



**UNIVERSIDAD DE TALCA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**  
**ESCUELA DE TECNOLOGÍA MÉDICA**

**IMPLEMENTAR EN EL BIOTERIO DE LA UNIVERSIDAD DE TALCA EL MODELO DE MELANOMA  
MURINO B16F10 EN RATONES C57BL6. *ROL DE LA SENESCENCIA CELULAR.***

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO  
DE LICENCIADO EN TECNOLOGÍA MÉDICA**

**ALUMNO: LUIS HUENTEMIL ORTIZ**

**PROFESOR GUIA: DR. RODRIGO MOORE CARRASCO**

**TALCA-CHILE**

**2019**

## CONSTANCIA

La Dirección del Sistema de Bibliotecas a través de su unidad de procesos técnicos certifica que el autor del siguiente trabajo de titulación ha firmado su autorización para la reproducción en forma total o parcial e ilimitada del mismo.



Talca, 2019

## ÍNDICE

<b>1. RESUMEN</b>	3
<b>2. INTRODUCCIÓN</b>	4
<b>3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b>	6
3.1 Senescencia celular	6
3.2 Fenotipo Secretor asociado a Senescencia	7
3.3 SASP y su relación con el Cáncer	9
3.4 Experimentación con animales de laboratorio	10
3.5 Bioética en el diseño experimental y el principio de las “3 Rs”	12
<b>4. OBJETIVOS</b>	14
<b>5. HIPÓTESIS</b>	14
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	15
6.1 Ratón C57BL/6	15
6.2 Células B16F10	15
6.3 Cultivo celular eucarionte	15
6.4 Ensayo de formación tumoral en ratones C57BL/6	15
6.5 Ensayo de metástasis en ratones C57BL/6	16
<b>7. RESULTADOS</b>	17
<b>8. DISCUSIÓN</b>	20
<b>9. CONCLUSIÓN</b>	25
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b>	26
<b>8. ANEXOS</b>	
8.1 Protocolo de manejo y cuidados de animales de laboratorio	30

## 1. RESUMEN

El cáncer es una de las enfermedades crónicas con mayor morbilidad y mortalidad en el mundo. Su variabilidad genotípica, más factores ambientales específicos, contribuyen al desarrollo tumoral y su posterior metástasis.

Durante años, se han investigado distintas alternativas de tratamiento frente a los distintos tipos de cáncer. Una de las características que se ha estudiado en el último tiempo es el estado de senescencia celular, manifestado ante situaciones de estrés y envejecimiento.

La senescencia celular puede tener efectos tanto beneficiosos como perjudiciales; una acumulación exacerbada de células senescentes puede producir una inflamación crónica, relacionada directamente a los efectos del envejecimiento, jugando un papel importante en etapas tempranas del desarrollo tumoral; por otro lado, la secreción de factores de SASP, evitan esta acumulación a través de la mediación con el microambiente, las células vecinas y el sistema inmune.

Para poder identificar estos efectos *in vivo*, es necesario el uso de modelos con animales de laboratorio, siendo utilizados bajo ciertos protocolos y normativas que garanticen el buen uso de estos reactivos biológicos, resultados experimentales válidos, y el bienestar de los animales durante los ensayos.

La estandarización de estos modelos permite establecer y corregir un diseño experimental, cuya estructura funcional debe ser el más adecuado para los intereses de los investigadores, considerando el tiempo establecido para los procedimientos, los recursos humanos y financieros del laboratorio.

Los resultados de las pruebas piloto demostraron que los protocolos experimentales que fueron aplicados en el desarrollo experimental requieren de cambios necesarios para que las condiciones vinculadas al trabajo con animales puedan ser replicables. Al ser procesos operador-dependiente, es necesario un entrenamiento con animales, por lo que es parte de la estandarización dentro del protocolo de trabajo.

## 2. INTRODUCCIÓN

El cáncer es una de las principales enfermedades crónicas causantes de mortalidad, representando la segunda causa de muerte a nivel mundial. Su etiología tiene origen en factores genéticos y/o ambientales que ayudan al desarrollo fisiopatológico del cáncer. El envejecimiento suele ser un factor de riesgo para el desarrollo del cáncer, siendo más prevalente en adultos mayores de 65 años; la causa de esto se puede explicar por varios factores moleculares, celulares y fisiológicos, aunque la carcinogénesis es desencadenante frente a factores ambientales y estilo de vida de cada persona. La acumulación de mutaciones, el silenciamiento de ciertos genes y la disfunción de las telomerasas favorecen la aparición de ciertas neoplasias. Sin embargo, la acumulación de células senescentes en el organismo podría explicar en parte el desarrollo tumoral. La senescencia fue asociada durante mucho tiempo al envejecimiento; no obstante, actualmente se refiere a un programa de transducciones de señales que conllevan la detención irreversible del ciclo celular y que van acompañadas de un fenotipo característico. Juega un papel de gran importancia en el mantenimiento de la funcionalidad de los tejidos, especialmente como supresora de tumores, ya que limita la proliferación de células dañadas que tienen un riesgo potencial de transformación neoplásica.

Los estudios de fisiopatologías de alta complejidad como el cáncer requieren de modelos experimentales que permitan replicar de forma exacta la fisiopatología de la enfermedad. El uso de modelos celulares y animales permiten el estudio de enfermedades de forma cualitativa y cuantitativa, logrando tener información transversal de la patología. Los modelos celulares *in vitro*, a pesar de entregar datos importantes, no son suficientes ya que no representan las condiciones fisiológicas de un organismo complejo como el de un mamífero, donde confluyen distintos sistemas, hormonas, proteínas, enzimas, condiciones genéticas, físicas, etcétera. El uso de animales como reactivos biológicos en el contexto de la investigación científica ha aportado muchos beneficios para el estudio de enfermedades y el desarrollo de tratamientos efectivos. Los animales de experimentación tienen características propias que pueden convertirse en criterios de elección para el investigador, dependiendo de los objetivos generales de la investigación, las características de los ensayos, entre otros. Cualquier especie que sea utilizada

en la experimentación animal, están protegidos bajo ciertas leyes y protocolos bioéticos impuestos por cada institución, país u organismo internacional, donde se regula el uso de estos modelos y las condiciones a las que serán sometidos. Las regulaciones permiten generar las directrices de todo lo relacionado con experimentos con animales. Entre los animales seleccionados para ensayos en las ciencias biomédicas, el ratón es el animal de laboratorio mejor caracterizado genéticamente; si a esto se suma su fácil manejo, corto período gestacional, camadas grandes y rápida madurez sexual, lo que lo hace una especie óptima para la creación de modelos. Para la estandarización de un modelo experimental, se requiere de un correcto diseño experimental que pueda garantizar un adecuado número de animales planteado desde el principio de las “3 Rs”, un refinamiento de los procedimientos y la obtención de resultados fiables y repetibles; por otra parte, un diseño experimental debe ser elaborado bajo los recursos humanos y financieros disponibles. Los parámetros que sean impuestos en el diseño experimental tendrán un impacto directo en los resultados de los ensayos, tales como la cepa del ratón elegida, la edad y los procedimientos experimentales que serán realizados. El tratamiento de ratones con células tumorales, requiere de una estandarización en cada paso de la manipulación del ratón y en los materiales que serán ocupados para eso, como lo son el inóculo, dosis, vía de inyección, frecuencia de la inoculación, uso de anestésicos, definir el punto final de experimentación y el punto final de experimentación humanitario (eutanasia del ratón frente a tumores exacerbados que puedan causar sufrimiento al individuo).

