

4.- MATERIALES Y MÉTODOS

A) EXPERIMENTOS *IN VITRO*

4.1.- EQUIPAMIENTO DEL LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN GASTROINTESTINAL

Los experimentos de esta tesis se han realizado en el Laboratorio de Investigación Gastrointestinal y en el Servicio de Oncología Radioterápica del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. El LIG tiene un espacio de 100 m², equipado con aire acondicionado, instalación eléctrica sectorizada y conexión a un grupo electrógeno. El LIG dispone de una centrífuga refrigerada J-6M/E (Beckman), un pH-metro autoanalizador automático (Radiometer), un espectrofotómetro UV y un fluorímetro KONTRON. La unidad de cultivos celulares esta dotada de una campana de flujo laminar (Telstar), un incubador con control por microprocesador de temperatura, CO₂, aire y humedad (IR Auto Flow), un microscopio de contraste de fase (Olimpus), un contador de células (Coulter), 4 neveras-congeladores a -20°C, un congelador a -80°C, (Kotterman) y un arcón para nitrógeno líquido. También dispone de una centrífuga elutriadora de células, equipada con un rotor especial (Beckman) para separar poblaciones celulares vivas en condiciones de esterilidad. Además el LIG dispone de una unidad de biología molecular ampliamente dotada.

4.2.- CÉLULAS

Se utilizaron en algún momento del estudio las líneas celulares tumorales pancreáticas humanas MIA PaCa-2, PANC-1, NP-18, BxPc-3, AspC-1 y CAPAN 1 así como la línea celular cólica HCT-15. Las células se adquirieron por el LIG en la ATCC. Se conservaron en nitrógeno líquido hasta su utilización. La línea NP-18 se estableció en el propio LIG (Tabla 1) [Villanueva, 1998].

4.2.1.- Células MIA PaCa-2

La línea MIA PaCa-2 es una línea celular establecida tumoral humana de origen pancreático. Las células MIA PaCa-2 se adquirieron en el pase número 125. Los experimentos se realizaron entre el pase 129 y el pase 165. Esta línea celular ha sido utilizada en el estudio del cáncer de páncreas por varios autores [Liehr, 1990; Marincola, 1989]. Revisada la literatura, no se encontraron referencias sobre radiosensibilidad de la línea MIA PaCa-2. El mantenimiento de la línea se realizó mediante sucesivos pases cada 3,5 días, coincidiendo con la semiconfluencia de los cultivos. La población inicial sembrada por frasco fue de 1 millón de células. Se recuperaron al final unos 4 millones de células por frasco.

4.2.2.- Células PANC-1

Las células PANC-1 se adquirieron en el pase 57. Los experimentos se realizaron entre el pase 96 y el pase 160. El mantenimiento de la línea se realizó mediante sucesivos pases cada 3,5 días, coincidiendo con la semiconfluencia de los cultivos. La población inicial sembrada en cada frasco fue de 1 millón de células, se recuperaron al final unos 3,5 millones de células.

Tabla 1. Características de las células

| | Origen | Histología | Tumorigenicidad en el ratón atómico | Mutaciones [1] | Medio de cultivo |
|-------------------|------------------------|--|-------------------------------------|----------------|--------------------------|
| MIA PaCa-2 | Liehr, 1990 (ATCC) | Adenocarcinoma fibroblástico pancreático | sí | k-ras+ p53+ | DMEN + 10% SFB + 2,5% SE |
| PANC-1 | Lieber, 1975 (ATCC) | Adenocarcinoma epiteloide pancreático | ? | k-ras+ p53+ | DMEN + 10% SFB |
| NP-18 | Villanueva, 1998 (LIG) | Adenocarcinoma pancreático | ? | k-ras+ p53+ | RPMI 1640 + 10% SFB |
| HCT-15 | Dexter, 1979 (ATCC) | Adenocarcinoma colónico | ? | k-ras? p53? | RPMI 1640 + 10% SFB |

ATCC: American Type Culture Collection. **DMEN:** Dubelcco's Modified Eagle's Medium. **SFB:** Suero fetal bobvino. **SE:** Suero equino. **LIG:** Laboratorio de Investigación Gastrointestinal de Sant Pau. [1]: Berrozpe, 1994.

4.2.3.- Células NP-18

Las células NP-18 se establecieron en el LIG en el año 1993 procedentes de un paciente con metástasis hepáticas de un adenocarcinoma pancreático al que se practicó una derivación biliar. A su vez, se obtuvo un explante de una metástasis hepática que fue implantado en un ratón atómico y posteriormente se cultivó *in vitro*.

Los experimentos realizados con las células NP-18 se iniciaron en el pase 24. Las células se subcultivaron cada 3,5 días. Se sembraron $1,5 \times 10^6$ y se recogieron 4,5 millones de células.

4.2.4.- Células HCT-15

La línea tumoral humana HCT-15 fue adquirida en el pase 37 y los experimentos se realizaron entre el pase 49 y el 71. El mantenimiento de la línea se realizó mediante sucesivos pases cada 3,5 días, coincidiendo con la semiconfluencia de los cultivos. Se subcultivaron 1 millón de células y se recuperaron unos 10 millones de células.

