

ALGUNOS DETALLES EN LA PUESTA A PUNTO DE UN MODELO ANIMAL DE TUMOR VESICAL

A. PAEZ BORDA, M. LUJAN GALAN, A. FERRUELO SANTOS,
L. LLANES GONZALEZ, P. FERNANDEZ SEGOVIANO*, A. BERENGUER SANCHEZ

*Unidad de Investigación Urológica. Servicio de Urología. *Servicio de Anatomía Patológica.
Hospital Universitario de Getafe. Madrid.*

PALABRAS CLAVE:

Tumores vesicales. Modelos animales. Líneas celulares.

KEY WORDS:

Bladder neoplasms. Animal models. Cell lines.

Actas Urol Esp. 23 (9): 740-749, 1999

Parcialmente subvencionado por una beca de la Fundación para la Investigación en Urología.

RESUMEN

OBJETIVOS: Describir los principales problemas hallados por los autores en el desarrollo de un modelo de tumor vesical murino.

METODOLOGÍA: Se revisaron los principales aspectos de la elección del animal y de la provocación de tumores vesicales murinos. Adicionalmente, se analizó la relación entre el tamaño de la vejiga, estimado por palpación, y el volumen obtenido tras el sacrificio y medida de las dimensiones vesicales. Finalmente, se establecieron la especificidad y el valor predictivo positivo (VPP) del tacto abdominal en vejigas de tamaño ≥ 4 mm.

RESULTADOS: La provocación de tumores vesicales en el animal de experimentación de pequeño tamaño es sencilla y requiere de una logística mínima. En relación a la estimación de las dimensiones vesicales, el coeficiente r entre los métodos utilizados por los autores para la estimación del volumen vesical alcanzó 0,97 ($r^2 = 0,95$). La especificidad y el VPP del tacto abdominal en vejigas de tamaño ≥ 4 mm, alcanzaron el 100%.

CONCLUSIONES: Las manipulaciones del ratón C57BL/6 requieren de un brevísimo periodo de entrenamiento. El tacto abdominal permite extrapolar el tamaño de la vejiga y seleccionar los animales con tumor cuando el tamaño vesical estimado es igual o superior a 4 mm.

ABSTRACT

OBJECTIVES: To describe the problems found by the authors with a murine vesical tumour model.

METHODOLOGY: Review of the primary aspects of the choice of animal and challenge of murine vesical tumours. Also, analysis of the relationship between bladder size, estimated by palpation, and volume obtained after death of animals and measurement of bladder dimensions. Finally, establishment of specificity and positive predictive value (PPV) of the abdominal examination in bladders with size ≥ 4 mm.

RESULTS: Vesical tumours challenging in small-sized experimental animals is simple and requires minimum logistics. With regard to estimate of vesical dimensions, the r coefficient between the methods used by the authors to assess vesical volume reached 0.97 ($r^2 = 0.95$). Specificity and PPV of abdominal digital examination in bladders ≥ 4 mm reached 100%.

CONCLUSIONS: Handling of C57BL/6 mice requires very short training periods. Abdominal digital examination allows to extrapolate size of the bladder and to select tumour-bearing animals when the estimated vesical size is equal to or greater than 4 mm.

Hoy en día, la terapéutica y la medicina preventiva parecen incapaces de generar cambios sustanciales en la historia natural de muchos padecimientos. En tales circunstancias, el análisis de los principios más elementales de la enfermedad representa una auténtica necesidad. En ese terreno, los modelos animales constituyen una pieza clave.

Las líneas que siguen detallan los principales problemas -y sus soluciones-, hallados por los autores en el desarrollo de un modelo animal de cáncer de vejiga.

METODOLOGÍA

1. ELECCIÓN DEL ANIMAL

Durante décadas, la experimentación animal se ha basado en el empleo de animales de mediano-gran tamaño en un afán por reproducir de la manera más fiel posible los rasgos de la especie humana. En el momento presente, sin embargo, existe una tendencia creciente al empleo de especies de menor tamaño, en particular en el campo de la biología molecular. Los roedores -ratas y ratones-, representan uno de los modelos animales más apropiados para la investigación: se reproducen con facilidad, requieren pocos cuidados -lo que abarata sensiblemente los experimentos a gran escala- y pueden ser sometidos a grandes manipulaciones a nivel molecular¹. Existen innumerables especies murinas útiles para la experimentación; el ratón C57BL/6 (B6, en su denominación internacional) -el utilizado por los autores- es una de ellas (Fig. 1). Desarrollado en los Estados Unidos de Norte América en 1921 tras cruzar la hembra número 57 con el macho número 52 de un centro de cría comercial de animales,

en 1948 se introdujo entre los animales de experimentación de los laboratorios Jackson. Los animales de uso más generalizado en Europa -provenientes, en su mayoría, de los laboratorios IFFA-CREDO (Francia)-, descienden de la 140^a generación desde la pareja original.

