

Protocolos en Modelos Animales

DMBA + TPA (Papilomas)

Afeitar el lomo de ratones de unas 8 semanas de edad. Al día siguiente, aplicar tópicamente una única dosis del carcinógeno **DMBA** (9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene; D-3254 (1g) SIGMA) sobre el lomo del ratón. Hay que administrar **25 µg por ratón disueltos en 200µl de acetona**. Se lleva a cabo con una micropipeta repartiendo los 200µl por el lomo lo más rápido posible para evitar que se evapore antes de que la piel lo absorba. El DMBA se guarda a -20°C disuelto en etanol a la concentración escogida para luego diluirlo en acetona en el momento de su aplicación.

Transcurridas 48h se realiza la primera aplicación de **TPA** (phorbol 12-myristate 13-acetate; P-8139 (5mg) SIGMA), que posteriormente ha de repetirse **2 veces por semana durante 12 semanas**. Es fundamental mantener el lomo de los animales sin pelo durante todo el tratamiento para que la administración del TPA pueda ser siempre homogénea y óptima. El TPA se guarda a -20°C como stock disuelto en etanol a una concentración 10^{-2} M. A los ratones hay que administrarles tópicamente una dosis de TPA **10^{-4} M disuelto en 200µl de acetona**.

Los papilomas suelen aparecer a partir de las 7-8 semanas de tratamiento y su progresión (número y tamaño) debe evaluarse semanalmente. Los animales se sacrificarán cuando el tamaño de los papilomas alcance un diámetro de 1 cm o al término del experimento.

MCA (Fibrosarcomas)

Pelar los dos flancos de los ratones de 8 semanas de edad. Inyectar **subcutáneamente en cada flanco 100µg de MCA** (3-methylcholanthrene; 213942 (100mg) SIGMA) **disueltos en 100µl de aceite de oliva**. El MCA se debe pesar y disolver en el momento de su aplicación. Dado que el aceite tarda en absorberse y se escapa fácilmente, hay que mantener durante un tiempo la aguja introducida en el flanco y una vez retirada apretar con los dedos el orificio creado.

Los animales se valoran semanalmente a partir de la semana 7-8 para contabilizar la incidencia en la aparición de tumores, durante un período de 25-30 semanas. Se

contabilizan como tumores positivos aquellos que presentan un tamaño superior a 5 mm y que muestran un crecimiento progresivo. En el momento del sacrificio del animal todos los tumores han de ser confirmados histológicamente.

URETANO

Ratones de unas 7-8 semanas de edad se inyectan **intraperitonealmente** una primera **dosis de 1mg/ g peso corporal de uretano** (Urethane; U-2500 (100g) SIGMA). Para ello se puede preparar en el momento de la inyección una disolución de uretano en 0,9% NaCl, en una concentración de 10mg/100µl. De esta manera, si el ratón pesa 25g bastará con inyectarle 250µl de esta disolución para darle la dosis correcta. Esta inyección de uretano hay que **repetirla a las 48 horas**, con la misma dosis. Dado que el uretano es anestésico, los ratones permanecerán dormidos durante un tiempo tras la inyección, por lo que es importante mantenerlos cerca de un foco de calor.

Los tumores comienzan a aparecer a partir de los 5 meses de la inyección, por lo que transcurrido este tiempo se puede empezar a sacrificar grupos de ratones. A los ratones sacrificados se les extrae el pulmón y se les hace un contaje de los nódulos tumorales que se ven a simple vista en los pulmones, como primera aproximación para valorar la incidencia. A continuación, uno de los pulmones (más recomendable el izquierdo) se incluye en parafina para poder realizar cortes seriados de unas 10µm de grosor y con una separación entre cada corte de 100µm. De esta manera se consigue una representatividad buena de todo el volumen del pulmón y se puede contabilizar con precisión todos los nódulos que realmente tiene, además de poder hacer su valoración histológica.

AZOXIMETANO (Cáncer de Colon)

Los ratones de 6-8 semanas de edad (preferiblemente hembras) se inyectan **intraperitonealmente** con una **dosis de 12,5 mg/kg peso corporal de azoximetano** (Azoxymethane; A-2853 (25mg) SIGMA). Se puede preparar una disolución stock del carcinógeno en 0,9% NaCl a una concentración de 1mg/ml, de esta manera, si el ratón pesa 24g habría que inyectarle 300µl para darle la dosis correcta.