Una prueba piloto del diseño experimental ayuda a definir y desarrollar la experimentación, conseguir resultados con el objetivo de rectificar los procedimientos establecidos. La determinación del tamaño de la muestra debe contemplar procedimientos estadísticos, considerando siempre un mínimo estadístico por cada grupo para asegurar la fiabilidad de los resultados. Para evitar errores sistemáticos o sesgos, los animales deben estar en las mismas condiciones de ambiente, alimentación y trato, antes, durante y después del ensayo; se incluyen los correspondientes controles.

### 3.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Senescencia celular

La senescencia celular se define como la etapa en la cual las células han llegado al máximo de su capacidad proliferativa y no pueden duplicarse más, alcanzando el límite de Hayflick. El ciclo celular se suspende de forma irreversible en la fase G0/G1 (1), por tanto, las células senescentes no responden a mitógenos, sin embargo, permanecen vivas, siendo distinguibles mediante rasgos morfológicos y moleculares, aunque no sean rasgos universales o específicos.

Las células senescentes presentan alteraciones morfológicas como un aumento del tamaño con aspecto aplanado y una gran cantidad de vacuolas (2). A nivel fisiológico son metabólicamente activas, pero presentan una expresión génica perturbada, lo cual conlleva una alteración en la expresión de proteínas, asociada a los cambios morfológicos descritos anteriormente; a esto se suma una disminución en la respuesta celular ante estímulos mitogénicos y/o apoptóticos (3). Por otra parte, este tipo de células presentan modificaciones a nivel de la heterocromatina conocidas como *senescent associated heterochromatin foci* (4); aumentan la expresión de  $\beta$ -galactosidasa lisosomal también denominada SA-BetaGal ( $\beta$ -galactosidasa asociada a la senescencia), y aunque se desconoce la razón de este aumento, la medición de la actividad de esta enzima sirve como un marcador del estado senescente (5).

A nivel molecular, la respuesta de la senescencia está sometida a una estricta regulación donde juegan un papel importante ciertos genes y las vías del cáncer, como retinoblastoma, p53 y los productos del locus CDKN2A, p16INK4A y ARF (6).

La senescencia celular como tal no solo se expresa a través de la suspensión del crecimiento de la célula, sino que también se manifiestan cambios funcionales que en su conjunto definen un fenotipo senescente. (7).

Las células senescentes logran comunicarse con su entorno, principalmente mediante un conjunto de factores solubles que son liberados por estas células, conocido como fenotipo secretor asociado a senescencia o SASP (8). La acción de SASP es clave en la actividad *in vivo* de las células senescentes; puede extender el fenotipo senescente a células del entorno mediante un mecanismo paracrino y promover la eliminación de células senescentes mediante el reclutamiento de células del sistema inmune. Sin embargo, SASP tiene efectos perjudiciales puesto que puede promover el crecimiento tumoral o causar deterioro de los tejidos durante el envejecimiento.

### **3.2 FENOTIPO SECRETOR ASOCIADO A SENESCENCIA (SASP)**

Ante la alteración funcional que ocurre en los tejidos por la acumulación de células senescentes se ha explicado por ciertos componentes pro inflamatorios que secretan dichas células y que comprometen el microambiente celular. Al conjunto de moléculas secretadas se les denomina como SASP.

Se caracteriza por un incremento en la secreción de aproximadamente 40-80 factores involucrados en diferentes vías de señalización intracelular (9, 10). Incluye algunas familias de factores solubles e insolubles que modulan las células circundantes, ya que activan receptores de superficie de membrana y su correspondiente vía de transducción de señales, pudiendo conducir a múltiples enfermedades.

La presencia de células senescentes *in vivo* puede ser significativa, lo que dependerá en gran medida de su persistencia. La senescencia temporal se activa como respuesta frente a situaciones de estrés o por señales fisiológicas, siendo posteriormente eliminada mediante la acción de SASP, siendo una regulación favorable para el organismo, ya que evita una respuesta exacerbada. Por otra parte, la acumulación de células senescentes a largo plazo, como por ejemplo el envejecimiento o ciertos tipos de fibrosis es perjudicial, principalmente por los efectos negativos asociados a la producción crónica del SASP, como inflamación o deterioro de la integridad de los tejidos (11).

Los factores de SASP pueden dividirse en dos categorías principales: factores de señalización solubles o proteínicos (interleuquinas, quimioquinas, factores de crecimiento y proteasas) y componentes insolubles o no proteínicos (especies reactivas de oxígeno [ERO]) (12).

En los factores solubles, su composición puede variar dependiendo del tejido y el tipo celular donde actúan. En gran parte de los estudios sobre SASP, se ha descrito un aumento en la secreción de Interleuquina 6 (IL-6), que tiene una función pleiotrópica; se ha demostrado un aumento significativo en la secreción de IL-6 en queratinocitos, melanocitos, monocitos, fibroblastos y células epiteliales de ratón y de humano, después de un daño al DNA al inducir senescencia mediante oncogenes (13, 14). Otras interleuquinas que pueden expresarse en SASP son Interleuquina 1 (IL-1), tanto IL-1 $\alpha$  como IL-1 $\beta$ , siendo sobre expresadas y secretadas por fibroblastos, células endoteliales senescentes y epiteliales senescentes inducidas por quimioterapia (15). La expresión de Interleuquina 8 (IL-8) está condicionada por la secreción de IL-1 $\alpha$ , lo que indica que hay una regulación en los componentes de SASP.

Las proteasas de SASP tienen efectos sobre el microambiente: actúan sobre proteínas de los receptores asociados a membrana haciéndolos solubles, degradan moléculas de señalización y transformar la matriz extracelular. Estas acciones constituyen potentes mecanismos donde las células senescentes pueden modificar el microambiente del tejido (2).