El ratón B6 es un pequeño animal (6-8 cm de longitud, según la edad y el sexo), vigoroso, de pelo y ojos negros, cuya cola se encuentra algo despigmentada adoptando un color rosa pálido. Algunos especímenes desarrollan áreas más o menos despigmentadas. Sus extremidades son delicadas y su crecimiento muy limitado. El periodo de gestación es de aproximadamente 9 semanas. El peso de la hembra adulta -la que emplean los autores en sus experimentos-, se sitúa en torno a los 20 g.

Los roedores son omnívoros, lo que los convierte en un sustrato muy valioso a la hora de analizar el efecto de los componentes de la dieta sobre el metabolismo y la carcinogénesis. Hasta la fecha, el ratón B6 ha sido utilizado para infinidad de estudios relacionados con la obesidad y la diabetes, y con la exploración de mutaciones genéticas y aspectos básicos de la oncología²⁻⁴. Se ha convertido en la cepa de referencia para las comparaciones en áreas como el cultivo celular, la polución atmosférica, la hematología y la terapia antineoplásica⁵⁻⁷. Entre los roedores, el ratón B6 representa el mejor modelo para el estudio de la prostatitis no bacteriana^{8,9}.

En relación a la estabulación, habitualmente se lleva a cabo en cajas con capacidad para 5-10 ratones (Fig. 2), con libre acceso a pienso y agua.

Figura 1. El ratón C57BL/6.

Figura 2. La estabulación de los animales no plantea problemas significativos. En la experiencia de los autores, puede prescindirse del aislamiento aéreo, aunque el aislamiento cutáneo es recomendable. Cada una de las cajas que aparecen en la fotografía alberga 5 animales.

El escaso consumo de los animales intactos permite espaciar su mantenimiento no menos de 4-7 días. La temperatura ambiental debe ser constante (22º C) como medio de evitar las estaciones. Por el mismo motivo, la iluminación ha de mantenerse durante 12 horas al día. El pesebre se sustituye 1-2 veces por semana. Probablemente como consecuencia de la atmósfera seca, los cadáveres que pasan desapercibidos sufren un rápido proceso de momificación. Eso, unido a la tendencia a la antropofagia de los ratones estabulados, obliga a un seguimiento diario de los animales susceptibles de morir. Las agresiones son comunes; no es infrecuente encontrar animales con mutilaciones en sus pabellones auriculares o miembros (Figs. 3 y 4). Cuando en una jaula se identifica un único animal no lesionado, la solución es sencilla: aislarlo; es el único agresor. No resulta sencillo, por el contrario, identificar a más de un agresor. No obstante, resulta sorprendente la resistencia de los animales a ese tipo de lesiones. La piel de los miembros llega a recubrir por completo los extremos óseos como si de una amputación quirúrgica se tratara. En la experiencia de los autores, ni uno solo de los animales murió por esa causa. Probablemente, el hacinamiento potencia esas conductas. La observación meticolosa de las condiciones de estabulación debe minimizar esos sucesos. En líneas generales, los animales deben ser mantenidos en el animalario según las normas dictadas en el Real Decreto 223/88 de 14-3-88 del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.

Figura 3. El pabellón auricular aparece parcialmente amputado como consecuencia de una agresión.

Figura 4. Producto de una agresión, el tercio distal del miembro superior derecho ha desaparecido. Sorprendentemente, las lesiones cursan en ausencia casi total de signos inflamatorios, y los extremos de los miembros resultan recubiertos por piel como si se tratara de una auténtica amputación quirúrgica reglada.

Cuando se planean estudios sobre el tracto urinario inferior, debe quedar expresamente garantizada la ausencia de parásitos en esa localización (como el Trichosomides crassicauda), cuya presencia puede mimetizar tumores del tracto urinario. Los suministradores certifican rutinariamente el estado de salud de los ratones.