Transcurridos 5 días desde la administración del carcinógeno se les da el primer ciclo de **dextran sulfato** (Dextran sulfate; 216011050 (100g) Biolink) a una concentración de **2,5% disuelto en el agua de beber** durante un período de **5 días seguidos de 16 días de agua normal**.

Transcurrido este tiempo, se repite de nuevo el ciclo, es decir, **5 días de DSS al 2,5%** durante 5 días seguidos de **16 días con agua normal**.

Finalmente, después de este segundo ciclo se les da una última dosis de **DSS al 2%** durante **5 días** y tras **10 días de agua normal** se les sacrifica.

En el momento del sacrificio del animal se recoge el colon, pudiendo tomar siempre como referencia desde el orificio anal hasta la intersección con la válvula ileocecal. Una vez recogida esta porción de intestino se lava su interior con suero salino y se mide su longitud para poder comparar así posibles acortamientos debidos a la inflamación de la porción más distal. Para incluir el colon en parafina y poder tener cortes representativos de toda su longitud se puede cortar el intestino en cilindros de 1cm y colocar varios de estos en el futuro bloque.

MNU (methylnitrosourea):Linfomas tímicos

Animales de **5 semanas** se les administra una única inyección i.p. de 50 mg/Kg de peso. A las 18 semanas o cuando presentan problemas respiratorios los animales son preferiblemente sacrificados y el timo es extraído para ser procesado. Qin et al. Mice defective in the DNA mismatch gene PMS2 are hypersensitive to MNU induced thymic lymphoma and are partially protected by transgenic expression of human MGMT. 1999 , Oncogene

DMBA (cáncer de mama)

Se trata los animales semanalmente con una dosis de 1000 µg de DMBA (Sigma Chemical Co.) diluido en 200 µl de aceite de oliva (de un stock 5mg/ml) por entubación intragástrica durante 6 semanas consecutivas y comenzando a las 8 semanas de edad. Transcurridas 22 semanas después de finalizar el tratamiento se sacrifican los animales y se analiza la presencia de tumores. Masson R et al, 1998 In vivo evidence that the stromelysin-3 metalloproteinase contributes in a paracrine manner to epithelial cell malignancy.

PROTOCOL TO STUDY ANTIMETASTATIC CAPACITY OF ANTITUMOR AGENTS AGAINST HUMAN PANCREATIC CARCINOMA

The human pancreatic carcinoma cell line NP9, perpetuated as orthotopic xenograft in nude mice, is used. It produces an extensive peritoneal dissemination 4-5 weeks after implantation. Tumors are implanted in four week-old male Nu/Nu Swiss mice (Charles River), housed in autoclaved cages and provided g-ray sterilized bedding and food. They are anesthetized with 2,2,2-tribromoethanol (Sigma-Aldrich) and 10 mg fragments of each tumor from previous passages are implanted subcutaneously, in the flank of the animal, or orthotopically (at the pancreas). Xenografted animals are randomly distributed in control (n=10) and experimental (n=10) groups just before treatment. Animals bearing non palpable tumors. Treatment schedule depends on tumor growth rate. To analyze the effect of the drug on implantation, treatment starts before peritoneal dissemination had occurred, that is two weeks after tumor implantation,. Each animal in the experimental group receives intravenous (iv) administrations of the tested drug at a Maximal Tolerated Dose level or fractions daily per three weeks. In another schedule, treatment starts four weeks after tumor implantation, once peritoneal dissemination had occurred, following the same administration regime. The existence of macroscopically visible implants is confirmed one day before the treatment begins, by the sacrifice of one extra animal. After implantation, and during treatment, mice are inspected twice a week and weighted weekly to monitor for compound toxicity.

For Growth inhibition and dissemination analysis, animals are euthanized at the end of treatment and its pattern of dissemination recorded. Primary tumors are excised and weighted in both groups. Tumor aliquots are frozen down in liquid nitrogen or fixed in formaline. The number of peritoneal implants per animal are counted, and samples are taken for histological and molecular analyses. The mean tumor weight is compared between groups, using the Mann Withnney test, the differences being recorded as significant at $p < .05$.

Ramon Mangues
Oncogenesis and Antitumor Drug Group
Institut de Recerca
Hospital de Sant Pau
Barcelona
rmangues@hsp.santpau.es

Guidelines for the Design of Study Protocols to Evaluate Efficacy of Antitumor Drugs on Tumor Xenografts Grown in Athymic Mice

The purpose of these guidelines is to define a general procedural framework within which the specific study protocols aimed to determine in vivo antitumor activity of chemically defined compounds in athymic mice, bearing subcutaneous xenotransplants of solid or hematologic neoplasias. These protocols will specify the concrete compound, dose levels, administration schedules and/or administration routes to be used. These guidelines describe tumor implantation, animal randomization, experimental procedures and the evaluation of the effect on total animal weight and on tumor volume, as well as their statistical analysis, which are common to all protocols.