4.3.- CONDICIONES DE CULTIVO DE LAS CÉLULAS

Las células se cultivaron en monocapa, adheridas al suelo de frascos de plástico de 80 cm² (Nunk A/S), cubiertas por 4 o 5 mm de medio (15 ml/frasco) en una atmósfera saturada de vapor y con una concentración de CO₂ del 5% y a una temperatura de 37°C. Se empleó un incubador para cultivos con regulación electrónica de la temperatura y concentración de CO₂(± 0,5%) (Nuair IR Auto-Flow). La manipulación de las células se llevó a cabo en una cámara estéril de flujo laminar (Telstar).

Los componentes del medio de cultivo se adquirieron en Gibco, Life Technologies. El lote de sueros empleados en el medio de cultivo fue el mismo a lo largo de los experimentos. El suero se no se dializó ni se inactivó. Los medios de cultivo se suplementaron con L-glutamina (que se renovó cada 15 días). Al medio de cultivo se añadieron antibióticos (50 UI/ml de penicilina, 50 µg/ml de estreptomina y 2,5 µg/ml de anfotericina B). La infección de las células por *Mycoplasma* se descartó regularmente por un método de hibridación de ADN (Gen-Probe Inc).

4.4.- CURVAS DE CRECIMIENTO

El crecimiento celular se determinó en células aisladas mediante observación directa a lo largo del tiempo. A las 2 horas de terminada la siembra se inició el recuento de células. Las células se contaron con un microscopio de luz invertida de contraste de fases Olympus IMT-2. El recuento de células por CFU se realizó al azar en 3 discos independientes cada 12 horas. Se evaluaron 25 CFU por disco. Los datos se representaron en un eje cartesiano.

4.5.- DISGREGACIÓN DE LA MONOCAPA CELULAR

La obtención de células aisladas para los subcultivos y los experimentos se consiguió por disgregación de la monocapa celular. La disgregación de la monocapa se realizó cuando los cultivos se encontraban en semiconfluencia. Se sabe que tras la siembra, existe un tiempo en el que el crecimiento es nulo o muy lento. Este período se conoce con el nombre de fase LAG. Se interpreta como un tiempo necesario para que las células se recuperen de la disgregación y sustituyan los elementos del glicocálix perdidos durante la tripsinización y se adhieran al sustrato sobre el que deben crecer. La duración de la fase LAG es corta en comparación al resto del tiempo de vida de un subcultivo (Figura 13). La fase LAG es seguida por la fase de crecimiento exponencial o fase LOG , que coincide con la semiconfluencia. En ella, las condiciones celulares

son óptimas y el crecimiento celular alcanza su máxima expresión. Entre el 90 y el 100 por cien de las células están proliferando y el cultivo se encuentra en su forma más reproducible. La tasa de células en las distintas fases del ciclo celular es constante. Es por tanto, la fase LOG, la ideal para la realización de experimentos, dada la estabilidad de las condiciones que influyen en el crecimiento de las células. La fase de plateau o saturación ocurre cuando un subcultivo celular ocupa toda la superficie del frasco y se hace confluyente, el medio envejece rápidamente y se detiene el ritmo de proliferación.