En los factores no proteicos, los principales componentes son las especies reactivas de oxígeno (ERO), además de iones y ciertos ARNs; las células senescentes liberan óxido nítrico y ERO, ya que se han detectado ciertas alteraciones en la actividad de la enzima óxido nítrico sintasa endotelial y la superóxido dismutasa (16,17). Estos compuestos pueden aumentar la agresividad de las células tumorales, así como provocar el envejecimiento y las enfermedades relacionadas con la edad (18).

### 3.3 SASP y su relación con el cáncer

Los factores de SASP confieren a las células senescentes la facultad para producir cambios en el microambiente extracelular, activándose vías de señalización que pueden modificar la respuesta en células adyacentes. Sin embargo, SASP puede producir efectos contrarios entre los distintos factores, provocando daño tisular o envejecimiento, como tener efectos benéficos para el organismo (19).

SASP como tal, es una característica de las células senescentes que se asocia una cascada de señalizaciones que se activa como respuesta a un daño del DNA (DDR), siendo necesario para aumentar la secreción de interleuquinas y un grupo de factores, lo que es una respuesta necesaria para que se presente SASP. Las células senescentes asociadas a DDR entran en esta condición debido a una sobreexpresión exógena de p21 o p16, además de requerir de p53 para la detención en la proliferación celular; sin embargo, estas no son condiciones suficientes para la secreción de SASP. Se ha demostrado un desarrollo de SASP en células senescentes debido a un daño del DNA y telómeros disfuncionales, alteraciones epigenéticas, señales mitogénicas, estrés oxidante y otros estímulos que producen senescencia, lo que sugiere que SASP cumple una función de garantizar la comunicación del estado comprometido de la célula senescente a sus células vecinas, preparando de esta forma al tejido para la reparación o la regeneración. Estimula al sistema inmune para la eliminación de células senescentes y así evitar una acumulación (20).

Sin embargo, una secreción exacerbada de SASP puede producir una inflamación crónica (21), siendo comúnmente asociada a enfermedades relacionadas a la edad, tanto degenerativas como hiperplásicas (22). La inflamación crónica juega un papel importante en etapas tempranas del cáncer (12); SASP puede estimular la proliferación y la diferenciación celular (22), así como la angiogénesis y la transición epitelio-mesénquima (TEM), lo que favorece la metástasis en las células pre malignas (23).

### **3.4 Experimentación con animales de laboratorio**

Los modelos animales de laboratorio es un elemento fundamental para la investigación en ciencias biomédicas. Su importancia radica en que sirven para aplicar y comprender las patologías, causas, diagnóstico y su tratamiento. Los avances en las ciencias biomédicas han permitido el desarrollo en la prevención de enfermedades mediante el uso de medicamentos y vacunas que han podido ser controlados mediante estos modelos.

Para el investigador, los animales de laboratorio son un reactivo biológico, que hasta la fecha es insustituible, y que debido a sus características biológicas deben ser constantemente controlados, vigilados y contrastados, como cualquier reactivo de laboratorio, cuidando de su pureza y evitando una posible contaminación biótica. Por eso, se requiere que la producción de estos animales sea de forma estandarizada y definida, con características genéticas y sanitarias similares, cuidados en un ambiente adecuado y controlado donde se cumplan los requerimientos específicos de la especie (24).

El estado sanitario de los animales va a tener un impacto significativo en los resultados de las investigaciones; el uso de animales en mal estado, conduce inevitablemente a errores en los resultados, siendo necesario la repetición de las pruebas, lo que conlleva a un aumento en el costo monetario. Sin embargo, lo más importante desde el punto de vista bioético, es que la manipulación de animales mal cuidados para fines científicos, se considera una irresponsabilidad, ya que se está trabajando con seres vivos, pasando a llevar el bienestar del animal.

Dentro de los modelos de experimentación, el ratón es el animal más usado para la investigación científica, destacando entre sus características, su tamaño pequeño, fácil manejo, corto período gestacional, camadas grandes y rápida madurez sexual, además de ser el animal de laboratorio mejor caracterizado genéticamente, lo que lo convierte en una especie óptima para la creación de modelos (25).

Al momento de desarrollar un modelo animal, es necesario tener en consideración la fisiología y anatomía comparada del modelo a emplear, ya que a pesar de su alto costo y dificultad en las condiciones que se deben tener para su conservación, se puede presentar variaciones en las respuestas fisiológicas ante una enfermedad inducida o espontánea.

Los modelos animales tienen un fin exploratorio, determinando funciones biológicas anormales, valorar y cuantificar el efecto de un tratamiento específico. Para que los resultados obtenidos puedan ser comparables y tengan una validez, requieren de un correcto diseño experimental.

El diseño experimental permite estimar el tamaño necesario de individuos que pueda garantizar el desarrollo de los experimentos a realizar, y la obtención de resultados fiables y repetibles; se debe determinar un mínimo estadístico por cada grupo de estudio, teniendo en cuenta los procedimientos estadísticos, incluso la experiencia del propio investigador. El correcto diseño va a tener un impacto positivo en el resultado experimental, además de que considera factores tales como los recursos humanos y financieros del laboratorio. Parte importante de esto es la elección de la especie a estudiar, sexo, edad y cepa a utilizar; por su parte, también es necesario estandarizar los procedimientos a los que serán sometidos los individuos, sean estos invasivos o no, tales como el inóculo, dosis, vía de inoculación y la frecuencia en que se hace. Se debe definir el ambiente en que se mantendrán y la alimentación y/o suplementos que recibirán antes, durante y después de los ensayos. Es importante definir el tiempo que durarán los ensayos, definir el punto final de la experimentación, analgesia y el punto final de experimental humanitario, cuando las condiciones del animal sean incompatibles con la vida, o sean signo de sufrimiento para el animal (26, 27).

Las pruebas piloto, para estos casos, cumplen un papel importante en el diseño experimental, ya que permiten definir y desarrollar un modelo experimental apropiado. Los resultados obtenidos deben ser estudiados y validados con el fin de rectificar los procedimientos establecidos (28).

Para evitar errores sistemáticos o sesgos, los animales deben ser tratados de igual forma antes y durante el ensayo experimental, con el correspondiente uso de controles positivos y negativos (28).

### **3.5 Bioética en el diseño experimental y el principio de las “3Rs”.**

En varios países desarrollados existen protocolos e instituciones que regulan el uso de animales de laboratorio, como lo son la *International Council for Laboratory Animal Science* (ICLAS), *Canadian Council of Animal Care* (CCAC) y *Federation of European Laboratory Animal Science* (FELASA), entre otras (29). Estas instituciones entregan las recomendaciones y las normas sobre el cuidado y uso adecuado de los animales de laboratorio dentro del marco científico, técnico y ético (30). La creación de estas instituciones ha dado paso a nuevas disciplinas dentro de la medicina veterinaria.