Tumor implantation

The tumors to be tested in each experiment will be defined by the sponsor in each protocol. Tumor lines will be obtained from ATCC or DMSZ and will be grown in culture with the recommended media. 2×10^6 cells will be injected subcutaneously in athymic mice to generate parental tumors, from which tumor aliquots will be obtained and transplanted into new animals to generate those used in the experiments. Each tumor at its initial passages will be cryopreserved, placing aliquots in vials for 1 hour in the gas phase of the Nitrogen tank, followed by immersion in liquid Nitrogen. Tumors will be used until their tenth passage; after this pass they will be discarded and new cryopreserved aliquots of lower passage number will be used instead for implantation.

Tumor implantation will be performed on Swiss nude female mice of 4-5 weeks of age and 18-24 g of weight (Charles River, Spain). The animals will be maintained in a sterile environment, in controlled-temperature cabinets with filtered air, autoclaved water and beds, and gamma-ray sterilized food.

In solid neoplasias, tumor fragments of approximately 3 mm (previously homogenized with scissors) will be used. These fragments will derive from tumors of previous passages implanted subcutaneously, and used to maintain the tumor. Mice will be anesthetized with a mixture of Xilacine (10 mg/Kg) and Ketamine (100 mg/Kg) and the implantation will be performed depositing the tumor fragment in the subcutis of the left anterior flank of the animal, using a trocher. All surgical procedures will be performed under sterile vertical laminar flow hoods. In hemathologic neoplasias, cells will be grown in culture and a total of 10^7 cells will be injected directly into the left anterior flank subcutis of the animal, under anesthesia.

Randomization and administration schedule

The evaluation of the effect of each compound on each tumor will be performed following the dose schedule indicated by the study sponsor. Typically, the doses used are the maximum tolerated dose (MTD), or fractions of the MTD of the tested compound, which has been previously determined. The sponsor will also define the administration route. The effect of the tested compound will be compared with that on the control group, which will receive only the vehicle, with the same administration schedule. A typical experiment includes a daily dose of the compound, per five days, by intravenous route, but other schedules or routes can be used. Each group will contain 7-10 animals. Each animal will be labeled with a number that will be used for its identification in order to follow up, daily, the evolution of its weight and tumor size.

Treatment with the compound or vehicle will be started when the tumors reach an approximate volume of 120 mm³, with a maximum deviation of this parameter among animals of 50%. The compound to be administered will be provided by the sponsor in an adequate formulation, which includes the vehicle to use to dissolve it, in case of parenteral administration, as a sterile formulation ready to be administered after its reconstitution.

Evaluation of Antitumor Effect

The evaluation of antitumor effect will include the daily determination of tumor volume in control and experimental animals from the initiation of treatment (day 0) and until the end of the experiment (day 12-18), measuring with a caliper two perpendicular diameters of the tumor. The total tumor volume (V) will be calculated obtaining the volume of the ellipsoid, which considers the longer (A) and shorter (E) tumor diameters, by applying the formula: $V = (E^2 \times A)/2$. We will calculate the net tumor growth for each tumor, calculating the difference between tumor volume at day n and tumor volume at day 0. We will also calculate the ratio of net tumor growth in the cohort of treated mice (T) relative to the vehicle control (C) group by dividing the mean tumor volume in experimental group by the mean tumor volume in the control group, expressing it as percentage ($\% \Delta T / \Delta C$). Moreover, we will record the number of dead

animals during the treatment period in each group and the weight of each animal daily starting on the first day of treatment, as an indirect measure of toxicity.

At the end of treatment, animals will be sacrificed and the final tumor weight as well as the viable tumor weight (tumor mass without the macroscopic necrosis) will be measured. We will evaluate, daily and along the experiment, whether or not the differences in the mean net tumor growth and body weight, among experimental and control groups, reach significance, using the analysis of variance (if more than two groups are compared) and the Mann-Whitney U tests. The difference in mean final tumor weight between groups will also be evaluated using the same statistical tests. Differences will be considered statistically significant at probability level of $p < .05$.

Ramon Manges
Oncogenesis and Antitumor Drug Group
Institut de Recerca
Hospital de Sant Pau
Barcelona
rmanges@hsp.santpau.es