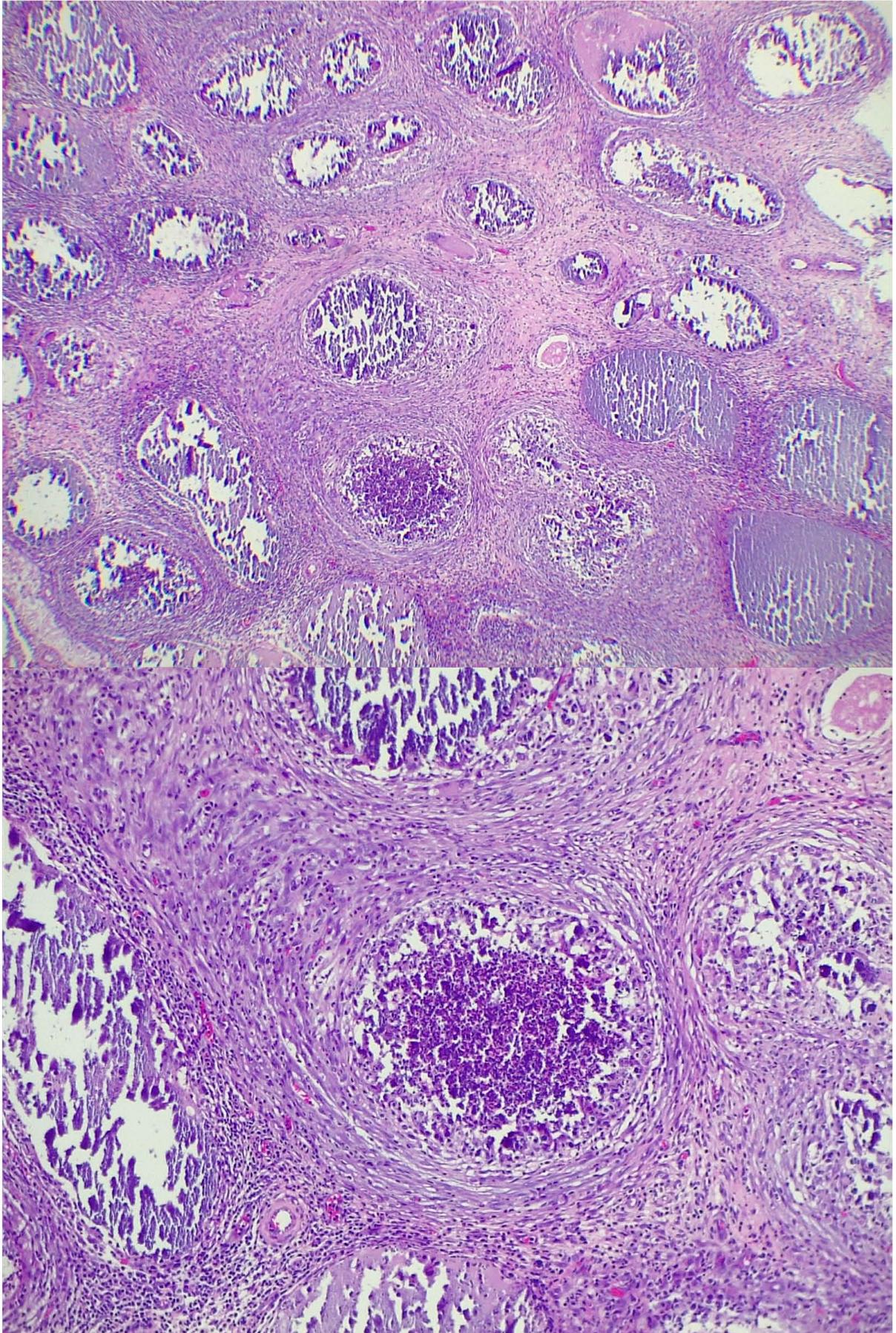


Imagen 38. Testículo R5-I. Cepa tumoral MCF7, carga tumoral de 5 millones de células. Calcificación distrófica intratubular, fibrosis peritubular, inflamación crónica con células gigantes, atrofia tubular focal, espermatogénesis preservada.



