

Original

Estudio comparativo de tres modelos de melanomas murinos: Harding-Passey, B16 y B16F10*

V. Vicente-Ortega¹, J. Rodríguez-Vicente¹, M. Alcaraz-Baños², M. Canteras-Jordana³, J. Yáñez-Gascón⁴ y F. Calderón-Rubiales⁵

Departamentos de ¹Anatomía Patológica, ²Radiología y Medicina Física y ³Bioestadística, Facultad de Medicina, Universidad de Murcia; ⁴Fundación Séneca, Centro de Coordinación de la Investigación, Región de Murcia, y ⁵Servicio de Microscopia Electrónica, Universidad de Murcia.

SUMMARY

Background: We studied the clinical pathological, ultrastructural and biological behavior of three lines of murine melanomas: Harding-Passey, B16 and B16F10. Material and methods: 80 C57Bl/6J mice were used. A total of 10⁶ tumoral cells in suspension were subcutaneously injected into the inguinal area of each mouse. Samples of in vivo tumors were taken for microscopic and ultrastructural study. Statistical study of several parameters was also carried out. Results: The three lines led to easily transplantable tumors. The Harding-Passey showed the slowest growth, the lowest mean weight, the lowest mitotic index and the highest host survival. The B16 showed a mean tumoral weight double that of the Harding-Passey, a slightly higher mitotic index and a lower host survival. B16F10 tumors showed the highest growth capacity, with tumor weights six- and four fold greater than those of the Harding-Passey and the B16, respectively, and showed a greater mitotic index and a mean survival half that of the other two groups. Conclusions: The three lines are good experimental models for studying melanoma. The tumors showed different behavior and variable proliferation rates; B16F10 had greatest growth, and the low survival of host provides an ideal model for short-term studies. Rev Esp Patol 2001; 34(2): 103-109.

Key words: Melanoma - Harding-Passey - B16 - B16F10 - Morphology - Ultrastructure

RESUMEN

Planteamiento: Estudiamos las características clinicopatológicas, ultraestructurales y el comportamiento biológico de tres líneas de melanomas murinos: Harding-Passey, B16 y B16F10. Material y métodos: Se han utilizado 80 ratones C57Bl/6J, a los que se inyectó una suspensión de 10⁶ células tumorales por vía subcutánea a nivel inguinal. Se procesaron muestras de los tumores para el estudio microscópico óptico y electrónico. Se realizó el estudio estadístico. Resultados: Las tres líneas originaban tumores fácilmente transplantables. De los tres modelos, el Harding-Passey supone el tumor de crecimiento más lento, presentando los menores pesos medios, el menor índice mitótico y una supervivencia mayor de los animales huéspedes. El B16 muestra un crecimiento intermedio con pesos tumorales de casi el doble que el anterior, un índice mitótico ligeramente superior y una supervivencia de los ratones lige-

*Este trabajo se ha realizado con una ayuda de la Unión Europea (ayuda nº 1FD97-0576).

ramente inferior. El B16F10 muestra la mayor capacidad de crecimiento, siendo los pesos medios de los tumores seis y cuatro veces mayores, respectivamente, que los de Harding-Passey y B16, con un índice mitótico más alto y una supervivencia de los animales inferior a la mitad de los anteriores. Conclusiones: Las tres líneas estudiadas constituyen modelos experimentales idóneos para el estudio del melanoma. Los tumores muestran un comportamiento biológico distinto, con una capacidad proliferativa variable, siendo el B16F10 el de mayor crecimiento. La baja supervivencia de los animales hace que sea un modelo ideal para estudios cortos. Todos mostraban alteraciones en la ultraestructura de los melanosomas. **Rev Esp Patol 2001; 34(2): 103-109.**

Palabras clave: Melanoma - Harding-Passey - B16 - B16F10 - Morfología - Ultraestructura

INTRODUCCIÓN

El melanoma Harding-Passey surgió de forma espontánea en el año 1930, en la oreja de un ratón no híbrido (Harding, 1930), y desde entonces se ha mantenido a través de trasplantes sucesivos en ratones sanos o bien mediante cultivos celulares. Dada la facilidad con que prende en el huésped ha sido muy utilizado como modelo experimental para el estudio del melanoma, aunque diversos trabajos (Maekawa, 1970; Seizi, 1971) han mostrado resultados muy variables respecto a su comportamiento biológico, lo que quizás explique que haya ido disminuyendo progresivamente su utilización.