En 1959, William Rusell y Rex Burch formularon los principios sobre el manejo responsable de animales de laboratorio en su libro “The principles of humane animal experimental techniques”, presentando como debe ser regulado su uso dentro de las prácticas experimentales. Estos principios son aplicados por los comités institucionales de cuidado y uso de animales de laboratorio, cuya misión es evaluar los protocolos de investigación y asegurar que todos los procedimientos se realicen acorde reglamentaciones internas de las propias instituciones y dentro del marco legal establecido por cada país o estado. En este libro se hace hincapié en los principios bioéticos ligados a uso humanitario de especies animales, mediante el uso de las tres “Rs”. Estos son fundamentos para una racional e inteligente estrategia para minimizar el uso de animales y las causas de dolos y diestrés (31).

Las “3 Rs” están conformadas por tres criterios principales:

- i) Reemplazo: se refiere a métodos que eviten o ayuden a reemplazar el uso de animales. Los procedimientos que se desarrollen *in vivo* deben ser reemplazados dentro de las posibilidades por métodos alternativos que no usen animales vivos,

como modelos matemáticos, pruebas serológicas, cultivos celulares y sistemas biológicos *in vitro*. El uso de animales es ético cuando no hay otras alternativas y su propósito principal está vinculado con la obtención de un bien mayor (32).

- ii) Reducción: se refiere a métodos que ayuden a reducir el número de animales que se usan en experimentos. Los diseños experimentales que requieren el uso de animales de laboratorio deben ser realizados con un tamaño mínimo necesario para obtener resultados estadísticamente válidos. La selección del modelo más adecuado contribuye a que los resultados finales sean fehacientes (33).
  
- iii) Refinamiento: se refiere a los métodos que ayuden a minimizar cualquier dolor o angustia y que permitan el bienestar animal. Esto involucra una estandarización según parámetros internacionales, como la definición genético-sanitaria y la calidad del ambiente donde son criados y mantenidos los animales antes y durante la experimentación. Se deben establecer los procedimientos para minimizar y eliminar el dolor, así como los métodos de enriquecimiento para asegurar el bienestar animal (34).

## 4. OBJETIVOS

### Objetivo general:

Implementar el modelo de melanoma murino B16F10 en el bioterio de la Universidad de Talca y evaluar el rol del Fenotipo secretor asociado a senescencia en cáncer.

### Objetivos específicos:

- Caracterizar cultivo *in vitro* de células B16F10 para su uso posterior *in vivo*
- Estandarizar el modelo de inoculación subcutánea de las células B16F10 para evaluar masa tumoral en ratones C57BL6.
- Estandarizar el modelo de inoculación intravenosa de las células B16F10, para evaluar metástasis pulmonar en ratones C57BL6.

## 5. HIPÓTESIS

La estandarización de las condiciones del ensayo en el modelo de melanoma murino B16F10 en ratón C57BL6, permite obtener un diseño experimental adecuado para los estudios *in vivo* del efecto del fenotipo secretor de células senescentes (SASP) en la progresión y metástasis de tumores formados por células B16F10.

## 6. MÉTODOS Y MATERIALES

**6.1 Ratón C57BL/6:** es un modelo *wild type*, singénico de ratón (*Mus musculus*) no modificado genéticamente, adultos machos de más de 8 semanas de vida, de peso aproximado entre 30 a 50 gramos. Debido a sus características, permite abordar el crecimiento del tumor primario como de metástasis, gracias a sus células pigmentadas con melanina, que facilitan la observación macroscópica.

**6.2 Células B16F10:** provienen de células de melanoma que originalmente fueron aisladas de ratones de cepa C57BL/6. Son células tumorales de carácter singénico, y que pueden ser utilizadas en estudios tanto *in vitro* como *in vivo*, pudiendo ser implantadas de forma subcutánea para evaluar crecimiento e invasión tumoral, sin la necesidad de inmunosuprimir a los ratones. Por otra parte, pueden ser inyectadas por vía intravenosa a través de la vena cauda del ratón, para evaluar la capacidad de formar metástasis, teniendo en consideración el tropismo de estas células por el pulmón.

**6.3 Cultivo celular eucarionte:** se sembró  $1 \times 10^6$  células de la línea B16F10 en placas de 100 mm cada una en 6 mL de medio RPMI 1640 completo, con suero fetal bovino al 10% y antibióticos: Gentamicina (0,025 mg/mL), Anfotericina (0,05 mg/mL) y Plasmocina profiláctica. Al momento de alcanzar una confluencia de entre un 70-80% (24-36 horas post siembra), las células fueron recolectadas para obtener  $2 \times 10^6$  células/500 uL de medio RPMI (35) para el ensayo de metástasis, y  $3 \times 10^6$  células/300 uL de medio RPMI para el ensayo de formación tumoral (36).

**6.4 Ensayo de formación tumoral en ratones C57BL/6:** se usaron 6 ratones adultos (>8 semanas de vida), los cuales recibieron una inyección subcutánea de 300.000 células cultivadas en condiciones mencionadas anteriormente, en el flanco derecho del ratón (Ver Anexo 1 “Protocolo de manejo y cuidados de animales de laboratorio”, Página 42). Los ratones fueron

mantenidos con acceso libre al agua y comida, en un ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad; le realizó un seguimiento durante 21 días desde la inoculación, en donde se revisaron cambios físicos del ratón, además de la palpación de la masa tumoral. Desde el día en que el tumor es detectado por palpación, se comenzó las mediciones (alto y ancho en milímetros) para calcular el volumen mediante una fórmula: ancho x largo x  $\pi/6$ . El registro se llevó a cabo hasta el día 21 post inyección.

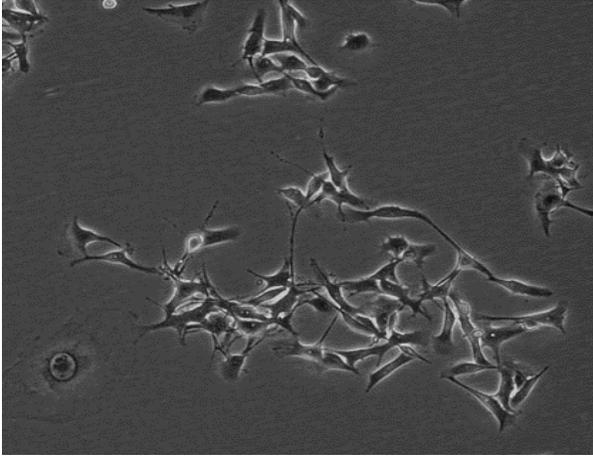
Los ratones fueron sacrificados después de los 21 días de estudio, o hasta que alcanzaran el tamaño tumoral permitido (2500 mm<sup>3</sup>).