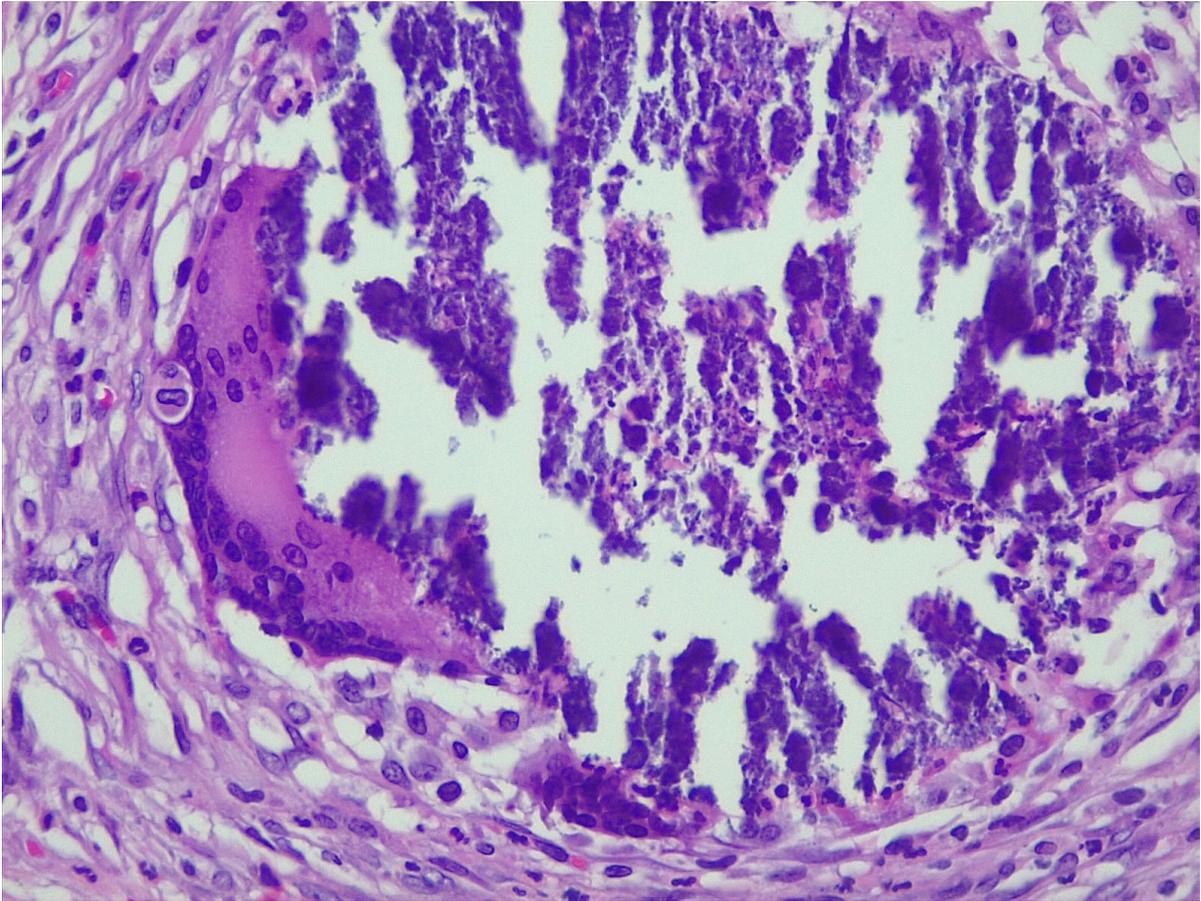


Imagen 39, 40, y 41. Testículo R6-D. Cepa tumoral MCF7, carga tumoral de 10 millones de células. Respuesta inflamatoria intersticial intensa, inflamación aguda con microabscesos, células gigantes tipo cuerpo extraño, Calcificación distrófica intratubular, atrofia tubular, y espermatogénesis disminuida.

