

Desarrollo de un modelo de tumores isogénicos en ratones Balb/cCmedc seguido por Ultrasonografía y Power Doppler.

Salinas FJ¹, Notaro U, Ruiz E¹, Durante L¹, Olmos MF¹, García Lázaro R², Farina HG², Alonso DF², Salvetti NR¹, Ortega HH¹, Marelli BE¹.

¹ Centro de Medicina Comparada, Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral (ICiVet-Litoral), Universidad Nacional del Litoral (UNL) / Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET), Esperanza, Santa Fe, Argentina. ² Laboratorio de Oncología Molecular, Universidad Nacional de Quilmes (UNQ) / Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET), Quilmes, Buenos Aires, Argentina. fsalinas@fcv.unl.edu.ar.

El desarrollo de modelos tumorales isogénicos (o singénicos) frente al uso de líneas celulares de otras especies, presenta como principal ventaja el uso de animales inmunocompetentes. Esto permite estudiar la evolución tumoral y su respuesta a terapias en el contexto de un sistema inmune completamente funcional. Los métodos convencionales para la determinación del tamaño tumoral, basados en el uso de calibres, tienen baja sensibilidad, poca reproducibilidad y alta variabilidad, siendo necesario el uso de un gran número de animales para la obtención de resultados estadísticamente válidos. Por otra parte, la ecografía Doppler ha sido extensamente usada para analizar vascularización en tumores humanos. En particular, el modo “power” Doppler es un método específico para medir el flujo sanguíneo con una alta sensibilidad¹. Todo esto fundamenta claramente su utilidad como técnica complementaria de alta complejidad en la ejecución de ensayos preclínicos que impliquen el análisis de la respuesta tumoral a diferentes tratamientos³. Además, esta herramienta permite refinar las técnicas en el uso de los animales de laboratorio ya que facilita la obtención de mayor información con un bajo nivel de estrés en los animales. El objetivo del presente trabajo fue determinar la utilidad de la ecografía Doppler en un modelo de desarrollo tumoral isogénico en ratones. Para ello se utilizaron ratones hembras de la cepa BALB/cCmedc (n=10 por línea celular), los cuales fueron mantenidos en racks microventilados durante todo el desarrollo de la experiencia, en condiciones de temperatura y humedad controladas y con alimentación *ad-libitum* con balanceado comercial. Las líneas celulares fueron obtenidas del Laboratorio de Oncología Molecular, Universidad Nacional de Quilmes (UNQ) y mantenidas y amplificadas en el Área de Ensayos In Vitro del CMC. La línea F3II (carcinoma mamario murino) fue crecida en monocapa en medio de cultivo DMEM suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 5%, glutamina 2 mM y antibiótico-antimicótico. La línea CT26 (carcinoma de colon murino) fue crecida en monocapa en medio de cultivo RPMI suplementado con SFB al 10% y antibiótico-antimicótico. Ambas líneas celulares fueron cultivadas hasta confluencia en frasco T en condiciones de temperatura (37°C), humedad y atmósfera (CO₂ al 5%) controladas. Las monocapas de células confluentes fueron disgregadas mediante tratamiento con tripsina y contadas en cámara de Neubauer con azul de Tripán. Las células fueron centrifugadas y resuspendidas en medio de cultivo libre de SFB ajustando la concentración de células. Los animales fueron inoculados por vía subcutánea en el tercio medio del flanco derecho, con una suspensión de 2x10⁵ células de las líneas tumorales F3II o CT26. El estado de salud general de los animales fue evaluado diariamente durante todo el experimento. La implantación y el desarrollo de los tumores fueron evaluados semanalmente utilizando un ecógrafo Doppler color (Z6 Vet, Mindray, China) acoplado a un transductor lineal de 8.0-14 MHz (L14-6P, Mindray). En todos los casos se realizó la medición de los tumores mediante un barrido en planos transversales y longitudinales sagitales de la zona de inoculación, en modo B en tiempo real, obteniéndose valores de diámetro y volumen de los mismos. Luego se analizó la intensidad del flujo sanguíneo en la región tumoral mediante la función “power Doppler”. Todas las mediciones en dicha función fueron tomadas considerando un 46% ganancia, 400-Hz de filtro de pared y 1,8 k de frecuencia de repetición de

VII JORNADA DE DIFUSIÓN DE LA INVESTIGACIÓN Y EXTENSIÓN

Noviembre 2019. Esperanza. Santa Fe. Argentina.

Área temática: **SALUD ANIMAL**

pulsos². Los archivos se almacenaron en formato de video lo que permite posteriormente realizar las mediciones a través del software predeterminado en el equipo y/o de herramientas de análisis tales como ImageJ 1.52 o Image Pro Plus. Como resultado de este estudio podemos destacar que fue posible detectar el desarrollo de los tumores a partir de la primera semana post-inoculación, con diámetros entre $0,17 \pm 0,01$ cm y $0,46 \pm 0,09$ cm. Los tumores presentaban una ecogenicidad homogénea, hipoeoica relativa, con zonas hiperecóticas focales a multifocales en el parénquima. A medida que los tumores aumentaban en tamaño y volumen, se apreciaron zonas anecóticas focales en el interior de los mismos, pudiendo deberse a zonas de necrosis. La evaluación por power Doppler mostró principalmente zonas de flujo sanguíneo en la periferia de los tumores, acompañando las líneas o regiones hiperecóticas que se apreciaban en el modo B en tiempo real (probablemente asociado al estroma de tejido conectivo de la neoplasia).

Podemos concluir que esta herramienta poco invasiva y que ocasiona poco estrés a los animales, nos permite obtener medidas más precisas de los tumores que el uso del calibre, en poco tiempo de manipulación de animales (alrededor de 30 segundos), con una alta sensibilidad para la detección de cambios incipientes durante el desarrollo de tumores y con mayor cantidad de información sobre la vascularización, lo que sería de vital importancia para la evaluación de diferentes terapias. Por otra parte facilita la recopilación de información que puede ser posteriormente analizada en el contexto de estudios de alta complejidad destinados fundamentalmente a la evaluación de tratamientos antitumorales.

Bibliografía

- 1- Belotti, E.M.; Díaz, P.U.; Stassi, A.F. ; Salinas, F. ; Salvetti, N.R. ; Marelli, B.E.; Podestá, E.; Ortega, H.H. (2016). Use of ultrasonography in preclinical studies: tumor measurements using B-mode ultrasound real time, and vascular characterization by Power Doppler ultrasound of tumors in immunodeficient mice. *Revista Medicina (B Aires)*. ISSN: 0025-7680. 76 Supl I.
- 2- Gee, M.S.; Saunders, H.M.; Lee, J.C.; Sanzo, J.F.; Jenkins, W.T.; Evans, S.M.; Trinchieri, G.; Sehgal, C.M.; Feldman, M.D.; Lee, W.M. (2001). Doppler ultrasound imaging detects changes in tumor perfusion during antivascular therapy associated with vascular anatomic alterations. *Cancer Res.* 61(7):2974-82.
- 3- Sehgal, C. M.; Arger, P. H.; Rowling, S. E.; Conant, E. F.; Reynolds, C. and Patton, J. A. (2000) Quantitative vascularity of breast masses by Doppler Imaging: regional variations and diagnostic implications. *J. Ultrasound Med.*, 19: 427–440.