**6.5 Ensayo de metástasis en ratones C57BL/6:** se usaron 6 ratones adultos (> 8 semanas de vida), los cuales recibieron una inyección intravenosa de 200.000 células cultivadas en condiciones anteriormente descritas, a través de la vena caudal. Los ratones fueron mantenidos con acceso libre al agua y comida ratón (Ver Anexo 1 “Protocolo de manejo y cuidados de animales de laboratorio”, Página 42). Se hizo un seguimiento durante 21 días post inyección. Durante este tiempo se realizó un control de peso diario, aspecto y comportamiento de los animales.

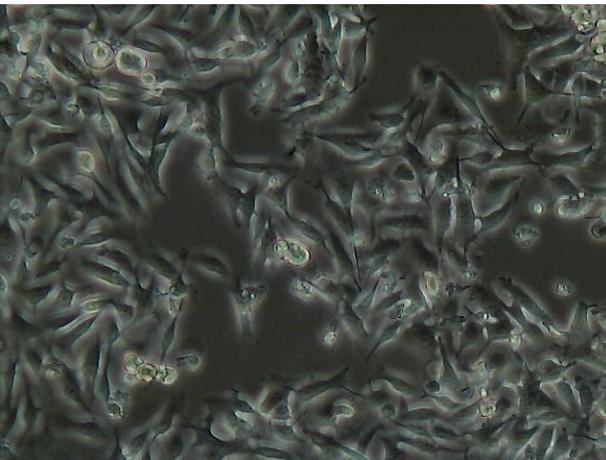
Los ratones fueron sacrificados después de los 21 días de estudio, o hasta que sufrieran una pérdida >20% del peso corporal.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Resultados Objetivo Específico Uno



**Figura 1.** Fotografía de células B16F10 en placa de 100 mm. Imagen tomada a las 24 horas del cultivo primario a partir de células congeladas a  $-80^{\circ}$  C. Se observa la formación de una monocapa en la superficie de la placa. Se presenta una baja densidad, con una morfología normal. Objetivo 10x.



**Figura 2.** Fotografía de células B16F10 en placa de 100mm. Imagen tomada a las 48 horas del cultivo primario. Se observa una confluencia en la monocapa, con una morfología normal. Presencia de algunas células suspendidas en el medio de cultivo. Objetivo 10x.

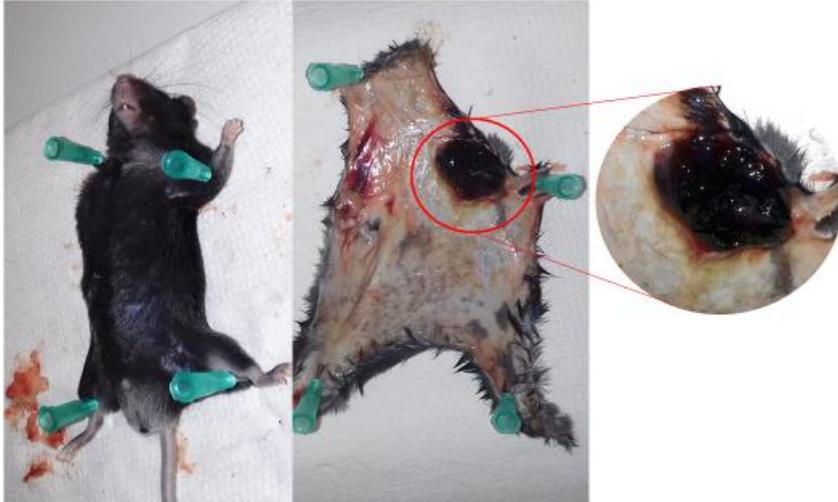
Cultivo	Concentración (Células/mL)	% de viabilidad
Primario	1.200.000	90.9%
Subcultivo	1.450.000	87.5%
Subcultivo	1.350.000	93.7%
Subcultivo	2.850.000	95.4%
Subcultivo	1.180.000	91.7%
Subcultivo	1.560.000	90.2%
Subcultivo	4.370.000	89.6%
Subcultivo	2.110.000	92.4%

**Tabla 1.** Recuento de células B16F10, desde un cultivo primario de células anteriormente congeladas a -80° C. Durante los siguientes subcultivos que se realizaron, se evidenció una buena confluencia por placa, con una viabilidad celular por sobre el 90%. Recuento realizado con Contador automático Luna II de Logos Biosystems.

## 7.2 Resultados Objetivo Específico 2

Día	Ratón 1 (gramos)	Ratón 2 (gramos)	Ratón 3 (gramos)	Ratón 4 (gramos)	Ratón 5 (gramos)
1	31	30	30	26	30
2	31	30	31	27	32
3	32	30	31	26	31
4	32	30	30	27	30
5	32	31	30	27	31
6	31	31	30	27	31
7	31	29	30	26	30
8	31	30	31	26	30
9	32	30	30	27	31
10	32	30	30	26	30
11	32	29	30	26	30
12	33	30	31	26	30
13	34	30	32	26	31
14	34	32	30	26	32
15	33	31	30	26	30
16	33	30	30	27	30
17	32	30	31	26	31
18	32	31	31	26	31

**Tabla 2.** Registro del control de peso de rutina diaria en ratones del modelo subcutáneo. Durante el período de duración del ensayo, no se evidenciaron cambios significativos en el peso de los ratones, lo que fue concordante con la revisión de otros parámetros como el aspecto y el comportamiento de los ratones.



**Figura 3.** Fotografía de necropsia del ratón n° 3. Después de la eutanasia, se logró percibir una masa palpable cercana al flanco derecho (imagen izquierda). En la extensión de la zona subcutánea se observó una masa de  $46 \text{ mm}^3$ , de color negro sugerente de masa tumoral, rodeado de muchos vasos sanguíneos producto del angiogénesis. Se realizó una biopsia del tumor, en solución fijadora de formalina tamponada durante 24 horas para estudios histopatológicos.

### 7.3 Resultados Objetivo Específico 3

El ensayo no pudo ser realizado por falta de experiencia al momento de canular la vena lateral del ratón.