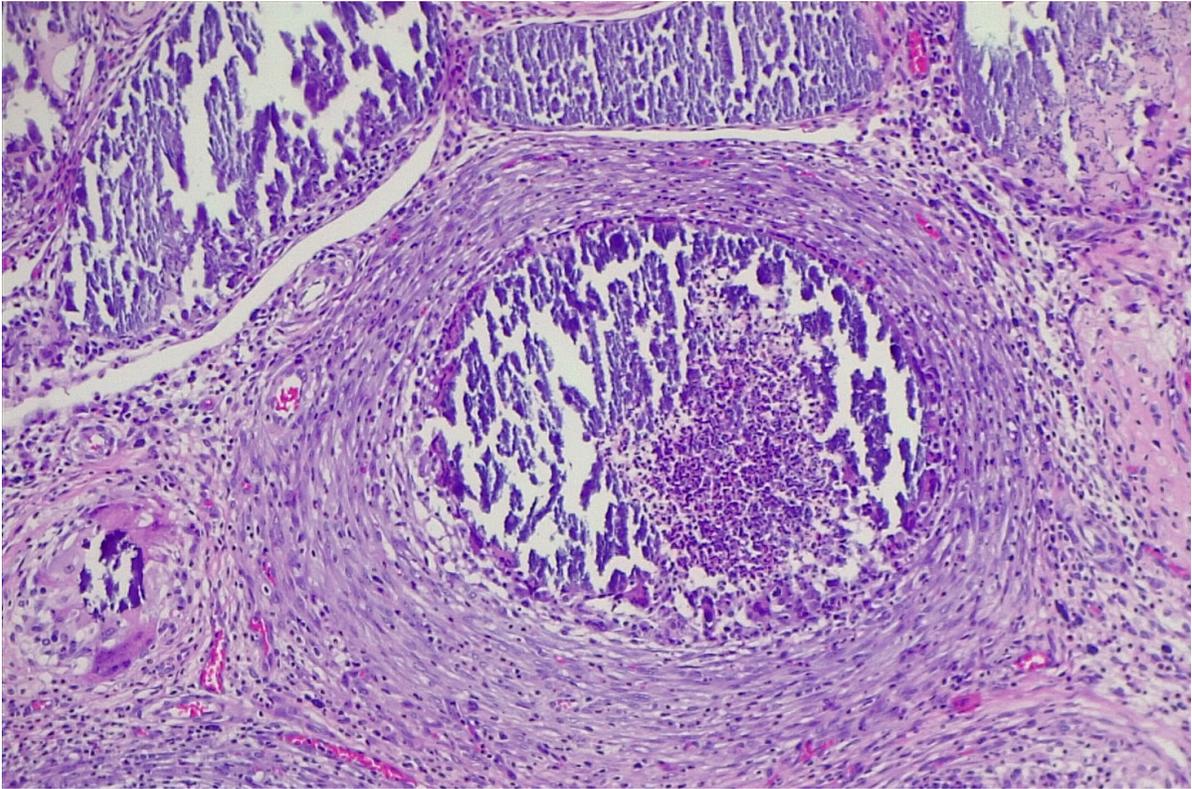


Imagen 42. Testículo R6-I. Cepa tumoral MCF7, carga tumoral de 20 millones de células. Respuesta inflamatoria intersticial intensa, inflamación aguda con microabscesos, células gigantes tipos cuerpo extraño, Calcificación distrófica intratubular, atrofia tubular, espermatogénesis disminuida.