Por definición, el contagio humano a partir de tumores animales es imposible. No obstante, es prudente utilizar gafas de protección y guantes en cualquier contacto con los animales: de modo sistemático, orinan y defecan ante la menor manipulación.

2. MÉTODOS PARA LA OBTENCIÓN DE TUMORES VESICALES EN ROEDORES

Una de las estrategias pioneras en la provocación de tumores vesicales murinos ortotópicos es la descrita por deKernion y cols. en el desarrollo de su modelo MBT-2 (Mouse Bladder Tumor-2)¹⁰: la administración oral de un potente carcinógeno vesical (el N-[4-(5-nitro-2-furil)-2-tiazolil]-formanida, FANFT) da lugar a tumores vesicales en el 80-90% de los ratones C3H/He tratados. Los tumores que se obtienen son de una elevada malignidad y exhiben la apariencia histológica de un carcinoma de células transicionales pobremente diferenciado, que en sus rasgos macro y microscópicos se asemeja considerablemente a las variedades humanas. La línea celular MBT-2 se considera un modelo útil dado que los hallazgos terapéuticos alcanzados a nivel experimental han tenido su contrapartida en el cáncer vesical humano^{11,12}.

El pretratamiento de la vejiga con otro producto tóxico -el N-metil-N-nitrosourea (MNU)- determina la denudación y ulceración de la mucosa vesical, lo que favorece la implantación de los tumores^{13,14}. El principal problema de este modelo radica en que la mayoría de los tumores que se obtienen alcanzan el exterior de la vejiga. Además, los ratones deben ser sometidos a 3 inoculaciones de MNU -y otras tantas anestesias-, lo que eleva considerablemente la tasa de mortalidad perioperatoria. Finalmente, el MNU es un producto inestable en solución, lo que añade gastos y problemas técnicos a los ya existentes¹⁵.

La exposición de cultivos celulares vesicales de ratones B6 al carcinógeno 7, 12-dimetilbenz[*a*]antraceno por espacio de 24 horas da lugar a una transformación celular neoplásica conocida como MB-49³. Las células transformadas -grandes y frecuentemente binucleadas- tienden a formar acúmulos poligonales. Es habitual la presencia de vesículas citoplásmicas de contenido lipídico. La inyección subcutánea de células MB-49 provoca la aparición de tumores uroteliales sólidos y de células fusiformes, aunque en ocasiones se detectan áreas de adenocarcinoma o de tumor bien diferenciado. Otros tumores contienen áreas más anaplásicas intimamente relacionadas con acúmulos de células fusiformes, morfológicamente indistinguibles de los sarcomas.

Otro potente carcinógeno, la N-*n*-Butil-N-butan-*r*-ol-nitrosamina (BBN), añadido a la dieta de los ratones C3H, provoca tumores vesicales en 2 meses¹⁶.

La implantación de tumores previa cauterización de la vejiga reproduce de modo fiel los sucesos que tienen lugar en el curso de la resección transuretral de los tumores vesicales. En su descripción original¹⁷, la técnica incluía el cateterismo vesical con catéteres de polietileno artesanales: su extremo debía ser recortado para adaptarse a las dimensiones de la vejiga murina, lo que daba lugar a un extremo excesivamente vivo. En consecuencia, las lesiones vesicales -perforación incluida- y uretrales resultaban demasiado frecuentes¹⁵. Las modificaciones a la técnica anterior han conseguido minimizar los riesgos de perforación y extravesicalización de los tumores^{15,18}. El empleo de catéteres de Teflon (Fig. 5) -material con mayor biocompatibilidad que el polietileno- y la electrocauterización-inoculación de la vejiga en una misma maniobra han limitado considerablemente esos problemas. Este es el método utilizado por los autores (con mínimas modificaciones) para la provocación de tumores vesicales MB-49 en ratones. Brevemente, previa inmovilización, los animales son sometidos a anestesia general mediante inyección intraperitoneal de una mezcla de ketamina (0,5 ml) y diazepam (0,4 ml), a la dosis

Figura 5. De izquierda a derecha de la fotografía: cánula de venoclisis calibre 26 utilizada para el cateterismo vesical. Galga de acero inoxidable con conexión Luer cuya misión será la de actuar como electrodo en la electrocoagulación de la vejiga. Una vez introducida a través de la cánula y adaptada adecuadamente, sobresale 0,5 mm, longitud suficiente para permitir una adecuada fulguración de la mucosa vesical. A la derecha, pinza de microcirugía.