Veinticinco años más tarde surge también de forma espontánea el llamado melanoma B16, en la piel de la base de la oreja de un ratón híbrido C57Bl/6J, que aunque mostró una mayor facilidad de trasplante que el anterior también presentaba variabilidad en su comportamiento biológico (Demopoulos, 1965; Bertalanffy, 1984; Surgiura, 1984). A partir de los trabajos de Wosko en 1985 comienzan a establecerse una serie de variantes de líneas celulares del B16, de agresividad progresiva (F1 a F10), de las que la F10 ha mostrado una mayor agresividad con una alta capacidad metastatizante, por lo que en la actualidad se utiliza frecuentemente en estudios experimentales de distinta naturaleza (Palomares, 1995; Hofer, 1998; Ambs, 1998; Cameron, 2000).

El objetivo de nuestro trabajo ha consistido fundamentalmente en el estudio comparativo de las características clinicopatológicas y de comportamiento biológico de tres modelos experimentales de melanoma en ratón: Harding-Passey, B16 y B16F10.

MATERIAL Y MÉTODOS

Hemos utilizado 80 ratones C57Bl/6J de seis semanas de edad y 20 g de peso al comienzo del estudio. Los

melanomas procedían del Institute of Cancer Research, Royal Cancer Hospital de Londres, que hemos mantenido en cultivos celulares y por implantes sucesivos en ratones. A cada animal se le inyectó 0,5 ml de la suspensión de 10^6 células tumorales viables en medio de cultivo por vía subcutánea a nivel inguinal. El sacrificio de los animales se realizó a los 14 días del implante, ya que la mayoría de los animales a los que se inyectó el B16F10 moría a partir del día 15 por caquexia, ulceraciones extensas o invasión intraperitonea (el animal que murió durante el experimento no se ha incluido en el trabajo).

Muestras de los tumores y las vísceras fueron fijadas en formol neutro tamponado al 10%, incluidas en parafina por el método habitual, seccionadas a 4 μ m y teñidas con hematoxilina-eosina (HE). Para conocer las características clinicobiológicas y morfológicas estudiamos los pesos tumorales, la capacidad proliferativa de los melanocitos neoplásicos a través del índice mitótico según el número de mitosis por 1000 células al azar en cada tumor, y la evolución en un grupo de animales de cada línea hasta su muerte.

Para el estudio ultraestructural, fragmentos de 1 mm³ fueron fijados en glutaraldehído, posfijados en tetróxido de osmio y teñidos con acetato de uranilo al 2%. Tras la deshidratación y aclarado con óxido de propileno se impregnaron en resinas epoxy. Los cortes ultrafinos se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo. El estudio ultraestructural y fotográfico se realizó con un microscopio electrónico ZEISS EM 10 C.

En el estudio estadístico se ajustó una regresión exponencial a los pesos de los tumores de las líneas Harding-Passey y B16 en función del día del implante tumoral. De esta regresión se estimó el peso medio correspondiente a los 14 días postimplante, que se comparó estadísticamente con el peso medio de los tumores de la línea B16F10.

