

Modello sperimentale di neoplasia epatica nel ratto: descrizione e risultati della tecnica di impianto intraepatico



Ann. Ital. Chir., LXXIV, 5, 2003

F. Giuliani, F. Ardito, M. Di Mugno,
P. Belli*, C. Ponzano, G. Palombini**,
G. Nuzzo

Università Cattolica del Sacro Cuore – Roma
Istituto di Patologia Chirurgica
*Istituto di Radiologia
**Istituto di Patologia Generale

Introduzione

L'epatocarcinoma (HCC) è uno dei tumori più frequenti nel mondo. La sua incidenza negli Stati Uniti è di 6.000-9.000 nuovi casi per anno. In base a recenti studi epidemiologici si stima che nei prossimi anni si assisterà ad un aumento di incidenza soprattutto in relazione all'aumento dell'infezione da virus dell'epatite C (5). La chirurgia (resezione e trapianto) rappresenta l'unico trattamento in grado di offrire una possibilità di guarigione, ma la percentuale di reseccabilità al momento della diagnosi è di circa il 10% (8) e il trapianto presenta le problematiche relative alla ridotta disponibilità di organi. Nell'uno e nell'altro caso la frequenza di recidiva è elevatissima (6). Infatti la sopravvivenza media a 5 anni dei pazienti sottoposti a resezione chirurgica o a trapianto è di circa il 35-40% (6, 7). Le terapie interstiziali, come l'alcolizzazione e la radiofrequenza, possono costituire una valida alternativa alla chirurgia ma non hanno risultati a distanza migliori (9). Attualmente quindi l'HCC è ancora una neoplasia con limitate possibilità di trattamento. Pertanto la disponibilità di modelli animali di HCC per la valutazione di nuove modalità terapeutiche rimane essenziale.

In laboratorio sono stati creati numerosi modelli animali di HCC e sono state utilizzate diverse sedi facilmente accessibili per l'impianto di cellule tumorali, come il tessuto sottocutaneo (10, 12) o la cavità peritoneale (14,

Abstract

EXPERIMENTAL MODEL OF HEPATIC TUMOR IN THE RAT. DESCRIPTION AND RESULTS OF INTRAHEPATIC IMPLANTATION TECHNIQUE

In order to investigate new therapeutic strategies for hepatocellular carcinoma (HCC), an animal model easily reproducible of hepatic tumor is necessary. Several techniques of intrahepatic tumor implantation have been reported in the literature. Many of them have the disadvantage of high rate of artificial neoplastic extrahepatic dissemination, both peritoneal and systemic. These drawbacks interfere with the evaluation of treatment efficacy.

In this study we describe a modified technique of intrahepatic tumor implantation in the rat, previously reported by Yang in 1992, which is based on the insertion in the liver, after neoplastic tissue, of a piece of hemostatic sponge (Spongostan®) that permits to significantly reduce the rate of artificial neoplastic dissemination.

Nine ACI/T rats were used and Morris hepatoma 3924A was implanted in the right hepatic lobe. In all cases an intrahepatic tumor take was documented by MRI and by histological examination. No lung metastases were observed. In only one animal peritoneal and subcutaneous nodules were seen, likely due to a technique mistake. According to tumor growth curve it is possible to observe that, with this technique, a 1 cm tumor nodule is obtainable 10 days after the implantation, without extrahepatic metastases, easily detectable by imaging techniques such as MRI used in this study.

In conclusion this modified technique of intrahepatic tumor implantation permits to obtain an intrahepatic tumor animal model which is easily reproducible and suitable for the evaluation of efficacy of experimental therapies for HCC.

Key words: Liver cancer, rat model, Morris hepatoma.

16). Lo svantaggio di queste tecniche consiste però nell'impossibilità di studiare e valutare le caratteristiche di crescita tumorale all'interno del fegato. Per questo motivo è necessario disporre di un modello tumorale ortotopico e quindi ottenere lo sviluppo di un HCC all'interno del fegato. A questo scopo sono state descritte molte tecniche come l'induzione tumorale con epatocarcinogeni (1) o l'infusione nella vena porta di cellule tumorali (2, 4). Tuttavia anche queste tecniche causano

una diffusione massiva della neoplasia e non permettono di valutare la crescita tumorale intraepatica.