## 8. DISCUSIÓN

Las células B16F10 después de su descongelación y posterior cultivo celular, presentó una buena confluencia durante todos los pasajes de cultivo a los que fueron sometidos. Luego de su descongelación, las células fueron cultivadas en medio RPMI 1640 con suero fetal bovino al 10%; se realizó un seguimiento de la confluencia de estas células mediante la observación microscópica de las placas y un recuento de células después de cada tripsinización. Como se puede observar en las imágenes 1 y 2, a las 48 horas se pudo observar una gran confluencia de las células en monocapa, con presencia de algunas células desprendidas producto del reducido espacio en la placa y la notable disminución de nutrientes en el medio de cultivo y la gran cantidad de desechos metabólicos.

En el recuento celular, se informaron concentraciones entre  $1,5 \times 10^6$  células/mL hasta los  $4 \times 10^6$  células/mL, por lo que considerando que el volumen total del medio celular es de 6 mL por placa, se pudo obtener hasta 24.000.000 de células por placa. La viabilidad en las placas estudiadas estuvo por sobre el 90%.

Esta gran capacidad de confluencia en un tiempo reducido permite desarrollar un modelo experimental en donde no se pone en riesgo algún cambio en la morfología o cambios metabólicos. Por otra parte, se destaca que la sobrevivencia de las células después de efectuar cada subcultivo, se mantuvo durante los días en que se desarrolló el cultivo.

Este modelo celular se diferencia de otras, en que se puede desarrollar investigación tanto *in vivo* como *in vitro*. Como se sabe, las células de un cultivo primario que crecen en monocapa, como las células B16F10, son dispersadas mediante métodos enzimáticos, principalmente mediante la acción de la Tripsina, para luego pasar a nuevas placas mediante subcultivo. Esto permitió que las células se conservaran durante las sucesivas generaciones. Normalmente, las líneas celulares tienen una vida finita, la cual depende del tipo de célula,

logrando perdurar entre 20 a 100 generaciones. Ya cuando las células superan el límite, entran en un estado de senescencia celular, perdiendo su capacidad de proliferar, y mueren. Sin embargo, en células provenientes de roedores y en células tumorales, se observa un comportamiento distinto, ya que evitan entrar al estado de senescencia, dando lugar a líneas celulares continuas que crecen de forma indefinida. Este comportamiento particular es propio de células cancerígenas que son el resultado de cambios genotípicos generados *in vivo*, ya sea de forma espontánea (exposición a radiaciones ionizantes o a carcinógenos químicos) o inducida (infección vírica o por transfección de DNA).

A pesar de ser células provenientes de melanoma murino con una alta tasa de sobrevivencia en cultivo, requieren de crecimiento en monocapa, lo que significa que las células se adhieren al sustrato para poder iniciar la proliferación. Es una característica que permite a las células después de descongeladas, poder proliferar hasta alcanzar el estado de confluencia. Las células tumorales por lo general no muestran una inhibición por contacto luego de que la superficie de la placa es cubierta, pudiendo incluso seguir dividiéndose y apilándose por montones. Sin embargo, por protocolo es necesario tripsinizar la placa confluyente, ya que las células pueden suspenderse en el medio, perdiendo su morfología característica y sus propiedades fisiológicas después de varias horas en ese estado; esto se puede evidenciar por una disminución en la tasa de viabilidad en una placa confluyente después de 72 horas, obteniendo entre un 70-80% de viabilidad en estos casos.

El uso de un modelo murino como la C57BL6, se justifica por la estabilidad de la cepa y su fácil crianza, además de ser una cepa ampliamente usada en modelos experimentales *in vivo*, tanto fisiológicos como patológicos. Como punto principal, es un modelo experimental singénico, ya que las células B16F10 provienen de melanoma murino de la cepa C57BL6; existen diversos artículos científicos donde se ha trabajado con este modelo, ya que el riesgo de rechazo por parte del sistema inmune del ratón disminuye significativamente. A esto se suma que la inoculación de células B16F10 en este modelo animal es efectiva, obteniendo masas tumorales a nivel subcutáneo, o permitiendo llegar a un estado de metástasis, gracias al tropismo

de estas células por los pulmones del ratón. Los resultados *in vivo* obtenidos en este modelo son perfectamente replicables.

Para este ensayo se prefirió el uso de ratones *wild type* por sobre inmunodeprimidos, ya que se intentó replicar la formación de tumores subcutáneos bajo condiciones fisiológicas normales de un individuo inmunocompetente; al ser inoculadas células singénicas de la cepa, no era necesario inmunodeprimir a los ratones, cosa contraria a lo que se debe hacer cuando se intenta inocular células cancerígenas de origen humano en un modelo murino, debido al alto riesgo de rechazo, aloinmunización y destrucción de las células implantadas. En los ratones *wild type* están todos los factores involucrados en el desarrollo del tumor, replicando en gran medida a lo que sucede en el desarrollo de cáncer en personas inmunocompetentes.

En el modelo subcutáneo, 6 de los ratones que conformaban el ensayo fueron sometidos a una anestesia previa con isoflorano, para posteriormente ser inoculados en el flanco derecho del ratón, con una inyección de células B16F10 suspendidas en 300 µL de medio RPMI 1640 sin aditivos. Luego de la inoculación, uno de los individuos murió por una arritmia, producida por un exceso en la dosis de anestesia. El manejo inicial de los ratones y el proceso de anestesia de los ratones fue desarrollado por el equipo de veterinaria del bioterio de la Universidad de Talca.

A partir del día 1, se realizó una revisión diaria de los ratones, en donde se controlaba el aspecto general, comportamiento y cambio de peso respecto del pesaje inicial, según lo indica el protocolo aprobado por el Ciecual.

Como se puede observar en la tabla n° 2, durante los 18 días que duró el ensayo *in vivo*, no hubo cambios significativos en el peso de los ratones, ni masas subcutáneas que pudiesen ser detectadas mediante el tacto en la zona de inoculación. En cuanto al aspecto y el

comportamiento de los ratones, no hubo cambios durante los días del ensayo, por lo que no fue necesario establecer alguna medida especial hacia algún individuo.

El día 18 del ensayo, los ratones fueron anestesiados y sacrificados mediante inyección letal y mediante rotura del diafragma. Los ratones fueron sometidos a necropsia, y despellejados para poder observar la zona subcutánea en búsqueda de masas tumorales.

Como se puede observar en la figura n° 3, el ratón n° 3 fue el único que desarrolló una masa tumoral de color negro en la zona del flanco derecho, con un volumen de 300  $\mu$ L. En el ratón n° 1 se observaron dos manchas negras adheridas a la zona subcutánea, sugerentes de masa tumoral. Se realizó la biopsia del tumor para estudios histopatológicos posteriores. No se observó presencia de masas tumorales en tejidos blandos.