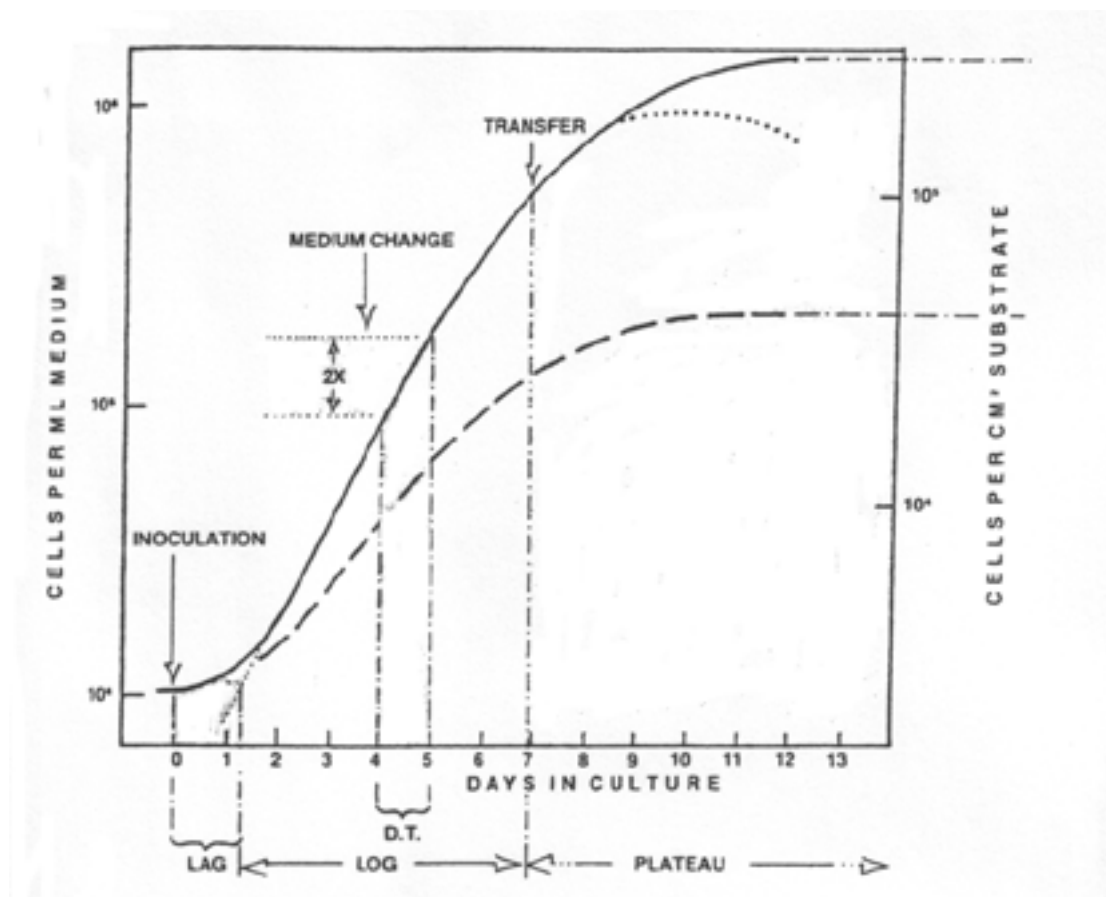


Figura 13. Diagrama de una curva de crecimiento de un cultivo celular

El crecimiento de las células de la línea HeLa y NFL presenta un patrón común a todas las células que crecen en monocapa. La fase LAG se observa tras la siembra, su duración es corta, entre uno o dos días. En ella las células se preparan para la fase LOG o de crecimiento exponencial. La fase LOG finaliza cuando el cultivo llega a la confluencia, se satura el crecimiento y la curva describe un plateau. Antes de que un cultivo llegue al plateau es conveniente subcultivarlo. **D.T.:** Tiempo de duplicación. [Fresney, 1987].

Por ello, cuando los cultivos estaban en semiconfluencia, se procedió a decantar el medio de cultivo, lavar 2 veces las células con tampón PBS e incubar la monocapa con 4 ml de tripsina 0,25% durante 10 minutos. Una vez disgregada la monocapa se neutralizó la tripsina con medio de cultivo. A continuación, se centrifugó el producto de la tripsinización a 1.000 g durante 5 minutos en tubos cónicos de 15 ml. Tras la centrifugación, se aspiró el sobrenadante y el botón formado se disolvió en 4 ml de medio de cultivo, se individualizaron las células mediante un repetido pipeteo suave y, finalmente, una vez contadas las células en una cámara Neubauer, se procedió a dispensar un número de células deseado en un nuevo frasco (Figura 14).

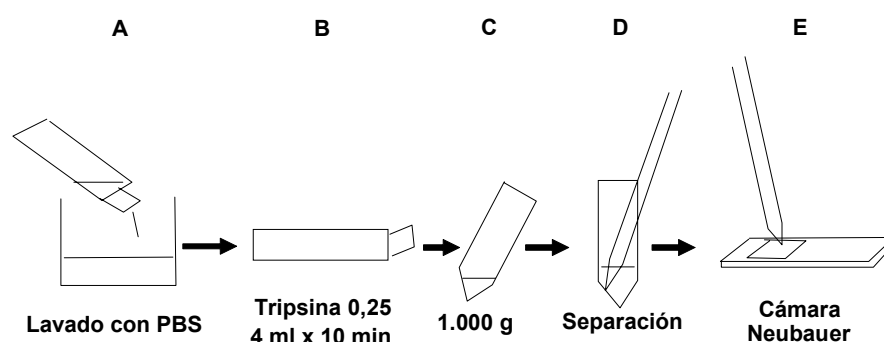


Figura 14. Disgregación de la monocapa celular

A) Cultivo en semiconfluencia, decantación del medio, lavado 2 veces con PBS. B) Disgregación. C) Neutralización con medio de cultivo, centrifugado a 1.000 g x 5 min. D) El botón celular se sometió a un repetido pipeteo. E) Recuento de las células.

4.6.- CRIOPRESERVACIÓN DE LAS CÉLULAS

Para evitar una desdiferenciación de las células debido a un exceso de subcultivos, se decidió realizar los experimentos con células sometidas a menos de 40 pases. De este modo, fue necesario criopresevar las células, lo que se hizo almacenando un botón celular en un tubo de criopreservación de 1 ml con un 90% de suero bovino y un 10% de DMSO. Los tubos de criopreservación se mantuvieron durante 24 h en un congelador a -80°C y posteriormente se almacenaron en nitrógeno líquido. La recuperación de las células se realizó pasando bruscamente de la temperatura del nitrógeno líquido a 37°C en medio de cultivo.

4.7.- ENSAYO DE CLONOGENICIDAD

La evaluación del efecto citotóxico de un tratamiento (irradiación, 5-FU o ambos) se realizó a través de un ensayo de clonogenicidad. Los experimentos de clonogenicidad descritos en la presente tesis se realizaron aplicando los siguientes pasos: a) preparación de las células, b) tratamiento y c) recuento de colonias y determinación de la supervivencia celular.