RESULTADOS

Las células tumorales de las tres líneas prendieron en todos los animales excepto en uno de los 26 ratones implantados con Harding-Passey, siendo los tumores palpables hacia el final de la primera semana. A los 14 días y tras el sacrificio de los animales las características macroscópicas más relevantes en la línea Harding-Passey se presentaban como masas nodulares irregulares, localizadas en el tejido subcutáneo; al extirparlas mostraban contornos bien definidos, y estaban delimitadas por una fina cápsula de aspecto conjuntivo que con frecuencia englobaba al tejido muscular y adiposo adyacentes (Fig. 1a). Todos los tumores eran de coloración negra intensa y consistencia blanda, y al seccionarlos mostraban zonas friables de coloración blanco-grisácea y extensión irregular. Ningún tumor estaba ulcerado en este período. Los B16 mostraban características superponibles, excepto por el aspecto más sólido y carnoso y la coloración parduzca (Fig. 1b), y a la sección mostraban áreas irregulares rojizas y amarillentas de consistencia friable. Los correspondientes a la línea B16F10 –aunque en general consistían en masas nodulares– eran de morfología muy irregular, con extensiones hacia los tejidos muscular y adiposo adyacentes, e incluso envolvían las estructuras óseas de la pata (Fig. 1c), infiltrando la piel y originando áreas de extensa ulceración en la mayoría de los casos. Mostraban una consistencia friable, lo que junto al hecho de estar delimitados sólo

parcialmente por una pseudocápsula conjuntiva muy delgada dificultaba su extracción pues solían fragmentarse. La coloración era intensamente negra en todos los tumores.

Respecto a los pesos tumorales, encontramos que los pesos medios de la línea B16F10 eran significativamente superiores a los pesos medios de las líneas Harding-Passey ($p < 0.001$) y B16 ($p < 0.01$). Los pesos medios en las tres líneas por día se expresan en la Tabla 1, y las regresiones ajustadas así como las predicciones para el día 14 se indican en la Tabla 2.

Microscópicamente el parénquima tumoral en las tres líneas estaba constituido por pequeños grupos de melanocitos dispuestos de forma compacta y delimitados por un fino entramado reticulínico así como numerosos capilares sanguíneos. La necrosis tumoral era frecuente, y se disponía en áreas irregulares con predominio por las zonas centrales, con infiltrados de polinucleares neutrófilos y linfocitos en la periferia. Los melanocitos mostraban una morfología redondeada o poligonal con moderado pleomorfismo excepto en el B16F10, donde se observaban frecuentes melanocitos gigantes, e incluso con varios núcleos de morfología redondeada con frecuentes muescas y varios nucléolos voluminosos y eosinófilos. Los citoplasmas eran en general amplios y ligeramente eosinófilos, con abundante pigmento melánico en Harding-Passey y B16F10, mientras que éste pasaba desapercibido en B16, donde estaba constituido por pequeños gránulos que delimitaban a la membrana



Figura 1. Características macroscópicas de las tres líneas de melanomas murinos: a) Harding-Passey, b) B16 y c) B16F10.

Tabla 1. Pesos tumorales medios de las líneas Harding-Passey, B16 y B16F10 por día en gramos.

Harding-Passey		B16		B16F10	
Días	Media	Días	Media ± DE	Días	Media ± DE
10	0,23	11	0,43±0,09	14	3,62±1,95
14	0,57	18	4,88±0,53		
20	2,02	25	9,38±0,78		
25	3,74				

celular cuando se estudiaba con la técnica de Fontana-Masson en todos los melanocitos de esta última línea (Fig. 2 a-c).

El índice mitótico variaba en cada línea: aumentaba progresivamente desde el Harding-Passey, en el que oscilaba entre 8 y 9/1000 células, hasta 10 u 11 en el B16 y mucho mayor en el B16F10 (de 13 a 14/1000 células).

Ultraestructuralmente, los melanocitos en las tres líneas se disponían de forma compacta con predominio de la morfología redondeada o poligonal y contornos bien definidos, aunque con ocasionales prolongaciones dendríticas. Solían predominar los núcleos redondeados u ovoides con frecuentes indentaciones de la membrana nuclear, preferentemente en B16F10, así como la multilobulación. La eucromatina se disponía en granos finos mientras que la heterocromatina formaba gruesos grumos de distribución irregular engrosando la membrana. Los nucléolos solían ser voluminosos, irregulares y con frecuencia múltiples (Fig. 3b).

Los citoplasmas solían mostrar una electronodensidad moderada con abundantes organelas características, así como numerosos melanosomas, con predominio en Harding-Passey (Fig. 3a) y B16F10 de los maduros o estadios III y IV, así como de frecuentes melanosomas

aberrantes caracterizados por la irregularidad en la estructura interna, con patrones laminar irregular, concéntrico, granular y vesicular, e incluso en grumos gruesos. Una característica distintiva del B16F10 correspondía a la frecuente observación de complejos melanosómicos de gran tamaño que estaban constituidos por numerosos melanosomas en distintos estadios de maduración, y a las habituales alteraciones de su estructura interna que los mostraban rodeados de membranas semejando fagolisosomas (Fig. 3c).