de 1,6 µl/gr de peso animal. El modo de inmovilizar al animal es sujetar fuertemente ambas orejas y la piel de la región occipital entre los dedos índice y pulgar de la mano no dominante, mientras los dedos anular y meñique de la misma mano sujetan la cola. De este modo, queda expuesto el abdomen (Fig. 6). Con las maniobras de inmovilización los animales orinan, lo que evita tener que vaciar la vejiga. Una vez anestesiados, son asegurados sobre una placa metálica (toma de tierra) en decúbito supino. Acto seguido, se procede a cateterizar la vejiga con un catéter de teflon de calibre 26 (Vasculon Plus, 26G, BOC Ohmeda AB, Helsingborg, Sweden) y 1,6 cm de longitud con conexión Luer. La uretra no es visible sin lentes de aumento. No obstante, el meato uretral es fácilmente identificable (Fig. 7). Una vez empuntado el catéter es sólo cuestión de delicadeza localizar el

Figura 7. Técnica de cateterismo uretral. Con la ayuda de un microscopio -y a simple vista, con la práctica- es posible identificar el meato uretral. Este se encuentra bajo el reborde superior de la vulva, cubierto por un capuchón cutáneo. En su porción más distal, la uretra tiene un trayecto paralelo a la cara anterior de la vagina. Posteriormente, gira bruscamente en dirección cefálica. Es en ese punto -a 4-5 mm del meato- donde se produce el mayor número de accidentes en el curso de la cateterización. En la imagen, la pinza tracciona del meato mientras la cánula comienza a deslizarse a través de la uretra.

trayecto uretral. Las maniobras en este momento deben ser extremadamente cuidadosas, dado que la perforación se produce con una extraordinaria facilidad. El empleo del microscopio operador simplifica notablemente las maniobras. Una vez cateterizada la vejiga, se bascula el catéter de modo que su pabellón se aloje entre las extremidades inferiores del animal (Fig. 8). En ese momento, se desliza un electrodo inoxidable a su través permitiendo que protrulla 0,5 mm, aplicando la menor corriente posible por espacio de 3/4 de segundo (1 pulso de 1 watio durante 1 segundo, en la descripción original)¹⁷. Tras retirar caudalmente 5 mm el conjunto catéter-electrodo, se procede a cauterizar la vejiga por segunda vez con idéntica intensidad y duración. Inmediatamente después, se inyectan $2,5 \times 10^4$ células en 100 µl de medio DMEM. Al extraer el catéter, se mantiene una muy discreta presión en el meato uretral para evitar la salida inmediata del inoculado. La presión se retira a los 2 segundos y se permite que el inoculado se vierta al exterior. Cuando el tumor se desarrolla, aparece hematuria a la semana (Fig. 9), y la vejiga -no palpable en condiciones normales- se identifica a partir de la segunda semana (Fig. 10). Antes de proceder a la implantación, conviene tener presente que la viabilidad de las células es

Figura 6. Anestesia intraperitoneal. Un modo de inmovilizar al animal es sujetar fuertemente ambas orejas y la piel de la región occipital entre los dedos índice y pulgar de la mano no dominante, mientras los dedos anular y meñique de la misma mano sujetan firmemente la cola y ejercen una discreta tracción. Queda así expuesto el abdomen. La inyección intraperitoneal con aguja de insulina es sencilla.



Figura 8. El animal anestesiado se encuentra inmovilizado en decúbito supino. Sobrepasados los primeros milímetros de uretra, la cánula ha sido basculada hasta situarla entre los miembros inferiores. Inmediatamente después, se procede a deslizar el electrodo a través de la cánula. Acto seguido, y sin ejercer la menor presión sobre el conjunto cánula-electrodo, se procede a la electrocoagulación de la vejiga.

limitada (2-3 horas en tubo de centrífuga). Por ello, debe limitarse el número de inoculaciones en función de las previsiones de trabajo del investigador.

3. ¿IMPLANTACIÓN ORTOTÓPICA O HETEROTÓPICA?