Una tecnica alternativa consiste nell'impianto di un frammento neoplastico nel parenchima epatico per ottenere lo sviluppo di un singolo nodulo di cui possono essere studiate le caratteristiche di crescita e possa essere valutata la risposta al trattamento. Anche questa tecnica, nelle sue descrizioni iniziali, ha come svantaggio una rapida diffusione della malattia che precocemente causa lo sviluppo di metastasi polmonari e carcinosi peritoneale per la disseminazione artificiale del tumore che si verifica durante l'impianto. Yang e coll. hanno sviluppato una tecnica alternativa di impianto intraepatico che consente di ottenere una riduzione significativa della diffusione neoplastica al di fuori del fegato (15).

In questo studio viene riportata la nostra esperienza su un modello animale di neoplasia del fegato utilizzando una tecnica di impianto intraepatico di epatoma di Morris modificata rispetto a quella descritta da Yang.

Materiali e Metodi

Il tumore

L'epatoma di Morris 3924A, un epatocarcinoma a rapida crescita e scarsamente differenziato, è stato indotto in ratti "inbred" ACI/T attraverso la somministrazione nella dieta di N-2 fluorenyldiacetamide nel 1951 (11). Questa linea tumorale viene mantenuta, dai primi anni '70, nel tessuto sottocutaneo di ratti singenici nel Laboratorio dell'Istituto di Patologia Generale dell'Università Cattolica del Sacro Cuore di Roma attraverso un inoculo nel sottocute eseguito ogni settimana.

Gli animali

Per questo studio sono stati utilizzati 9 ratti "inbred" ACI/T di sesso maschile con un peso variabile da 180 a 230 g, di età variabile tra 12 e 16 settimane, stabulati in gabbie ed alimentati con una dieta standard. Gli interventi chirurgici sono stati eseguiti previa anestesia con Ketamina 100 mg/ml alla dose di 800 ml/Kg i.m. e con Medetomidina cloridrato 1 mg/10 ml alla dose di 400 ml/Kg i.m.

Tecnica di impianto intraepatico del tumore

Il tessuto neoplastico è stato ottenuto mediante minuziosa frammentazione con bisturi di frustoli dell'epatoma sottocutaneo sviluppatosi nei ratti dopo circa due settimane. Questi minuti frammenti sono stati poi assemblati in piccoli preparati cuboidali di circa 1 mm³ che corrispondono a circa 1x10⁵ cellule neoplastiche.

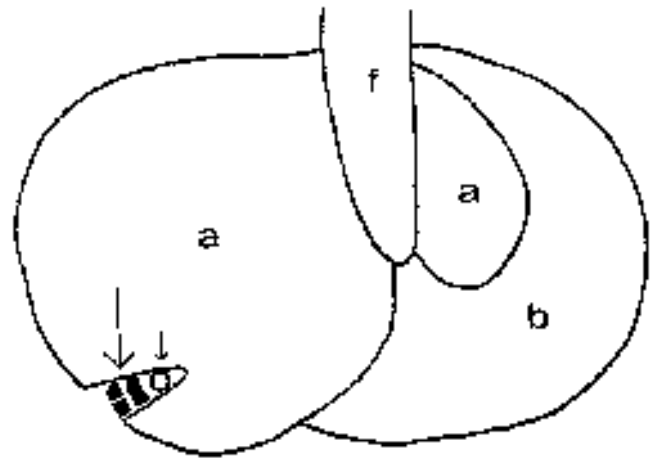


Fig. 1: Rappresentazione schematica assiale del fegato con l'incisione sul lobo destro (a) nella quale sono inseriti i frammenti di tessuto tumorale (freccia corta) e i frammenti di Spongostan® (freccia lunga). b = lobo sinistro del fegato; f = legamento falciforme.