En cuanto al comportamiento clinicobiológico del grupo de animales dejados a su evolución, en las tres líneas tumorales observamos que en el Harding-Passey prendieron excepto en un caso, siendo palpables como masas irregulares al día 6 o 7 postimplante y desde el 10-12 hacían prominencia sobre la superficie cutánea, alcanzando un diámetro de 4 a 5 cm hacia el día 30, cuando la ulceración cutánea ya era constante. La muerte de los animales de este grupo ocurría entre 35 y 40 días por caquexia y/o sepsis, observándose excepcionales metástasis pulmonares (sólo en un ratón) representadas por múltiples nódulos de coloración negra. En el B16 prendieron el 100%, haciéndose palpables a los cinco o seis días, y producían progresivamente una prominencia sobre la superficie cutánea a partir de la

Tabla 2. Regresiones ajustadas y predicciones para el día 14.

Línea	Regresión Y=ln (1+peso) t=días	Predicción (14 días)		
		Estimación	D.t.	p
Harding-Passey	Y=-0,6917+0,0899 t	0,57	10-4	**
B16	Y=-1,0610+0,1415 t	0,9	0-35	*
B16F10		3,62	1,95	

*p<0.01 al comparar B16 con B16F10.

**p<0.001 al comparar Harding-Passey con B16F10.

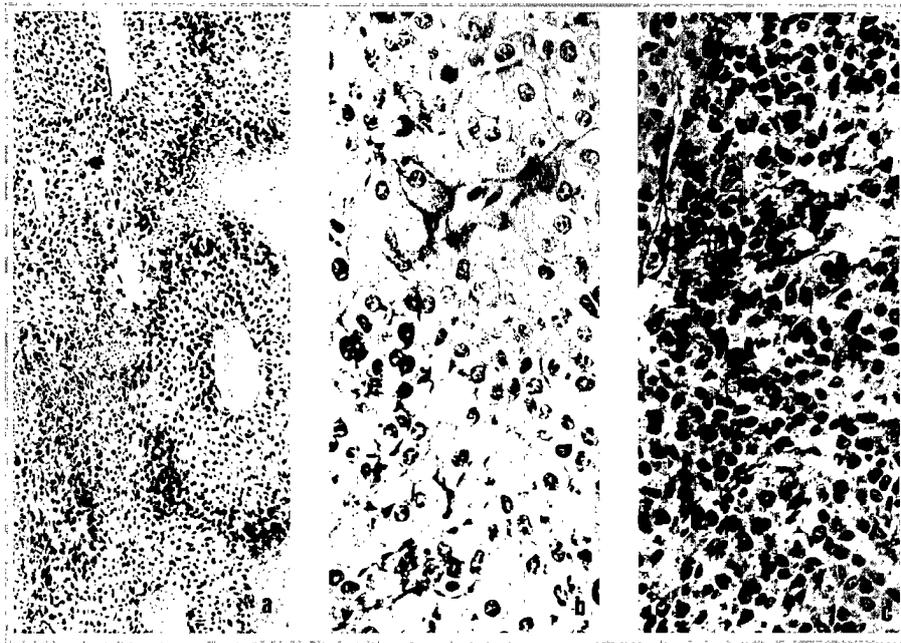


Figura 2. Visión microscópica del parénquima tumoral en las tres líneas de melanomas murinos: a) Harding-Passey, b) B16 y c) B16F10.

segunda semana, fijándose a la piel y ulcerándola. Los animales morían entre los días 25 y 30 postimplante, por caquexia y/o sepsis, observándose también excepcionales metástasis constituidas por múltiples nódulos pulmonares dispuestos al azar.