4.7.1.- Preparación de las células

Es conocido que la sensibilidad de las células a los tratamientos puede variar según si las células se hallan aisladas o están en contacto con otras células. Por tanto se realizaron experimentos según dos alternativas posibles: experimentos en los que se trataron las células aisladas y experimentos en los que se trataron las células en monocapa (semiconfluencia).

4.7.1.1.- Células aisladas

Las células se obtuvieron a partir de una disgregación de la monocapa celular de cultivos en semiconfluencia. Se realizó un recuento y a continuación, las células en suspensión se diluyeron 3 veces en medio de crecimiento hasta alcanzar un número adecuado de células. Así se consiguieron células aisladas que se dispensaron en discos de 21 cm² (Corning). El volumen final de los discos fue de 4 ml. El número de células por disco se ajustó a cada línea celular estudiada (Tabla 2). El número de células por disco fue en aumento según la dosis de radiación administrada con el objetivo de obtener entre 10 y 150 colonias supervivientes (Figura 15). Después de la siembra, antes del tratamiento, las células se dejaron en el incubador un tiempo suficiente para permitir que se adherieran e iniciaran la fase de crecimiento exponencial (Tabla 2). Pasado este tiempo, se asumió que la mayoría de células presentarían una cinética estable, reproducible en cada experimento.

4.7.1.2.- Células en monocapa

Las células se obtuvieron por una disgregación de la monocapa celular de un cultivo en semiconfluencia. Se sembraron 250.000 células en discos de 21 cm² y se dejaron reposar durante 72 horas. A continuación, los discos se trataron con radiación y/o 5-FU. Seis horas después del tratamiento, se disgregó la monocapa mediante tripsinización. Las células procedentes de los discos tratados se sembraron de nuevo en discos de 21 cm² (Figura 15). El número de células por disco se ajustó a cada línea celular estudiada (Tabla 2). El número de células por disco fue en aumento según la dosis de radiación administrada con el objetivo de obtener entre 10 y 150 colonias supervivientes. El volumen final de los discos fue de 4 ml.

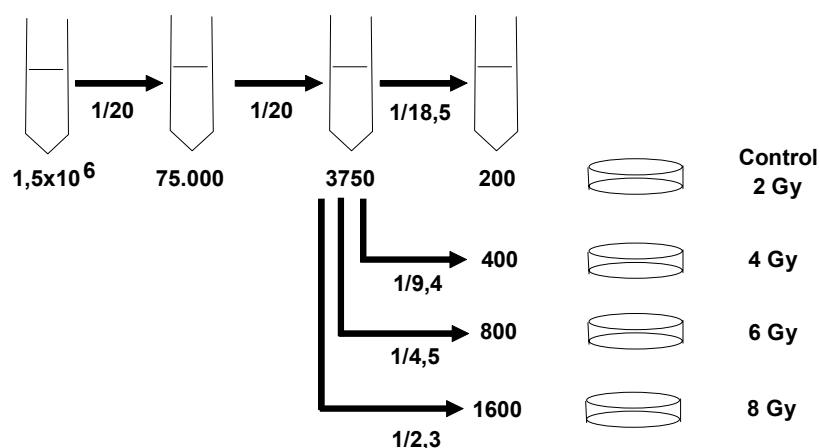


Figura 15. Preparación de las células para un ensayo de clonogenicidad (MIA PaCa-2)

Un número conocido de células se diluyó 3 veces hasta alcanzar una densidad de células adecuada. En una primera dilución se añadió 1 ml de una suspensión de células a 19 ml de medio fresco, es decir una proporción 1/20; y así hasta 3 veces, la proporción que corresponda. A continuación, las células se dispensaron en discos de 21 cm² según la dosis de radiación administrada.

Tabla 2. Número de células utilizado por experimento

| | | Células sembradas por disco | | | |
|-----------------------------|-------|-----------------------------|-------|--------|--------|
| | | Control y 2 Gy | 4 Gy | 6 Gy | 8 Gy |
| Con células aisladas | | | | | |
| MIA PaCa-2 | (48h) | 200 | 400 | 800 | 1.600 |
| PANC-1 | (48h) | 150 | 300 | 800 | 1.500 |
| HCT-15 | (24h) | 1.500 | 5.000 | 20.000 | 80.000 |
| Con células monocapa | | | | | |
| MIA PaCa-2 | (72h) | 1.000 | 2.500 | 5.000 | 10.000 |
| PANC-1 | (72h) | 1.000 | 1.500 | 3.000 | 6.000 |
| NP-18 | (72h) | 2.500 | 4.000 | 8.000 | 12.000 |
| HCT-15 | (72h) | 1.500 | 3.000 | 10.000 | 80.000 |

(): Entre paréntesis número de horas transcurridas entre la siembra y el tratamiento

4.7.2.- Tratamiento

Terminada la preparación de las células, los discos se trataron con radiación, 5-FU o ambos de acuerdo un diseño experimental específico que expondremos. Finalizado el tratamiento, las células se incubaron entre 10 y 15 días. Pasado este tiempo, se procedió al recuento de colonias. Durante el período de incubación los discos no se manipularon para evitar la formación de colonias satélites.