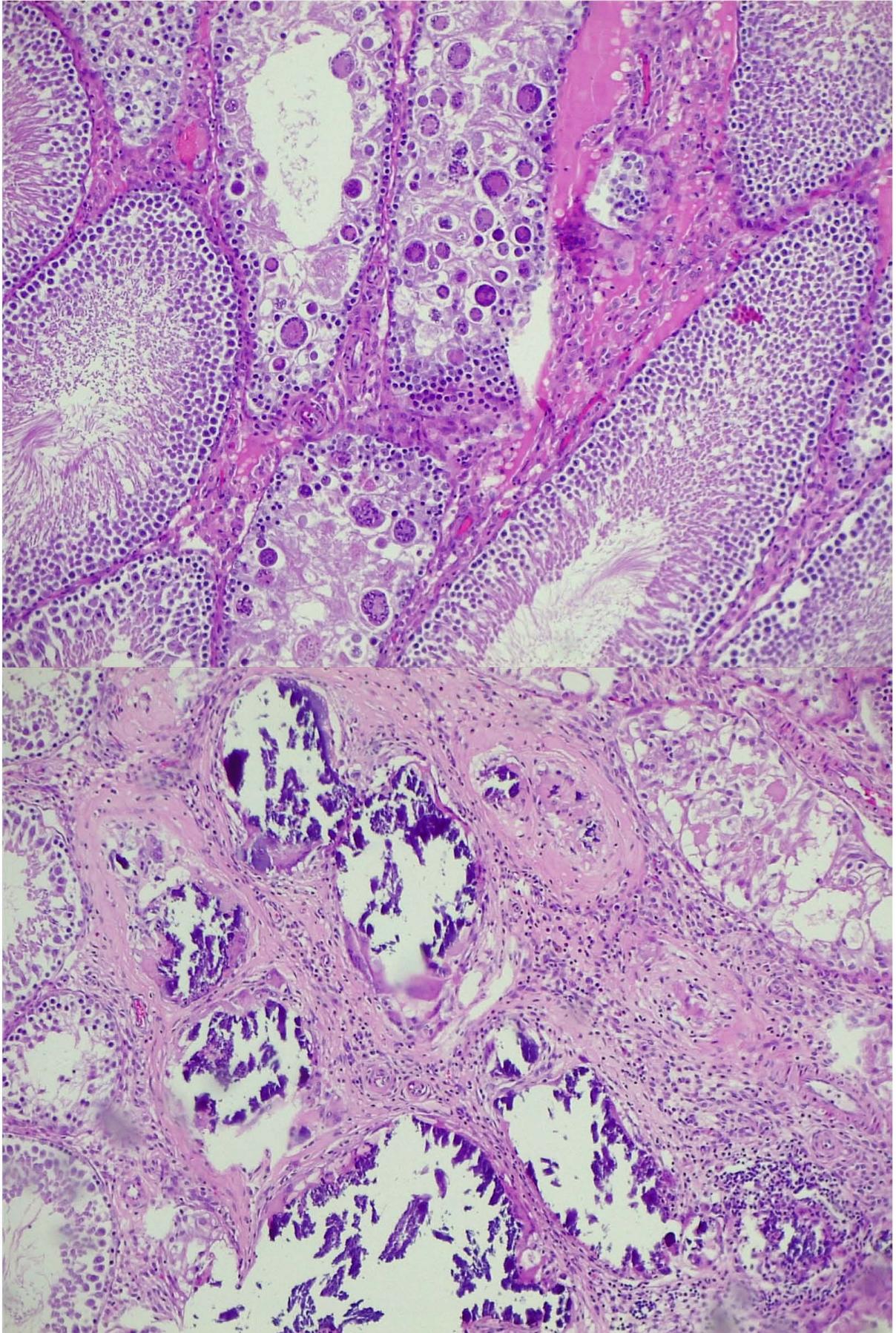


Imagen 43 y 44. *Testículo R12-I. Cepa tumoral ECLI, carga tumoral de 7.5 millones de células. Inflamación crónica con células gigantes tipo cuerpo extraño, calcificación distrófica intratubular. Abundantes células gigantes tipo cuerpo extraño intratubulares.*

Discusión.

Posterior al análisis macroscópico e hispatológico, se vió que todos los testículos mostraron algún grado de alteración en la morfología, en comparación con los testículos que se inyectaron medios de cultivo donde no se mostró ninguna anomalía macroscópica ni microscópica.

Los hallazgos encontrados en todos los casos donde se aplicaron células tumorales humanas fueron similares siendo predominantemente la presencia de una respuesta inflamatoria intersticial intensa, inflamación aguda con microabscesos, células gigantes tipo cuerpo extraño, calcificación distrófica intratubular, atrofia tubular, espermatogénesis disminuida.

Ningún testículo se logró identificar presencia de células tumorales humanas, a pesar de las alteraciones micro macroscópicas presentes, por lo que podemos pensar que éstas células fueron destruidas por parte del sistema inmunológico a pesar de considerar el testículo como un órgano inmunoprivilegiado.

Se cree que la ruptura capsular del testículo al momento de realizar el xenotrasplante con aguja percutánea, permite la entrada de macrófagos y linfocitos que posteriormente conllevan a la destrucción de las células tumorales humanas, por lo que no se logró el desarrollo y crecimiento tumoral. Ésta hipótesis de la falla del crecimiento está basado en la presencia de abundantes células gigantes multinucleadas de reacción a cuerpo extraño presentes en la mayoría de los xenotrasplantes.

La cepa tumoral que provocó el mayor grado de severidad de Respuesta inflamatoria intersticial intensa, inflamación aguda con microabscesos, y con presencia de células gigantes tipo cuerpo extraño, fue la cepa oncológica MCF7. De igual manera se evidenció que a mayor carga tumoral xenotrasplante esta respuesta inflamatoria aguda, crónica y fibrosis provocada fue mayor, siendo este hallazgo significativo cuando se inyectaron en promedio de 10-20 millones de células tumorales.