En el B16F10 también prendían todos los tumores, haciéndose palpables a partir del día 4 o 5 con un crecimiento rápido, de modo que desde el día 7 u 8 hacían prominencia cutánea y se ulceraban a partir de los días 10 a 12. Al día 14 formaban grandes masas nodulares

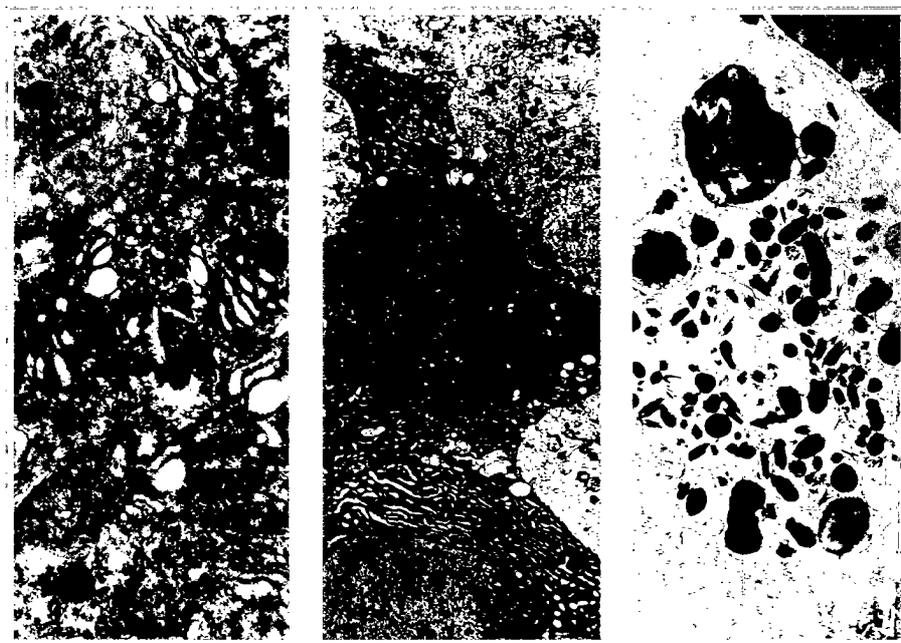


Figura 3. Imagen ultraestructural de las tres líneas de melanomas murinos: a) Harding-Passey, b) B16 y c) B16F10.

irregulares con frecuente extensión hacia los territorios adyacentes, e incluso invadían la articulación de la pata así como la cavidad peritoneal, donde englobaban a distintos órganos (intestino, riñón, bazo, etc.) aunque sin infiltrarlos. La mayoría de los animales moría entre los días 14 y 15 postimplante, y las metástasis eran frecuentes en pulmones que presentaban múltiples nódulos de una intensa coloración negra y distribución al azar.

DISCUSIÓN

En la Cátedra de Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Murcia disponemos de tres líneas de melanomas murinos: en 1983 iniciamos Harding-Passey (Vicente, 1988), en 1984 B16 (Gómez Zapata, 1987), y la variante más agresiva de éste, la B16F10, ha sido desarrollada recientemente. Hemos mantenido las tres líneas a través de cultivos celulares y mediante trasplantes sucesivos en ratones C57Bl/6J según el método de Geran (1972). Las líneas procedían del Institute of Cancer Research de Londres, lo que nos ha permitido conocer detalladamente sus características morfológicas así como su comportamiento clinicobiológico y evolutivo *in vivo*.

Las tres líneas originan tumores fácilmente trasplantables mediante la inyección subcutánea de la suspensión en medio de cultivo de 10^6 células tumorales viables, ya que el grado de prendimiento suele ser total, como también se ha descrito en la mayoría de los trabajos publicados previamente (Li, 1984; Kanclerz, 1986). En nuestro estudio prendieron en todos los casos excepto en un ratón del grupo implantado con Harding-Passey. Este método supera en resultados al utilizado anteriormente con mayor frecuencia, que consistía en implantar fragmentos tumorales de 2 a 4 mm mediante trocar (Wosko, 1984), con el que no se superaba el 95% de prendimientos y además mostraba el inconveniente añadido de no poder conocer con exactitud el número de células implantadas.