4.7.2.1.- Irradiación de las células

Las células, bien oxigenadas y a temperatura ambiente, se irradiaron mediante una fuente de cobalto-60 en una unidad Theratron Phoenix. Los discos se dispusieron en una bandeja de plástico, rodeados por la base, por una capa de 0,5 cm de agua para conseguir un buen equilibrio electrónico en la entrada del haz a la altura de las células. Previamente, se sellaron los discos con cinta parafinada para evitar la entrada de gérmenes durante la irradiación. Se evitaron las burbujas. La tasa media de dosis fue de 1 Gy/min. Los discos se irradiaron a una distancia foco-célula de 80,5 cm por un haz posterior (*gantry* a 180°) perpendicular a la superficie de las células. El tamaño del campo empleado fue de 35 x 35 cm. Los discos se colocaron a alrededor del rayo central. Una cámara de ionización 2505/3A con una electrómetro Ionex (Nuclear Enterprise) fue usado para la calibración del haz. Los discos control y los de tratamiento se manipularon igual. Durante la irradiación, las células estuvieron unos 30 minutos fuera del laboratorio (Figura 16).

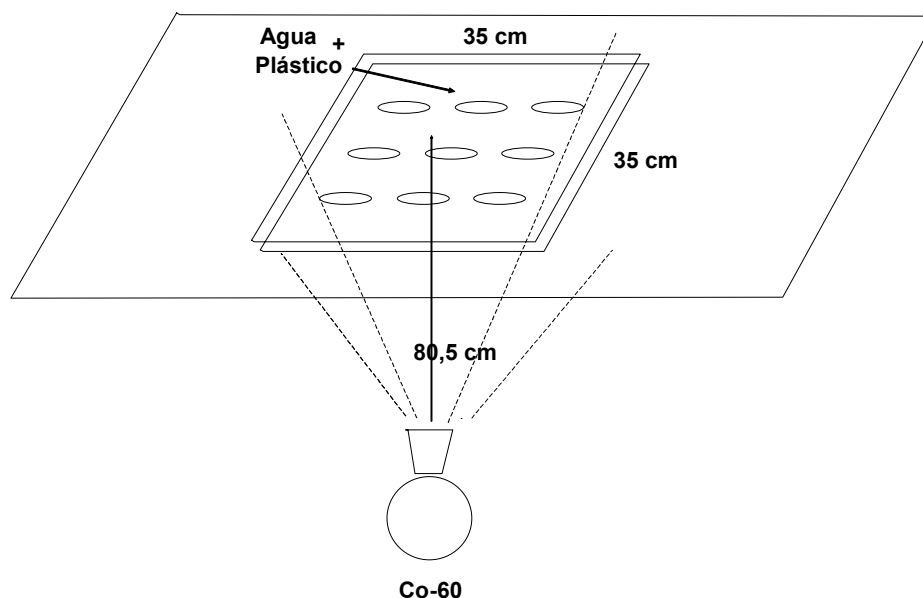


Figura 16. Irradiación de las células

Las células se situaron alrededor del centro de un haz de cobalto-60 de 35 x 35 cm. La entrada de la radiación fue por la base de los discos. La distancia foco-célula fue de 80,5 cm. El agua y el plástico formaron una capa de 0,5 cm que garantizó un equilibrio electrónico perfecto.

4.7.2.2.- 5-Fluorouracilo (5-FU)

El 5-FU (Hoffmann-LaRoche) se almacenó a -20°C . El citostático se disolvió a las concentraciones adecuadas en el medio de crecimiento fresco inmediatamente antes de cada experimento y se protegió de la luz. Una vez finalizada la exposición al 5-FU, se retiró por aspiración y se lavaron las células con PBS dos veces, añadiéndose a continuación 4 ml de medio de crecimiento precalentado.

Las dosis de 5-FU se ajustaron a la concentración plasmática alcanzada en la práctica clínica [Fraile, 1980]. En general, el 5-FU se administró durante 30 minutos -exposición en forma de bolus- o durante 48 horas -exposición en forma de incubación continua-. Se trataron las células aisladas o en monocapa con distintas dosis de 5-FU con el objetivo de determinar una curva dosis-respuesta.

4.7.3.- Recuento de colonias y determinación de la supervivencia celular

Las colonias se fijaron con una disolución al 25% de ácido acético en etanol (v/v) y fueron teñidas con una disolución de cristal violeta al 1% en etanol (p/v). Se contaron las colonias visibles a simple vista. Una colonia visible a simple vista está constituida por una familia de al menos 50 células. Se considera que si una célula es capaz de generar una colonia después de un tratamiento ha sobrevivido a éste.

La supervivencia celular se definió como el cociente entre la CE de las células tratadas y la CE de las células no tratadas. A su vez, se definió la CE como el cociente entre el número de colonias y el número de células sembradas. En todos los casos, los cálculos se efectuaron a partir de los valores experimentales.

4.8.- TRATAMIENTOS REALIZADOS

Las células se trataron con radiación, 5-FU o ambos tratamientos simultáneos.

Las dosis de radiación dadas fueron 2, 4, 6 u 8 Gy a células aisladas o a células en monocapa según las características descritas en la Tabla 2.

El 5-FU se administró a células aisladas y en monocapa a distintas dosis según se indica en Resultados. Las células se prepararon en las mismas condiciones que las células control (Tabla 2).