Dopo tricotomia e disinfezione cutanea, i ratti sono stati sottoposti ad una piccola laparotomia sottocostale destra. Previa mobilizzazione del lobo epatico destro all'esterno della cavità addominale, veniva eseguita una piccola incisione superficiale sul parenchima epatico utilizzando una lama da bisturi n. 11, inclinata rispetto alla superficie del fegato di circa 30°. Il tessuto neoplastico veniva posizionato all'interno dell'incisione epatica con una singola manovra. In un solo caso, per difficoltà tecniche, è stato eseguito più di un tentativo di inserimento del tessuto neoplastico nella incisione epatica. Un piccolo frammento di spugna emostatica (Spongostan®) veniva quindi inserito all'interno della tasca epatica, in modo da evitare la dislocazione del tessuto neoplastico e da mantenere l'emostasi dell'incisione (Fig. 1). Dopo aver controllato l'emostasi, il fegato veniva riposizionato all'interno della cavità addominale lasciando in sede il frammento di spugna emostatica, a differenza di quanto descritto nella tecnica di Yang.

La durata della procedura è stata in media di 10 minuti. Il tumore è stato impiantato in tutti i riceventi entro 30 minuti dopo il prelievo dal donatore.

Caratteristiche di Crescita del Tumore

I 9 ratti sono stati suddivisi in tre gruppi di tre animali ciascuno e sono stati sottoposti ad una seconda laparotomia e sacrificati dopo un intervallo di tempo rispettivamente di 10, 14 e 17 giorni dall'impianto del tumore (Tab. I).

In tutti i ratti lo sviluppo della neoplasia è stato documentato con una RM addome (Fig. 2) eseguita in tutti i casi il giorno della seconda laparotomia.

Il volume dell'epatoma sviluppatosi nel fegato è stato cal-

Tab. I – RISULTATI NEI 3 GRUPPI DI RATTI SOTTOPOSTI ALL'IMPIANTO INTRAEPATICO DELLA NEOPLASIA

Gruppo	Peso medio (g)	Mortalità	Intervallo tra impianto e II laparotomia (giorni)	Volume medio del tumore ± DS (mm ³)	Carcinosi peritoneale incidenza (%)	Metastasi polmonari incidenza (%)
1	200	0	10	258 ± 34	0 (0%)	0 (0%)
2	190	0	14	770 ± 229	0 (0%)	0 (0%)
3	230	0	17	1/3 (33%)	0 (0%)	