De los tres modelos el Harding-Passey supone el tumor de crecimiento más lento, como así lo demuestra el hecho de que presente los menores pesos medios y el menor índice mitótico y una supervivencia mayor para los animales huéspedes. No obstante, en nuestro estudio presentaba una tasa de crecimiento mayor que en los previos realizados por Maekawa (1970) y Surgiura

(1984), en los que se hacían palpables dos semanas más tarde que en el nuestro (a la tercera semana) y alcanzaban los diámetros mayores (de 4 a 5 cm hacia el cuarto mes). La muerte de los ratones ocurría hacia el quinto mes postimplante, mientras que los de nuestro estudio no sobrevivían más de 40 días. También la capacidad metastásica era muy limitada en este tumor, pues las metástasis eran excepcionales y exclusivamente se localizaban en los pulmones.

El B16 muestra un crecimiento intermedio con pesos tumorales de casi el doble que los del Harding-Passey y un índice mitótico ligeramente superior, así como una supervivencia de los ratones ligeramente inferior, lo que coincide con las características descritas previamente por Bertalanffy (1984) y en nuestro país por López Bran en 1987. A diferencia de la línea anterior, los tumores no solían ulcerarse y la coloración era en todos pardo-rojiza, con áreas lineales irregulares, amarillentas y friables que correspondían a la necrosis tumoral. En este aspecto, sin embargo, difiere de lo descrito por Wosko (1984), para quien los tumores B16 estaban intensamente pigmentados. No obstante, en nuestros casos, aunque macroscópicamente no mostraban pigmentación, microscópicamente las técnicas argentícas presentaban pequeños gránulos de melanina que delimitaban la membrana celular individualizando a cada melanocito, lo que se correspondía con el predominio ultraestructural de los melanosomas inmaduros tipos I y II.

El B16F10 muestra la mayor capacidad de crecimiento, los pesos medios de los tumores eran seis y cuatro veces mayores que los de Harding-Passey y B16, respectivamente, con un índice mitótico bastante más alto y una supervivencia de los animales inferior a la mitad de la de los anteriores. Macroscópicamente eran masas mucho más irregulares, con parcial encapsulación y múltiples extensiones irregulares hacia los tejidos adyacentes e incluso invasión peritoneal. Microscópicamente también mostraban mayor pleomorfismo con núcleos aberrantes y múltiples áreas de necrosis, y mayor grado de pigmentación melánica. Este pleomorfismo también lo observamos a nivel ultraestructural con núcleos más irregulares, destacando la presencia de complejos melanosómicos más frecuentes y de mayor volumen que en las otras dos líneas y, sobre todo, constituidos por melanosomas de distinto grado de melanización y con alteraciones de la estructura interna como los de los melanosomas individualizados. Estas altera-

ciones han sido consideradas por distintos autores como un signo ultraestructural de atipia melanocítica (Takahasi, 1987; Rhodes, 1988; Langer, 1990; Vicente, 1995).

En conclusión, las tres líneas estudiadas constituyen modelos experimentales idóneos para el estudio del melanoma. No obstante, los tumores muestran un comportamiento biológico distinto, con una capacidad proliferativa variable, siendo el B16F10 el de mayor grado de crecimiento, pues los pesos medios al día 14 eran seis y cuatro veces mayores que los de Harding-Passey y B16, respectivamente, y mostraban una mayor agresividad local con invasión intraperitoneal, así como mayores índice mitótico, pleomorfismo celular y aberraciones melanosómicas. Además la baja supervivencia de los animales hace que sea un modelo ideal para estudios cortos.