Además del tratamiento con radiación y 5-FU por separado, ambos agentes se administraron simultáneamente. Las células se trataron aisladas según el protocolo descrito en las Figuras 33 y 39. Los experimentos de tratamiento combinado se realizaron siguiendo las características de la Tabla 2.

4.9.- CUANTIFICACIÓN DE LA RADIOSENSIBILIDAD

El efecto de la radiación se cuantificó utilizando SF2 y \bar{D} . La SF2 y la \bar{D} se evaluaron tras la irradiación o tras la irradiación asociada a 5-FU. El valor de SF2 se obtuvo directamente a partir del recuento de las colonias. \bar{D} se determinó según el método de integración por trapecios mixtilíneos formados por la intersección de la curva de supervivencia celular y la dosis de radiación entre 0 y 8 Gy. El área (\bar{D}) bajo la curva se obtuvo tras sumar las áreas de los 4 trapecios formados por la dosis de 2, 4, 6 y 8 Gy y su respectiva supervivencia celular.

4.9.1.- Determinación de alfa y beta

La determinación de las constantes alfa y beta de la ecuación L-Q se realizó a partir de la transformación logarítmica o linealización de la fórmula $S = e^{-(\alpha D + \beta D^2)}$, obteniéndose $-\ln S/D = \alpha + \beta D$, al multiplicar ambos lados de la ecuación por Ln. De este modo, la fórmula L-Q se transformó en una ecuación de primer grado. Los parámetros a y b que definen una recta $Y = a + bx$ se calcularon por el método de mínimos cuadrados de una regresión lineal entre la variable independiente dosis y la dependiente $-\ln S/D$, donde S es la supervivencia determinada experimentalmente. La valoración del ajuste de la recta de regresión se efectuó mediante el coeficiente de Pearson [Doménech, 1982].

4.10.- CORRECCIÓN DE LA RADIOSENSIBILIDAD DEBIDO A LA MULTIPLICIDAD CELULAR

Es conocido que la multiplicidad, ñ, disminuye la radiosensibilidad celular en los ensayos de clonogenicidad [Elkind, 1967]. Por tanto, dado que en los experimentos con células aisladas se produjo multiplicidad celular, se planteó la corrección de la supervivencia hallada experimentalmente para compensar la pérdida de

radiosensibilidad debido a la \bar{n} . A pesar de que el problema de \bar{n} es conocido desde hace tiempo, existen pocos artículos en la literatura sobre su solución. Recientemente, se ha publicado una revisión sobre el efecto de la multiplicidad y las estrategias teóricas para corregir el efecto de \bar{n} [Gerweck, 1994-b]. A continuación se exponen los razonamientos teóricos y el método de corrección de la multiplicidad empleado en esta tesis extraídos del trabajo de Gerweck et al.

En general, se asume que la formación de una colonia depende del número de células presentes en una CFU en el momento de la irradiación. Idealmente, una CFU debería estar formada por una única célula. Sin embargo, se sabe que en muchas ocasiones no es así.

Sin multiplicidad y dado que la muerte celular, según la teoría actual, depende de la inactivación de una diana celular, podemos escribir que si pk es la probabilidad de inactivación celular por la radiación, la probabilidad de que surja una colonia será $1 - pk$. Pero, si como decíamos, una CFU está constituida por más de una célula, la probabilidad de que se forme una colonia sería la siguiente: $1 - pk^2$, para 2 células, $1 - pk^3$, para 3 células, etc. En definitiva, la probabilidad sería $1 - pk^{\bar{n}}$ para \bar{n} células. Reordenando, la probabilidad de inactivación es $\sim (1 - f)^{1/\bar{n}}$, donde f es la fracción de una CFU que forma colonias y \bar{n} es el promedio de células por CFU en un tiempo determinado (multiplicidad). En definitiva, la supervivencia corregida teniendo en cuenta la multiplicidad es $= [1 - (1 - f)^{1/\bar{n}}] / [1 - (1 - f_0)^{1/\bar{n}_0}]$. Donde \bar{n}_0 y \bar{n} son la multiplicidad celular, en el momento de la siembra e inmediatamente antes de la irradiación, respectivamente, y f_0 y f son la CE de los discos control y de los discos irradiados. Por ejemplo, supongamos una CE de 0,6 para unos discos control y una CE de 0,48 para unos discos irradiados; la supervivencia no corregida por la multiplicidad es $0,48/0,60 = 0,80$. Sin embargo, al corregir por el método de Gerweck, la supervivencia sería igual a $[1 - (1 - 0,48)^{1/1,8}] / [1 - (1 - 0,6)^{1/1,2}] = 0,57$; en donde, para las células del ejemplo, la multiplicidad inicial (tras la siembra) fue de 1,2 y en el momento de la irradiación fue 1,8.

El modelo de corrección se basa en la asunción de que la probabilidad de cada célula para formar una colonia es la misma para cualquier célula y que no está influida por la presencia de otras células y que el proceso de individualización-disgregación de las células ha sido eficaz. Si la corrección equivale en realidad a la irradiación de células estrictamente aisladas (sin multiplicidad) no ha sido claramente demostrado. A pesar de estas limitaciones, no existe una alternativa mejor cuando se ha dado un fenómeno de multiplicidad.