Es un hecho reconocido el que el sitio de implantación tumoral puede influir en gran medida en las características y comportamiento biológico de los tumores; la implantación ortotópica -

-vesical- proporciona un modelo más preciso para observar el comportamiento de los tumores *in vivo*¹⁹. Si el experimento incluye la valoración del efecto de agentes antitumorales (como el BCG),

el lugar de implantación tumoral juega un papel determinante: está demostrado que la respuesta inflamatoria granulomatosa es órgano-dependiente^{20,21}, variando la actividad inflamatoria de los mononucleares en función del órgano afectado. Además, las células de tumor murino MBT-2 en inyección intradérmica o subcutánea crecen lentamente, y metastatizan pobremente²². No obstante, otras células -como MB-49- crecen muy rápidamente cuando son inoculadas fuera de la vejiga. El punto ideal para la inyección es el dorso, próximo a la raíz del miembro inferior derecho. La inoculación no plantea problemas de importancia, siempre que se sujeté al animal firmemente por la cola. Esa maniobra tiene lugar en condiciones de pseudoasepsia, teniendo presente que varios ratones son inoculados con la misma jeringa. No encontrándose sueros involucrados en los procedimientos, no es esencial el cambio de material para inyección.

En resumen, la inoculación intravesical da lugar a tumores de crecimiento rápido, con extensas metástasis pulmonares, lo que proporciona un modelo mucho más similar al cáncer vesical metastásico humano.

Como contrapartida, la utilización de modelos de tumor vesical ortotópico plantea algunas dificultades: entre otras, los métodos semiobjetivos de evaluación del tamaño vesical por palpación pueden resultar excesivamente subjetivos²². Además, los sistemas propuestos para la estimación de los volúmenes de algunos tumores exigen la determinación de dos dimensiones²³; en el caso de los tumores vesicales ortotópicos, la determinación de la dimensión longitudinal puede resultar complicada al ser la vejiga un órgano retropúbico.

En una reciente experiencia (observación personal, datos no publicados) sobre 15 ratones B6 con tumores vesicales ortotópicos, los autores trataron de establecer la correlación entre el tamaño estimado por palpación vesical transabdominal a las tres semanas de la inoculación, y el volumen obtenido tras el sacrificio del animal y la medición de las dimensiones vesicales mediante un calibre de Vernier. Previa inmovilización del ratón (Fig. 10) se estimaron las dos primeras dimensiones de la vejiga. Acto seguido, se extrajo la vejiga y se midieron los diámetros longitudinal, transversal y ante-



Figura 9. Uno de los primeros signos de implantación tumoral es la aparición de hematuria. Dado que los animales orinan al menor estímulo, la comprobación del aspecto de la orina no representa ningún problema.

roposterior. La aplicación de la fórmula $(a \times b^2)/2^{23}$, donde a es la mayor de las dimensiones estimadas al tacto, y b la menor, permitió una estimación del volumen vesical a partir de la medición *manual*. La misma fórmula fue aplicada a las dimensiones obtenidas a partir de la medición con calibre. Acto seguido, se determinaron los coeficientes de correlación (r) y de regresión (r^2) entre los dos métodos. Finalmente, se establecieron la especificidad y el valor predictivo positivo (VPP) del tacto abdominal en vejigas de tamaño igual o superior a 4 mm. El coeficiente r entre ambos métodos de medida alcanzó 0,97 ($r^2 = 0,95$), $p = 0,001$. La ecuación que relacionó ambos métodos fue $VVE = 1,6262 + 0,26075 \times VVM$, donde VVE = volumen vesical estimado mediante tacto abdominal, y VVM = volumen vesical obtenido a partir de las mediciones con calibre. La especificidad y el VPP del tacto abdominal en vejigas de tamaño igual o superior a 4 mm, alcanzaron el 100%.

Recientemente, se ha empleado con éxito la resonancia magnética nuclear para la medición del volumen prostático en ratones con cáncer de próstata²⁴. Por tanto, la determinación precisa del tamaño de los tumores vesicales en animales es ya posible. De cualquier modo, si las dimensiones exactas no resultan cruciales para los experimentos -como no lo son en el proyecto de los autores-, el tacto vesical transabdominal representa un instrumento de trabajo útil y barato.