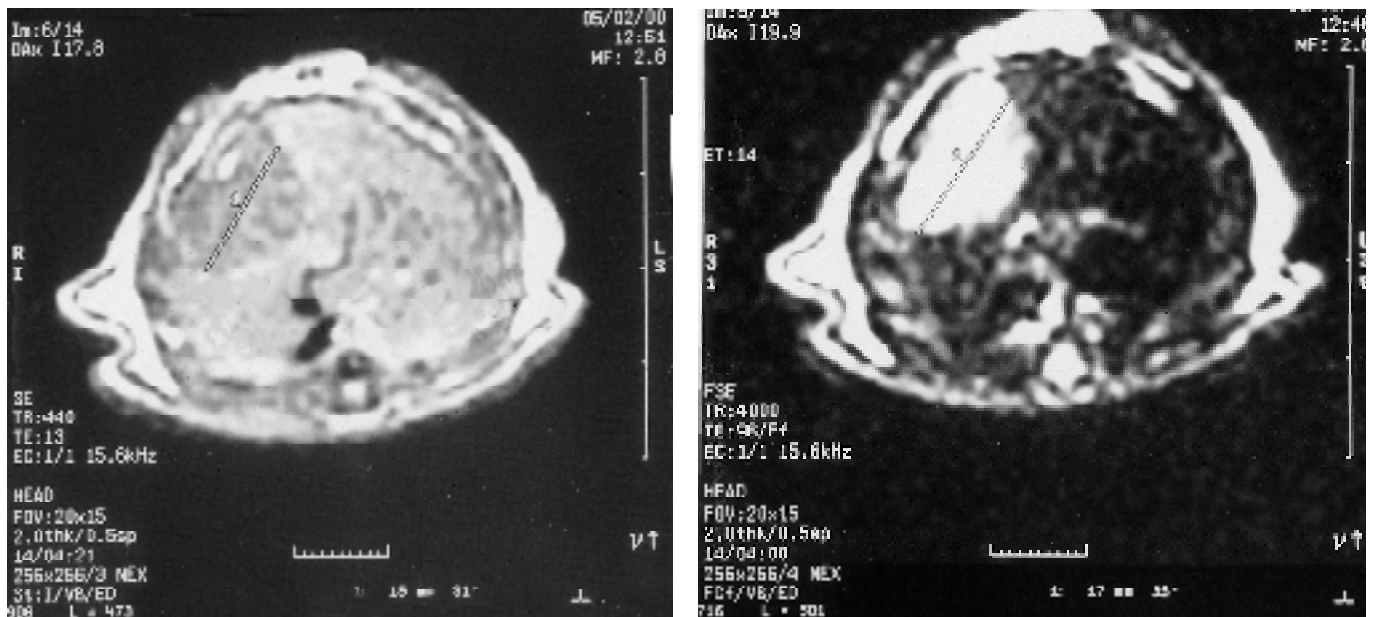


Fig. 2a - 2b: RM addome: scansioni assiali T1 (a) e T2 (b) pesate: neoplasia del lobo dx di circa 15 mm, dopo 14 giorni dall'impianto.

colato, dopo la seconda laparotomia (Fig. 3), con un calibro millimetrato, misurandone la lunghezza (L) e lo spessore (S) secondo la formula (3):

$$\text{Volume tumorale (mm}^3\text{)} = \frac{L \text{ (mm)} \times S^2 \text{ (mm)}}{2}$$

In tutti gli animali, dopo la seconda laparotomia, sono stati esaminati sistematicamente la cavità peritoneale, il fegato e i polmoni per la ricerca di metastasi macroscopicamente evidenti e sono stati eseguiti esami istologici del nodulo neoplastico.

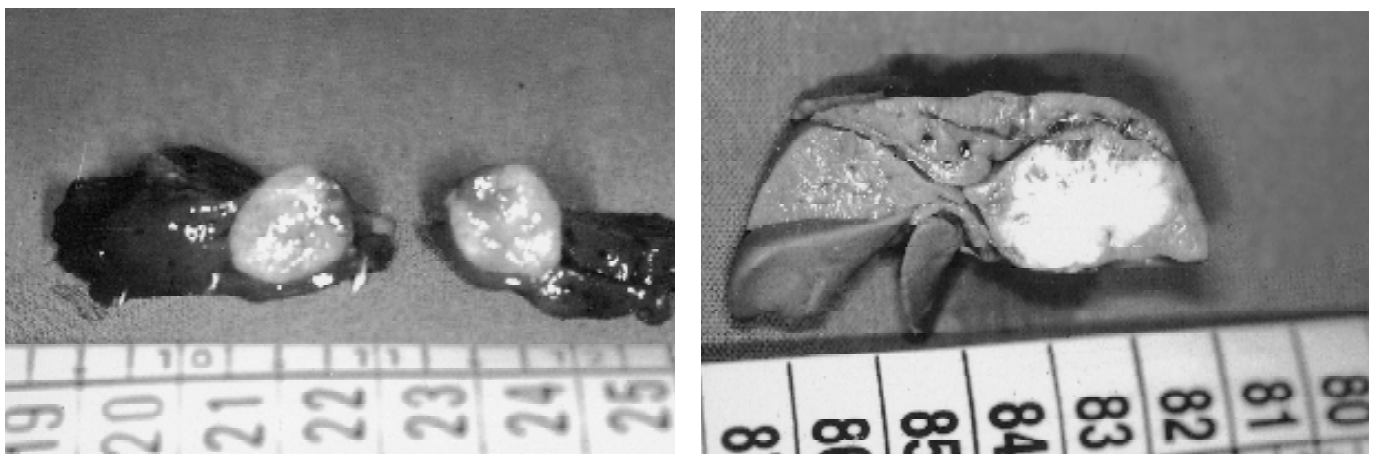


Fig. 3a - 3b: Neoplasia del fegato dopo 14 giorni di circa 1 cm (a) e dopo 17 giorni di circa 2 cm (b).