El ensayo subcutáneo tuvo un 20% de éxito, siendo un resultado heterogéneo y no replicable en todos los individuos del ensayo, por lo que el protocolo de trabajo aplicado en este modelo no garantiza la formación de masa tumoral deseado para los estudios que se desean abordar a posteriori. Las causantes de este resultado pueden ser variables, partiendo por la concentración del inóculo; para este ensayo se inocularon 300.000 células, suspendidas en RPMI 1640, en un volumen total de 300  $\mu$ L dentro del espacio subcutáneo.

La principal explicación de que no se haya formado un tumor es la posible dispersión de las células tumorales dentro del espacio subcutáneo, sumado a que la concentración usada en el inóculo no fue la adecuada para desarrollar una estructura compacta. Una de las posibles correcciones es cambiar la zona de inoculación, preferiblemente en la zona intradérmica, al ser un área más restringida se evita que las células se dispersen y puedan desarrollarse de mejor forma. En algunos artículos científicos, se plantea un protocolo de trabajo con bajos volúmenes de inoculación con una alta concentración de células para la generación de tumores subcutáneos

de tamaño significativo. Una alternativa de trabajo indica la preparación de inóculos de 300.000 células/100  $\mu$ L, inoculadas en el lomo del ratón, durante un período de 21 días.

En cuanto al modelo de inoculación intravenosa, no pudo ser llevada a cabo por problemas al momento de canular la vena lateral de la cola en los ratones. La principal causa de este fallo fue la falta de una formación técnica previa que permitiera reconocer anatómicamente la localización de la vena. Durante la estandarización, se realizó un intento de inoculación con jeringas de tuberculina de calibre 25G con un diámetro exterior de 0,5144 mm y un diámetro interior de 0,26 mm; como resultado no se pudo llegar a la vena en ninguno de los ratones de estudio, por lo que se intentó con jeringas de 27G con un diámetro exterior de 0,4128 mm y un diámetro interior de 0,210 mm. Sin embargo, el cambio a un calibre menor no varió el resultado. Se descartó el uso de jeringas de 30G, debido a que su menor calibre podría afectar el paso de las células, ya sea alterando su morfología o destruyéndolas por la aglomeración generada entre el émbolo y el paso a la aguja.

Esto implica que las técnicas de inoculación suelen ser operador-dependiente, por lo que es menester una capacitación rigurosa en cuanto al trato y cuidado de los animales, profundizando las técnicas invasivas a los animales, como las inyecciones o procedimientos quirúrgicos. Un mal manejo de la técnica tiene consecuencias tanto para el ratón como para el investigador; los ratones deben ser sometidos a una anestesia general durante algunos minutos, lo que podría generar una hipotensión y una hipotermia que pone en riesgo la vida del animal, sumado a que las inyecciones erróneas pueden generar inflamación en la zona. Por otra parte, para el investigador significa un atraso dentro del itinerario del protocolo, pérdida de material, costo horas-hombre, etcétera.

## 9. CONCLUSIÓN

Las células B16F10 son un modelo celular efectivo, fácil de trabajar, con una alta confluencia en un corto período de tiempo; por tanto, su alto rendimiento permite tener un stock óptimo para poder desarrollar los ensayos correspondientes. Al ser singénicas con los ratones C57BL6, tienen una buena asimilación, disminuye el riesgo de rechazo, y permite aplicar modelos de formación de masas tumorales y metástasis, replicables siempre y cuando se establezca un protocolo estandarizado y una correcta capacitación del personal, principalmente para los laboratoristas que trabajan en el cultivo celular, que al ser un procedimiento minucioso y que requiere de altos niveles de bioseguridad.

El modelo experimental subcutáneo tuvo un éxito del 20%, por lo que los resultados esperados solo destacaron en un solo individuo. Uno de los requisitos fundamentales de un ensayo experimental es que los resultados sean replicables; en este caso, es necesario revisar las variables que puedan influir en el desarrollo de un ensayo. A partir de lo visto en este modelo, se recomienda cambiar algunos detalles, como aplicar una inoculación más concentrada de células B16F10, realizar la punción en el lomo del ratón, y aumentar los días del ensayo para permitir el desarrollo de masas tumorales. Los cambios aplicados deben ser estandarizados para comprobar el éxito del ensayo.

El modelo experimental intravenoso requiere de una capacitación especial para todo el personal involucrado en la investigación. Al ser un modelo que por primera vez es implementado en la Universidad de Talca, requiere tomar en cuenta aspectos que pueden afectar el trabajo que se quiere llevar a cabo. Al ser un proceso operador-dependiente, requerirá una inversión de tiempo para un entrenamiento con animales, por lo que será parte de la estandarización dentro del protocolo de trabajo.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Rodier F, Campisi J. Four faces of cellular senescence. *J Cell Biol.* 2011;192(4):547-56.
2. González-Puertos v, Maciel-Barón L, Barajas-Gómez B, López-Diazguerrero N, Körnigsberg M. Participación del fenotipo secretor de las células senescentes en el desarrollo del cáncer, el envejecimiento y las enfermedades asociadas a la edad. *Gac Med México.* 2015;151:491-500.
3. Muller M. Cellular senescence: molecular mechanisms, *in vivo* significance, and redox considerations. *Antioxid Redox Signal.* 2009;11 (1):59-98.
4. Narita M. Cellular senescence and chromatin organisation. *Br J Cancer.* 2007;96(5):686-91.
- 5.- Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995;92(20):9363-7.
6. Salama, R., Sadaie, M., Hoare, M., and Narita, M. (2014). Cellular senescence and its effector programs. *Genes & Development* 28, 99-114
7. Campisi J. Cancer, aging and cellular senescence. *In Vivo* 2000;14:183-8.
8. Kuilman, T., and Peeper, D.S. (2009). Senescence-messaging secretome: SMS-ing cellular stress. *Nature Reviews Cancer* 9, 81-94.
9. Young AR, Narita M. SASP reflects senescence. *EMBO Rep.* 2009; 10(3):228-30
10. Coppe JP, Desprez PY, Krtolica A, Campisi J. The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annu Rev Pathol.* 2010; 5: 99-118.
11. He, S., and Sharpless, N.E. (2017). Senescence in Health and Disease. *Cell* 169, 1000-1011.
12. Goruppi S, Dotto GP. Mesenchymal stroma: primary determinant and therapeutic target for epithelial cancer. *Trends Cell Biol.* 2013;23(12):593-602.
13. Sarkar D, Lebedeva IV, Emdad L, Kang DC, Baldwin AS Jr, Fisher PB. Human polynucleotide phosphorylase (hPNPaseold-35): a potential link between aging and inflammation. *Cancer Res.* 2004;64(20):7473-8.