A lo largo de la exposición se emplearán como sinónimos las expresiones corrección por la multiplicidad y corrección de la radiosensibilidad debido a la multiplicidad.

4.11.- CUANTIFICACIÓN DEL EFECTO DEL 5-FU

El efecto del 5-FU se evaluó mediante un ensayo de clonogenicidad. La fracción de células superviviente se determinó a partir de cociente entre la CE tras un tratamiento con 5-FU y la CE de las células en condiciones basales. Las curvas de dosis-efecto para el tratamiento con 5-FU solo se representaron en un eje cartesiano en coordenadas lineales.

4.12.- AJUSTE POR EL EFECTO DEL 5-FU

En los experimentos de tratamiento combinado, para evaluar la radiosensibilización, se sustrajo el efecto citotóxico ligado al 5-FU mediante un ajuste (normalización) en el cálculo de la fracción de supervivencia. Ésta se calculó utilizando en el numerador la CE de las células tratadas con radiación y 5-FU y en el denominador la CE de las células tratadas con 5-FU solo (en lugar de la CE control).

4.13.- RADIOSENSIBILIZACIÓN

La radiosensibilización por 5-FU se definió como un aumento estadísticamente significativo de la radiosensibilidad a nivel de SF2, \bar{D} o ambas tras un ajuste para sustraer el efecto citotóxico dependiente del 5-FU. Es importante subrayar que se comparó la radiosensibilidad frente a irradiación con la radiosensibilidad frente a irradiación más 5-FU. No se hizo ninguna comparación entre los distintos esquemas de administrar el 5-FU asociado a la irradiación.

B) EXPERIMENTOS *IN VIVO*

4.14.- ANIMALES Y ESTABULACIÓN

Se emplearon ratones atímicos Swiss nu/nu machos (IFFA-CREDO). Los animales se estabularon en jaulas autoclavables (Letica 1284-L) dispuestas en un armario protegido con circuito de aire filtrado y presión positiva (IFFA-CREDO) en una habitación libre de patógenos. Los animales se mantuvieron entre 26 y 28 °C y entre un 40 y un 60% de humedad. La comida, administrada *ad libitum*, y la viruta se esterilizaron con radiación gamma. Transcurrida una semana desde la estabulación, como período de cuarentena, se inocularon las células.

Los resultados de los experimentos *in vivo* se han obtenido de la experimentación con 61 animales a lo largo de 8 meses. Tres ratones murieron por enfermedad, 2 por la toxicidad del 5-FU y 2 por sobredosis de isoflurano.

4.15.- CRECIMIENTO TUMORAL

Se inocularon 2×10^6 células, resuspendidas en 100 μ l de medio sin suero, en el tejido subcutáneo, para ambas líneas celulares. Las células se inyectaron en las regiones escapulares derecha e izquierda de cada ratón. El volumen de los tumores se calculó utilizando la fórmula del elipsoide $-a \cdot b \cdot c \cdot \pi / 6-$. Se determinaron los tres diámetros mayores de los tumores cada 3,5 días. Durante la medida de los tumores, los animales se inmovilizaron mediante la inhalación de isoflurano (Abbott). El crecimiento tumoral se representó mediante curvas tiempo-volumen. Los resultados se han expresado como la media \pm el error estándar (mm^3). Los tumores se observaron hasta la progresión o hasta un máximo de 120 días. Los animales se sacrificaron mediante sobredosis de anestésico.

4.16.- IRRADIACIÓN DE LOS TUMORES

Los xenoinjertos se irradiaron cuando presentaban un crecimiento exponencial y un volumen aproximado de $110 \text{ mm}^3 \sim (7 \times 6 \times 5)$. La radiación se administró mediante una unidad de radioterapia de contacto Philips RT 50 equipada con un tubo de rayos X de 50 KV. Se empleó un colimador circular de 15 mm. La tasa de dosis a 2,5 mm de profundidad fue 6 Gy/min. Se administraron dosis únicas de 6, 12 o 18 Gy. Los animales se anestesiaron con una disolución de tribromoetanol en alcohol amílico (20 $\mu\text{g/ml}$). El anestésico (0,4 ml) se administró por vía i.p. El transporte de los animales hasta la unidad de rayos X se efectuó en condiciones estériles e isotérmicas.

4.17.- ADMINISTRACIÓN DE 5-FU

Una vez se observó que los tumores crecían exponencialmente se inició el tratamiento cuando alcanzaron un volumen aproximado de 110 mm^3 . El 5-FU (50 mg/ml) se administró por vía intraperitoneal (i.p.) en forma de bolus mediante inyección o en forma de infusión continua (1 $\mu\text{l/h}$) mediante una minibomba osmótica de perfusión continua (Alzet 2001) implantada durante 5 días en la cavidad abdominal. La dosis de 5-FU administrada en inyección i.p. fue de 230 mg/kg y la administrada en infusión continua fue de 220 mg/kg. Estas dosis se seleccionaron sobre la base de un estudio previo realizado con ratones en el que se observó que la DL50 del 5-FU fue de 240 mg/kg en inyección i.p. y de 265 mg/kg en infusión de 7 días mediante minibomba [Weinberg, 1987].