Risultati

Mortalità e sviluppo del tumore

La mortalità nei tre gruppi di animali sottoposti all'impianto del tumore è stata nulla (Tab. I). In tutti gli animali si è ottenuto lo sviluppo di un nodulo neoplastico intraepatico.

Caratteristiche di crescita del modello tumorale

Dopo l'impianto il tumore tende a crescere localmente nel fegato come nodulo unico. Dieci giorni dopo l'impianto il volume medio dell'epatoma è risultato di $258 \pm 34 \text{ mm}^3$ e dopo 17 giorni ha raggiunto un volume medio di $2987 \pm 883 \text{ mm}^3$ (Tab. I). Solo in un animale, sacrificato al 17° giorno, è stata documentata una disseminazione intra-addominale multipla della neoplasia con metastasi nel fegato, nell'intestino tenue, nella milza, nel peritoneo, con sviluppo anche di un nodulo cutaneo tumorale: si trattava del caso in cui erano stati eseguiti più tentativi di inserimento del tessuto neoplastico all'interno del fegato.

In tutti gli animali all'esame istologico è stato confermata la presenza di un epatocarcinoma capsulato, scarsamente differenziato.

In nessuno dei 9 casi sono state documentate metastasi polmonari.

La curva di crescita dell'epatoma intraepatico 3924A è descritta nella figura 4.

Discussione

Un modello animale di epatocarcinoma (HCC) rimane indispensabile per lo studio della vascolarizzazione della neoplasia, delle sue caratteristiche radiologiche e per gli studi di terapia sperimentale. Ma, mentre per i primi

due tipi di studio, la presenza di diffusione di malattia con carcinosi peritoneale e metastasi polmonari non interferisce con i risultati, per gli studi di terapia sperimentale è necessario avere un modello tumorale animale esclusivamente intraepatico.

I due problemi legati all'impianto intraepatico sono il sanguinamento che si verifica al momento dell'incisione sul fegato e la difficoltà da parte del parenchima epatico ad accogliere l'impianto. L'emorragia e la presenza di tensione nella tasca creata possono causare la fuoriuscita dell'impianto tumorale dal fegato e quindi una disseminazione neoplastica peritoneale. La tecnica proposta da Yang permette, controllando l'emorragia con il Gelfoam, di diminuire in modo significativo il rischio di disseminazione neoplastica artificiale che si verifica durante l'impianto del tumore. Infatti l'utilizzo della spugna emostatica arresta il sanguinamento che si verifica durante l'impianto e permette la formazione di una tasca intraepaticale priva di tensione che mantiene in sede l'impianto neoplastico.

Rispetto alla tecnica originale, in questo studio è stata utilizzata una incisione sottocostale destra piuttosto che una incisione mediana e l'impianto tumorale è stato eseguito nel lobo destro. Inoltre la spugna emostatica è stata inserita dopo l'impianto del tumore ed è stata lasciata in sede, a differenza di quanto descritto da Yang, con lo scopo di chiudere la tasca parenchimale ed evitare la dislocazione dell'impianto neoplastico. La manovra di inserimento del tessuto tumorale nella incisione epatica deve essere eseguita in un unico tempo, senza ripetuti tentativi che possono essere causa di emorragia e di disseminazione neoplastica, come avvenuto verosimilmente in uno degli animali di questo studio.