4. INOCULACIÓN DE QUIMIOTERÁPICOS

El único detalle diferencial con respecto a los procedimientos de inoculación tumoral transuretral



Figura 10. Para la palpación transabdominal es necesario inmovilizar correctamente al animal. La técnica es la ya descrita para la anestesia. Con independencia del tamaño de los tumores, es sencillo identificar el reborde del pubis. En condiciones normales, la vejiga -situada tras el hueso púbico- no es palpable. No obstante, en ocasiones es posible palpar vejigas ligeramente distendidas. Antes de extraer ninguna conclusión respecto al tamaño de la vejiga, conviene masajear ligeramente la región suprapubiana para estimular la total evacuación de orina de la vejiga.



Figura 11. Sacrificio. En decúbito prono, la mano no dominante sujetá firmemente la región cervical en tanto la mano dominante tracciona de la cola. La muerte se produce de modo instantáneo.

estriba en el tiempo durante el cual el quimioterápico debe permanecer en contacto con la vejiga. Dado que debe hacerlo por espacio de 30 minutos, la uretra debe ser ocluida. A ese fin, antes de retirar el catéter se anuda la uretra con un hilo de seda de 3-0.

5. ¿CULTIVO CELULAR O LÍNEA CELULAR TRANSPLANTABLE?

Los cultivos celulares constituyen un aspecto crucial a la hora de iniciar un programa como el que desarrollan los autores; la disponibilidad es inmediata y la independencia de terceros es total. No obstante, la logística que implica el mantenimiento de una línea celular no es despreciable. Una alternativa al cultivo celular la constituye el mantenimiento de una línea celular en forma de



Figura 12a. Laparotomía a las 24 horas de la inoculación tras fallecimiento por perforación vesical y obstrucción intestinal. La flecha negra señala la vejiga. La flecha amarilla destaca la perforación vesical. Por lo demás, el aspecto de la vejiga es el fisiológico. Las asas intestinales se hallan intensamente dilatadas y con aspecto necrótico en algunas zonas. Existe abundante líquido libre intraperitoneal de aspecto hemorrágico.



Figura 12b. En la fotografía -obtenida tras el sacrificio del animal a las tres semanas de la inoculación- se aprecia la vejiga (flecha negra) congestiva y turgente, mayoritariamente ocupada por tumor. Las flechas blancas señalan los uréteres dilatados.



Figura 12c. Secciones de una vejiga a las dos semanas de la inoculación tumoral. Crecimiento tumoral endofítico. En general, hasta las tres semanas los tumores se hallan en fase intravesical, representando un excelente modelo para el estudio de la enfermedad localmente avanzada.

tumores transplantables en ratones. Como ya se ha mencionado, la inyección de células de tumores murinos en el dorso del ratón B6 da lugar al desarrollo de un tumor en 2-6 semanas, dependiendo del tipo celular. Cuando ha adquirido un tamaño próximo a un centímetro de diámetro el tumor está listo para la manipulación. Debe evitarse el sobrecrecimiento dado que cuanto más grande es el tumor, mayor es el volumen de tejido necrótico. En esas circunstancias, debe transferirse a un nuevo animal elaborando previamente una suspensión celular para implantación. El tumor, triturado finamente (con tijeras), es depositado en una placa de Petri en una solución de RPMI (20 ml), hialuronidasa (1 mg/ml, 5 ml) y colagenasa (1 mg/ml, 5 ml). En esta solución se mantiene por espacio de 1 hora mientras se agita suavemente (movimiento orbital). De manera progresiva, se va produciendo una digestión de los tejidos que libera las células. Inmediatamente, se elimina el sobrenadante mediante succión. Acto seguido, se procede a la digestión con una solución de proteasa al 1,25% en 10 ml de DMEM. En condiciones normales, la digestión se produce en 20-30 minutos. En ese momento, la solución adquiere un aspecto más denso debido a la alta celularidad. Ese sobrenadante -solución de proteasa y células-, se recupera en un tubo de centrifugación de 50 ml y se centrifuga durante 10 minutos. Tras eliminar el sobrenadante, se añaden 10 ml de DMEM muy suavemente (sin alterar el pellet celular que descansa en el fondo del tubo de centrifugación) y II-III gotas de DNase comercial al 0,2%. El tubo debe descansar en una gradilla durante 3 minutos. Inmediatamente, se agita en agitador mecánico por espacio de unos segundos y se añade DMEM hasta completar la capacidad del tubo. De esa suspensión se trasladan 20 ml a otro tubo donde se vuelven a añadir 30 ml de DMEM. Finalmente, se toma 1 ml de esa nueva suspensión, mezclándolo con otros 20 ml de DMEM. Queda así preparada la suspensión celular para implantación tumoral. La viabilidad tumoral debe ser comprobada mediante exclusión con trypan-blue. Entonces, la suspensión celular se recupera con una jeringa y se inyecta directamente en el dorso de otro ratón. Los tumores que se desarrollan tras el trasplante lo hacen más rápidamente que los obtenidos inicialmente tras implantación de células mantenidas en cultivo celular.