Conclusiones.

Es posible realizar xenotrasplante de células tumorales humanas en órgano inmunoprivilegiado de modelo animal guiada por laparoscopia.

Las células tumorales humanas no lograron sobrevivir al microambiente del órgano inmunoprivilegiado sin necesidad de inmunosuprimir al modelo animal, esto quizás se deba a la ruptura de la cápsula testicular al momento de realizar la inyección percutánea de las células tumorales, que condiciona la pérdida de la barrera hematotesticular y por ende sus propiedades inmunológicas.

Se pretende seguir con investigaciones necesarias para conseguir crecimiento tumoral en modelo animal sin inmunosupresión con la finalidad de realizar a futuro pruebas diagnósticas genéticas, moleculares o inmunofenotípicas.

Este modelo de investigación podría traer consigo una posible aplicación futura de un antibiograma como apoyo en la terapia dirigida, evaluando in-vivo de la mejor respuesta a quimioterapéuticos u otros fármacos de elección contra células tumorales derivadas de pacientes con cáncer.

Bibliografía.

1. Musser G. Scientific American, Sept. 2005).
2. Donald Maxwell Parkin MD. The Burden of Cancer in the Developing World: 2002. ASCO Educational Book, 2005: 702-718.
3. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global Cancer Statistics, 2002. CA A Cancer Journal for Clinicians 2005;74:108,2005).
4. Albuja Pedro F. Situación de la Prevención Secundaria del Cáncer de cuello uterino y mama en Trujillo, Acta Médica Peruana 2003; XX:6-8.
5. Jemal A, Murray T, Samuels A, et al. Cancer Statistics, 2005. CA A Cancer Journal for Clinicians 2005; 55:10-30).
6. Latest global cancer data: Cancer burden rises to 18.1 million new cases and 9.6 million cancer deaths in 2018. International agency for research on cancer. World Health Organization. Geneva Switzerland. Press Release No. 263. 12 september 2018.
7. Boyd M. The NCI in vitro antitumor drug discovery screen: concept, implementation, and operation, 1985–1995. In: Teicher B, editor. Anticancer drug development guide: preclinical screening, clinical trials and approval. Totowa, NJ: Humana Press; 1997.
8. Venditti JM, Wesley RA, Plowman J. Current NCI preclinical antitumor screening in vivo: results of tumor panel screening, 1976–1982, and future directions. Adv Pharmacol Chemother 1984;20:1–20.
9. Johnson JI, Decker S, Zaharevitz D, Rubinstein LV, Venditti JM, Schepartz S, et al. Relationships between drug activity in NCI pre-clinical in vitro and in vivo models and early clinical trials. Br J Cancer 2001;84:1424–31.

10. Gillet JP, Calcagno AM, Varma S, Marino M, Green LJ, Vora MI, et al. Redefining the relevance of established cancer cell lines to the study of mechanisms of clinical anti-cancer drug resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:18708–13.
11. Hidalgo, M., Amant, F., Biankin, A.V., Budinska´, E., Byrne, A.T., Caldas, C., Clarke, R.B., de Jong, S., Jonkers, J., Mælandsmo, G.M., et al. (2014). Patient-derived xenograft models: an emerging platform for translational cancer research. *Cancer Discov.* 4, 998–1013.
12. Talmadge, J.E., Singh, R.K., Fidler, I.J., and Raz, A. (2007). Murine models to evaluate novel and conventional therapeutic strategies for cancer. *Am. J. Pathol.* 170, 793–804.
13. Rosfjord, E., Lucas, J., Li, G., and Gerber, H.-P. (2014). Advances in patient-derived tumor xenografts: from target identification to predicting clinical response rates in oncology. *Biochem. Pharmacol.* 91, 135–143.
14. Zitvogel, L., Apetoh, L., Ghiringhelli, F., and Kroemer, G. (2008). Immunological aspects of cancer chemotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 59–73.
15. Scheer, N., Snaith, M., Wolf, C.R., and Seibler, J. (2013). Generation and utility of genetically humanized mouse models. *Drug Discov. Today* 18, 1200–1211.
16. Junttila MR, de Sauvage FJ. Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response. *Nature* 2013;501:346–54.
17. Siolas D, Hannon GJ. Patient-derived tumor xenografts: transforming clinical samples into mouse models. *Cancer Res* 2013;73:5315.