In base alla curva di crescita tumorale ottenuta si ricava che con questa linea cellulare e con questa tecnica di impianto è possibile ottenere un nodulo neoplastico di quasi 1 cm già dopo 10 giorni dall'impianto, facilmente rilevabile con tecniche di immagine come la RM utilizzata in questo studio. I nostri risultati confermano i vantaggi della tecnica di Yang da noi ulteriormente semplificata, che per la sua facilità e rapidità di esecuzione, permette di ottenere un modello valido di neoplasia epatica animale per studi sperimentali di terapia.

Ringraziamenti

Si ringrazia il Dr. Renzo Filippetti, responsabile dello Stabulario della Università Cattolica del Sacro Cuore di Roma, e tutto il personale del servizio per la loro eccellente assistenza tecnica.

Riassunto

Per lo studio sperimentale di nuove strategie terapeutiche per l'epatocarcinoma (HCC) è necessario disporre di

Fig. 4: Curva di crescita intraepatica dell'epatoma di Morris 3924A.

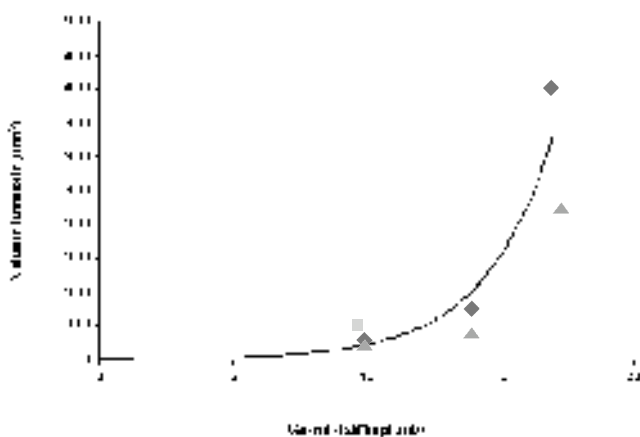


Fig. 4: Curva di crescita intraepatica dell'epatoma di Morris 3924A.

un modello animale di neoplasia epatica facilmente riproducibile. Nel corso degli anni sono state sviluppate numerose tecniche di impianto tumorale intraepatico, molte delle quali hanno come limite un'elevata percentuale di disseminazione neoplastica artificiale extraepatica, peritoneale e sistemica. Questi inconvenienti interferiscono con la valutazione della efficacia dei trattamenti. In questo studio è descritta una tecnica di impianto tumorale intraepatico nel ratto modificata rispetto a quella proposta da Yang nel 1992, che prevede l'inserimento, dopo il tessuto neoplastico, di un frammento di spugna emostatica (Spongostan®) che permette di ridurre in modo significativo la percentuale di diffusione neoplastica artificiale.

Sono stati utilizzati 9 ratti ACI/T, impiantando nel lobo destro del fegato l'epatoma di Morris 3924A. In tutti i casi è stato ottenuto lo sviluppo di un nodulo neoplastico intraepatico documentato con RM ed esame istologico. Non si sono osservate metastasi polmonari. In un solo animale si è sviluppata carcinoma peritoneale con un nodulo sottocutaneo, verosimilmente per un errore di tecnica. In base alla curva di crescita tumorale si ricava che con questa metodica è possibile ottenere una neoplasia di quasi 1 cm dopo circa 10 giorni dall'impianto, facilmente rilevabile con tecniche di immagine come la RM utilizzata in questo studio.

In conclusione la tecnica descritta di impianto tumorale intraepatico permette di ottenere modelli animali di tumore intraepatico riproducibili e adatti alla valutazione dell'efficacia di terapie sperimentali per l'epatocarcinoma.

Parole chiave: Epatocarcinoma, modello animale, epatoma di Morris.