6. SACRIFICIO

Los laboratorios eficientes sacrifican los animales tan pronto como éstos han cumplido su misión. Así, se abaratan costes y se minimizan los errores por masificación de la población. Una opción barata, indolora y rápida para el sacrificio de pequeños roedores es la dislocación cervical. Para ello, se dispone al animal en decúbito prono. El dedo pulgar de la mano no dominante se sitúa transversalmente sobre la región cervical ejerciendo una moderada presión, en tanto la mano dominante tracciona firmemente de la cola hasta conseguir la dislocación cervical (Fig. 11).

Los animales deben ser considerados como material biocontaminante y eliminados como tal mediante incineración.

7. PREPARACIÓN DE ESPECÍMENES PARA ANÁLISIS MORFOLÓGICO Y OTRAS DETERMINACIONES

Para el estudio de especímenes de vejiga, la cistectomía tiene lugar a través de una laparotomía infraumbilical. Tras practicar una pequeña incisión transversal, la apertura es ampliada mediante tracción longitudinal hasta conseguir un abordaje amplio (Fig. 12). Esa vía, expone la cavidad peritoneal. Mediante una pequeña incisión se accede al espacio prevesical. La cistectomía no representa el menor problema, teniendo presente que la vejiga no distendida no supera los 0,3 cm de diámetro. En función de las necesidades, la vejiga puede ser fijada en formol tamponado al 10% para inclusión en parafina, ser congelada a -70°C en N2O para determinaciones inmunohistoquímicas... Cuando se pretende obtener información sobre especímenes previamente radiomarcados, deben ser sometidos a un triturado meticoloso con el fin de obtener una suspensión homogénea.

COMENTARIOS

Las manipulaciones del animal de experimentación de pequeño tamaño (como el ratón C57BL/6) son sencillas y requieren un brevíssimo periodo de entrenamiento. Su mantenimiento es barato y no plantea el más mínimo problema logístico.

Cuando se utiliza la técnica de electrocoagulación transuretral para la provocación de tumores vesicales, existe una curva de aprendizaje. No obstante, la tasa de implantación y la morbimortalidad dependen directamente del tamaño del inóculo y de la longitud de los electrodos empleados, respectivamente.