4.18.- EFECTO ANTITUMORAL

Se definió como efecto antitumoral la disminución del tamaño tumoral después de la administración del tratamiento con 5-FU o radiación. El efecto antitumoral se cuantificó midiendo la disminución del volumen tumoral y la duración del mismo. Este

intervalo de tiempo se definió como *growth delay* y se expresó en días (Figura 17) [Barensen, 1969]. Se utilizó la U de Mann-Whitney para comparar las dimensiones de distintos tumores.

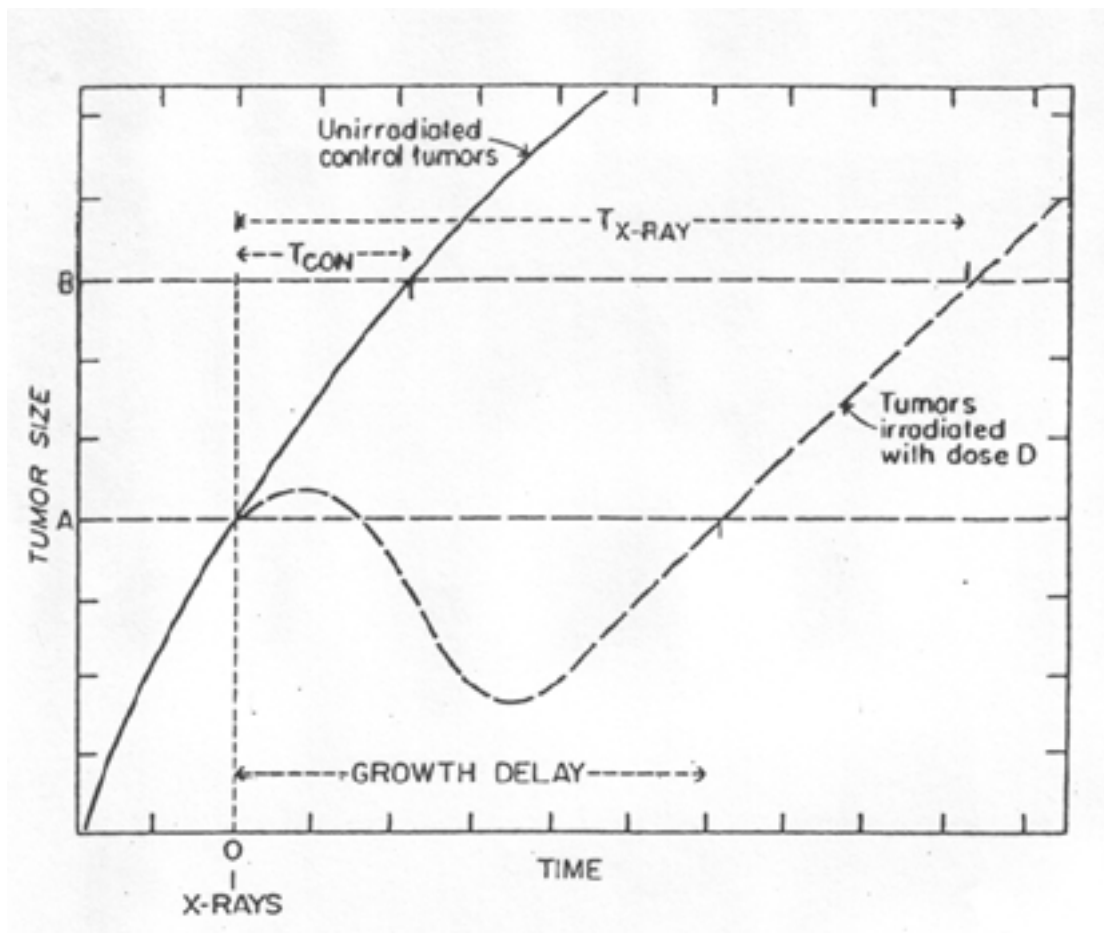


Figura 17. Crecimiento tumoral y *growth delay* tras irradiación.

Patrón de respuesta de un tumor a una dosis D de radiación. El tamaño tumoral se muestra en ordenadas en función del tiempo transcurrido después de la irradiación. El *growth delay* representa el tiempo que requiere un tumor para volver al tamaño que tenía en el momento que se trató. El *growth delay* es una medida del efecto de un tratamiento [Barensen, 1969].

C) PROCESO DE DATOS Y ESTADÍSTICA

Todos los datos fueron obtenidos experimentalmente. No se emplearon datos obtenidos a partir de las funciones de supervivencia teóricas. La fracción de supervivencia para un determinado nivel de dosis *in vitro* se determinó al menos mediante 3 experimentos independientes, es decir, de tres pases diferentes y, a su vez, en cada experimento se utilizaron un mínimo de 3 discos por nivel de dosis evaluado (en caso contrario se especificará). Los resultados se han expresado como la media y desviación estándar. Se representó la desviación estándar en forma de barras de error, en algunos caso solo se mostró la semibarra positiva para simplificar los gráficos. La comparación de medias se realizó con el test de Mann-Whitney [Siegel, 1979]. La prueba se consideró significativa para una $p < 0,05$. Los programas informáticos utilizados han sido Excel para el cálculo y gráficos y en la estadística se empleó el programa SPSS versión 6.0 para Windows.