Bibliografia

- 1) Ackerman N.B., Makohon S.: *The blood supply of experimental liver metastases. Further studies on increased tumor vascularity caused by epinephrine*. Microcirc Endothelium Lymphatics, 1:547, 1984.
- 2) Burgener F.A., Violante M.R.: *Comparison of hepatic VX2 carcinoma after intra-arterial, intraportal and intraparenchymal tumor cell injection. An angiographic and computed tomographic study in the rabbit*. Invest Radiol, 14:410, 1979.
- 3) Carlsson G., Gullberg B., Hafström L.: *Estimation of liver tumor volume using different formulas-An experimental study in rats*. J Cancer Res Clin Oncol, 105:20, 1983.
- 4) de Brauw L.M., van de Velde C.J.H., Tjaden U.R., de Bruijn E.A., Bell A.V.R.J., Hermans J. Zwaveling A.: *In vivo isolated liver perfusion technique in a rat hepatic metastasis model: 5-fluorouracil concentrations in tumor tissue*. J Surg Res, 44:137, 1988.
- 5) Deuffic S., Poynard T., Valleron A.J.: *Correlation between hepatitis C virus prevalence and hepatocellular carcinoma mortality in Europe*. J Viral Hepat, 6:411-3, 1999.
- 6) Farges O., Regimbeau J.M., Belghiti J.: *Aggressive management of recurrence following surgical resection of hepatocellular carcinoma*. Hepatogastroenterology, 45 (Suppl.) 3:1275-80, 1998.
- 7) Kawasaki S., Makuuchi M., Miyagawa S., Kakazu T., Hayashi K., Kasai H., Miwa S., Hui A.M., Nishimaki K.: *Results of hepatic resection for hepatocellular carcinoma*. World J Surg, 19:31-36, 1995.
- 8) Lau H., Man K., Fan S.T., Yu W.C., Lo C.M., Wong J.: *Evaluation of preoperative hepatic function in patients with hepatocellular carcinoma undergoing hepatectomy*. Br J Surg, 84:1255-1259, 1997.
- 9) Livraghi T., Goldberg S.N., Lazzaroni S., Meloni F., Ierace T., Solbiati L., Gazelle G.S.: *Hepatocellular carcinoma: Radio-frequency ablation of medium and large lesions*. Radiology, 214: 761-768, 2000.
- 10) Looney W.B., Hopkins H.A.: *Solid tumors as a model for the development of antineoplastic therapy*. In H. Busch and L.C. Yeoman (Ed.) *Methods Cancer Res*. Academic Press, XIX, 304-384, New York, 1982.
- 11) Morris H.P., Slaughter L.J.: *Historical development of transplantable hepatomas*. In Morris H.P., Criss W.E. (Ed.) *Adv. Exp. Med. Biol.* New York, London, Plenum Press, Vol. 92, 1-19, 1978.
- 12) Novikoff A.B.: *A transplantable rat liver tumor induced by 4-dimethylaminoazobenzene*. Cancer Res., 17:1010, 1957.
- 13) Roberts J.P., Liu T., Freise C.E., Mielczarek J., Ferrell L., Randall H., Ascher N.L.: *Liver transplantation improves survival of rats bearing hepatoma-3924A*. J Surg Res, 65:59-62, 1996.
- 14) Watabe H., Hirai H.: *Production of α -fetoprotein by transplantable rat hepatoma*. In H. Hirai and T. Miyaji (Ed.) *GANN Monograph Cancer Res No 14*, Baltimore, London, Tokyo, University Park Press, 279-287, 1973.
- 15) Yang R., Rescorla F.J., Reilly C.R., Faught P.R., Sanghvi N.T., Lumeng L., Franklin T.D., Grosfeld J.L.: *A reproducible rat liver cancer model for experimental therapy: introducing a technique of intrahepatic tumor implantation*. J Surg Res, 52:193-198, 1992.
- 16) Yoshida T.: *Contributions of the ascites hepatoma to the concept of malignancy of cancer*. Ann N Y Acad Sci, 63:852, 1956.

Autore corrispondente:

Dott. Felice GIULIANTE
Istituto di Patologia Chirurgica
Università Cattolica del Sacro Cuore
L.go A. Gemelli, 8
00168 ROMA
Tel.: 06-30154967
E-mail: fgiuliant@rm.unicatt.it