REFERENCIAS

1. LUCIA MS, BOSTWICK DG, BOOSLAND M, COCKKETT ATK, KNAPP DW, LEAV I, POLLARD M, RINKER-SCHAFFER C, SHIRAI T, WATKINS BA, WORKGROUP I: Rodent models of prostate cancer. *The Prostate* 1998; **36**: 49-55.
2. SUMMERHAYES IC, FRANKS LM: Effect of donor age on neoplastic transformation of adult mouse bladder epithelium in vitro. *J Natl Cancer Inst* 1979; **62 (4)**: 1.017-1.023.
3. CHODAK GW, SUMMERHAYES I: Detection of angiogenesis activity in malignant bladder tissue and cells. *J Urol* 1984; **132**: 1.032-1.035.
4. LATTIME EC, GOMELLA LG, McCUE PA: Murine bladder carcinoma presents antigen to BCG-specific CD4 T-cells. *Cancer Res* 1992; **52**: 4.286-4.290.
5. DRANOFF G, JAFFEE E, LAZENBY A, GOLMBEK P, LEVITSKY H, BROSE K, JACKSON V, HAMADA H, PARDOLL D, MULLIGAN RC: Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factors stimulates potent, specific, and long-lasting anti-tumor immunity. *Proc Natl Acad Sci* 1993; **90**: 3.539-3.543.
6. SWERDLOW RD, RATLIFF TL, LA REGINA M, RITCHIE JK, EBERT RF: Immunotherapy with key-hole limpet hemocyanin: efficacy and safety in the MB-49 intravesical murine bladder tumor model. *J Urol* 1994; **151**: 1.718-1.722.
7. LEE SS, EISENLOHR LC, McCUE PA, MASTRANGELO MJ, LATTIME EC: Intravesical gene therapy: in vivo gene transfer using recombinant vaccinia virus vectors. *Cancer Res* 1994; **54**: 3.325-3.328.
8. PACHECO-RUPIL B, DEPIANTE-DEPAOLI M, RONERO O, ROMERO M, YANTORNO C: Experimental autoimmune damage to rat male accessory glands. II. T cell requirement in adoptive transfer of specific tissue damage. *Am J Reprod Immunol* 1984; **5**: 15-19.
9. KEETCH DW, HUMPHREY P, RATLIFF TL: Development of a mouse model for nonbacterial prostatitis. *J Urol* 1994; **152**: 247-250.
10. DeKERNION JB, SOLOWAY MS, PERSKY L: Chemotherapy of experimental transitional-cell carcinoma. *Urology* 1974; **4**: 63-67.
11. RAGHAVAN D, SHIPLEY WU, GARNICK PJ, RUSSELL PJ, RITCHIE JP: Biology and management of bladder cancer. *N Engl J Med* 1990; **322**: 1.129-1.138.
12. SOLOWAY MS, MURPHY WM: Experimental chemotherapy of bladder cancer -systemic and intravesical. *Semin Oncol* 1979; **6**: 166-183.
13. WELDON TE, SOLOWAY MS: Susceptibility of urohelium to neoplastic cellular implantation. *Urology* 1975; **5**: 824-827.
14. SOLOWAY MS: Intravesical and systemic chemotherapy of murine bladder cancer. *Cancer Res* 1977; **37**: 2.918-2.929.
15. SHAPIRO A, KELLEY DR, OAKLEY DM, CATALONA WJ, RATLIFF TL: Technical factors affecting the reproducibility of intravesical mouse bladder tumor implantation during therapy with *Bacillus Calmette Guérin*. *Cancer Res* 1984; **44**: 3.051-3.054.
16. HARIMOTO K, SUGIMURA K, LEE CR, KURATSUKURI K, KISHIMOTO T: In vivo gene transfer methods in the bladder without viral vectors. *Br J Urol* 1998; **81**: 870-874.
17. SOLOWAY MS, MASTERS S: Urothelial susceptibility to tumor cell implantation influence of cauterization. *Cancer (Phila)* 1980; **46**: 1.158-1.163.
18. SHAPIRO A, RATLIFF TL, OAKLEY DM, CATALONA WJ: Reduction of bladder tumor growth in mice treated with intravesical bacillus Calmette-Guérin and its correlation with bacillus Calmette-Guérin viability and natural killer cell activity. *Cancer Res* 1983; **43**: 1.611-1.615.
19. FIDLER IJ: Critical factors in the biology of human cancer metastasis: twenty-eight GHA clowes memorial award lecture. *Cancer Res* 1990; **50**: 6.130-6.138.
20. WEINSTOCK JV, BOROS DL: Heterogeneity of the granulomatous response in the liver, colon, ileum and ileal Peyer's patches to schistosome eggs in murine Schistosomiasis mansoni. *J Immunol* 1981; **127**: 1.906-1.909.
21. WEINSTOCK JV, BOROS DL: Organ-dependent differences in composition and function observed in hepatic and intestinal granulomas isolated from mice with Schistosomiasis mansoni. *J Immunol* 1983; **130**: 418-427.
22. CONNOR J, BANNERJI R, SAITO S, HESTON W, FAIR W, GILBOA E: Regression of bladder tumors in mice treated with interleukin 2 gene-modified tumor cells. *J Exp Med* 1993; **177**: 1.127-1.134.
23. TSAI J, GANSBACHER B, TAIT L, MILLER FR, HEPPNER GH: Induction of antitumor immunity by interleukin-2 gene-transduced mouse mammary tumor cells versus transduced mammary stromal fibroblasts. *J Natl Cancer Inst* 1993; **85**: 546-553.
24. HSU CX, ROSS BD, CHRISP E, DERROW SZ, CHARLES LG, PIENTA KJ, GREENBERG NM, ZENG Z, SANDA MG: Longitudinal cohort analysis of lethal prostate cancer progression in transgenic mice. *J Urol* 1998; **160**: 1.500-1.505.

Dr. A. Páez Borda
Servicio de Urología. Hospital Universitario de Getafe.
C^a de Toledo, km, 12,500. Getafe. Madrid.

(Trabajo recibido el 26 de Mayo 1999)