BIBLIOGRAFÍA

- Ambs S, Denis S, Fairman J, Wright M, Papkoff J. *Inhibition of tumor growth correlates with the expression level of human angiostatin transgene in transfected B16F10 melanoma cells.* Cancer Res 1999; 59: 5773-5777.
- Bertalanffy FD, McAskill C. *Rate of cell of malignant mouse melanoma B16.* J Natl Cancer Inst 1984; 32: 535-545.
- Cameron MD, Schmidt EE, Kerkvliet N y cols. *Temporal progression of metastasis in lung: Cell survival, dormancy and location dependence of metastatic inefficiency.* Cancer Res 2000; 60: 2541-2546.
- Demopoulos HB, Kasuga T, Channing AA, Bagdoyan H. *Comparison of ultrastructures of B16 and S-91 mouse melanomas, and correlation with growth patterns.* Lab Invest 1965; 14: 109-121.
- Geran RI, Greenberg NH, McDonald MM, Schumacher AM, Abbot BJ. *Protocols for screening chemical agents and natural products against animal tumor and other biological systems.* Cancer Chemother Rep 1972; 33: 7-63.
- Gómez Zapata M, Hernández-Gil A, Ochotorena MM, Vicente Ortega V, Campos Aranda M. *Melanoma B16. Estudio clínico-patológico, ultraestructural y del comportamiento biológico.* Actas Dermosifiliogr 1987; 78: 755-761.
- Harding HE, Passey RD. *A transplantable melanoma of the mouse.* J Pathol Bacteriol 1930; 33: 417-427.
- Hofer SO, Shrayder D, Reichner JS, Hoekstra HJ, Wanebo HJ. *Wound-induced tumor progression: A probable role in recurrence after tumor resection.* Arch Surg 1998; 133: 383-389.
- Kancelerz A, Chapman JD. *The treatment of animal tumour and their metastases with 4-hydroxyanisole.* Br J Cancer 1986; 54: 693-698.
- Langer K, Rappersberger K, Steiner A, Konrad K, Wolff K. *The ultrastructure of dysplastic naevi: Comparison with superficial spreading melanoma and common naevocellular naevi.* Arch Dermatol 1990; 282: 353-362.
- Li X, Paulis G, Atassi G, Buysens N. *Growth response of B16 melanoma to in vivo treatment with 1-(1-chloroethyl)-3-cyclohexyl-1-nitrosourea (CCNU) at the initial stage after tumour transplantation.* Am J Pathol 1984; 115: 403-411.
- López Bran E, Robedo Aguilar A. *Estudio clínico de un melanoma B16 trasplantado a un ratón C57BL/6J.* Actas Dermosifiliogr 1987; 78: 157-161.
- Maekawa A, Kishimoto H. *Several effects on metastasis-formation of Harding-Passey mouse melanoma.* Mogoya Med J 1970; 16: 51-58.
- Palomares T, Bilbao P, Alonso-Varona A, Barbera Guillén E. *The addition of interleukin-2 to cyclophosphamide therapy can facilitate tumor growth of B16 melanoma.* Cancer Immunol Immunother 1995; 40: 292-298.
- Rhodes AR, Seki Y, Fitzpatrick TB, Stern RS. *Melanosomal alterations in dysplastic melanocytic nevus: Electron-microscopic observation of a diagnostic tool.* Am J Dermatopathol 1988; 9: 189-197.
- Seizi M, Otaki M. *Ultrastructural studies on Harding-Passey mouse melanoma.* J Invest Dermatol 1971; 56: 430-435.
- Surgiura A. *The effects of various physical and chemical factors on transplantable mouse melanoma.* En: Biology of melanomas. NY Acad Sci 1984; 4: 369-387.
- Takahasi H, Yamana K, Maeda K, Akutsu Y, Horikoshi T, Jimbow K. *Dysplastic melanocytic nevus: Electron microscopic observation of a diagnostic tool.* Am J Dermatopathol 1987; 9: 189-197.
- Vicente V, Ochotorena MM, Gómez M, Vicente C, Hernández-Gil A, Canteras M. *Melanoma Harding-Passey: Estudio clínico-biológico, histológico y ultraestructural.* Actas Dermosifiliogr 1988; 79: 803-807.
- Vicente Ortega V, Martínez Díaz F, Carrascosa Romero C, Ortuño Pacheco G, Canteras Jordana M, Calderón Rubiales F. *Abnormal melanosomes: Ultrastructural markers of melanocytic atypia.* Ultrastructural Pathology 1995; 19: 119-128.
- Wosko TJ, Ferrara DT, Sartor LS. *Histological comparison of the B16 melanoma and its F1 variant.* Cancer Letters 1984; 24: 57-63.