14. Garfinkel S, Brown S, Wessendorf JH, Maciag T. Post-transcriptional regulation of interleukin 1 alpha in various strains of young and senescent human umbilical vein endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994; 91(4):1559-63.
15. Chang BD, Swift ME, Shen M, Fang J, Broude EV, Roninson IB. Molecular determinants of terminal growth arrest induced in tumor cells by a chemotherapeutic agent. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002; 99(1):389-94
16. Sato I, Morita I, Kaji K, Ikeda M, Nagao M, Murota S. Reduction of nitric oxide producing activity associated with *in vitro* aging in cultured human umbilical vein endothelial cell. *Biochem Biophys Res Commun*. 1993; 195 (2):1070-6
17. Xin MG, Zhang J, Block ER, Patel JM. Senescence-enhanced oxidative stress is associated with deficiency of mitochondrial cytochrome c oxidase in vascular endothelial cells. *Mech Ageing Dev*. 2003; 124 (8-9):911-9
18. Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*. 2000; 408: 239-47.
19. Coppe JP, Patil CK, Rodier F, et al. Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS Biol*. 2008; 6 (12):2853-68.
20. Munoz-Espin, D., and Serrano, M. (2014). Cellular senescence: from physiology to pathology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 15, 482-496.
21. Freund A, Orjalo AV, Desprez PY, Campisi J. Inflammatory networks during cellular senescence: causes and consequences. *Trends Mol Med*. 2010;16(5):238-46
22. Krtolica A, Larocque N, Genbacev O, et al. GROalpha regulates human embryonic stem cell self-renewal or adoption of a neuronal fate. *Differentiation*. 2011; 81 (4):222-32.
23. Davalos AR, Coppe JP, Campisi J, Desprez PY. Senescent cells as a source of inflammatory factors for tumor progression. *Cancer Metastasis Rev*. 2010; 29 (2):273-83.
24. Balch C, Bleyer A, Krakoff I, et al. The vital role of animal research in advancing cancer diagnosis and treatment. *Cancer Bulletin* 1990; 42: 266-269.

25. Atchley W, Fitch W. Genes trees and the origins of inbred strain of mice. *Science* 1991; 254: 554-558
26. Faul F, Erdfelder E, Lang AG, Buchner A. G\*Power 3: a flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behav Res Methods*. 2007; 39(2):175-91.
27. Bate T, Clark R. *The Design and Statistical Analysis of Animal Experiments*. Cambridge and New York: Cambridge University Press; 2014.
28. Navarro-Hernández J, Ramírez ROA, Villagrán C. *Manual de procedimientos recomendables para la investigación con animales*. México D.C.: SAMSARA; 2012.
29. Hernández S. El modelo animal en las investigaciones biomédicas. *Biomedicina*, 2006, 2(3) 252-256. ISSN: 1510-9747.
30. *Institutional Animal Care and Use Committee Guidebook*. 2<sup>nd</sup> ed. Office of Laboratory Animal Welfare. National Institutes of Health Department of Health and Human Services. Bethesda, MD. 2002; p. 210.
31. Russell W, Burch R. *The principles of humane experimental technique*. London: Methuen, 1992 (reprint is available from UFAW).
32. Rehbinder C, Obrink K. Lab Anim Scie: a definition. In: O' Donoghue PN, ed. *Proceedings of the sixth FELASA Symposium, 19-21 June 1996; Basel Switzerland*. London: Royal Society Medicine Press, 1996; p. 144-145.
33. Festing M. Reduction of animal use: experimental design and quality of experiment. *Laboratory Animals* 1994; 28: 212- 221.
34. Hau J, Craver J. Refinement in Laboratory Animal Science. Its is Cinderella subject, and is there conflict and imbalance within the 3 Rs? *Scand J Lab Anim Sci*. 1994; (4): 161-167.
35. Ortiz R, Díaz J, Díaz N, et al. Extracellular matrix-specific Caveolin-1 phosphorylation on tyrosine 14 is linked to augmented melanoma metastasis but not tumorigenesis. *Oncotarget*. 2016;7(26):40571–40593. doi:10.18632/oncotarget.9738

36. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith J, Struhl K (1996)  
Current Protocols in Molecular Biology (Current Prot Mol Biol).



VICERRECTORIA ACADEMICA  
DIRECCION DE INVESTIGACIÓN  
COMITÉ INSTITUCIONAL DE ETICA, CUIDADO Y USO DE ANIMALES DE LABORATORIO

Aprobación CIEQUAL

N° \_\_\_\_\_

Fecha Aprobación \_\_\_\_\_

Desde \_\_\_\_\_ Hasta \_\_\_\_\_

Firma y Timbre CIEQUAL \_\_\_\_\_

**PROTOCOLO DE MANEJO Y CUIDADOS DE ANIMALES DE LABORATORIO**

Este formulario tiene como objetivo organizar la información relacionada a los protocolos experimentales con animales de laboratorio a fin de que sea de fácil entendimiento y consulta por cualquier persona (con formación educacional media) que lo pueda requerir en el marco de la Ley N° 20.285 de Transparencia y Acceso a la Información Pública. Por lo anterior, solicitamos que su completación sea lo más precisa posible y en un lenguaje claro para cualquier tipo de lector.

**A.- ANTECEDENTES ADMINISTRATIVOS**

1. Título del Proyecto: **Efecto del Fenotipo Secretor de Células Senescentes (SASP) en la progresión y metástasis de tumores formados por células de melanoma B16F10.**
2. Académico o Investigador Responsable: Rodrigo Moore Carrasco y Nelson Brown Vega
3. Laboratorio o Unidad Docente al que pertenece el Académico Responsable: Laboratorio de Bioquímica Clínica, FCS; Centro de Investigaciones Médicas, Escuela de Medicina.
4. Unidad Académica: Programa de Investigación Asociativa en Cáncer Gástrico (PIA-CG), Escuela de Medicina y Facultad de Ciencias de la Salud.
5. Teléfono: +56981299203                      Email: rmoore@utalca.cl
6. Financiamiento (tipo de proyecto): PIA-CG.

7. Duración del Proyecto (meses o años): 1 año (12 meses).

**8.- Listado de personas autorizadas para el manejo de los animales** Copie y pegue la tabla cuantas veces sea necesario. Marque con una X o especifique, según corresponda. No olvide que debe comunicar oportunamente al Comité cualquier cambio en el presente listado. Si planea reclutar personal, pero aún no lo tiene identificado, inclúyalo como NN y complete el resto de los campos. Una persona sin experiencia quirúrgica con animales **no** puede realizar los procedimientos quirúrgicos antes de una capacitación formal **COMPROBABLE**.

Nombre y firma	Rodrigo Moore Carrasco		
Categoría (IR, Co-I, Apoyo técnico, tesista)	IR		
Vínculo con el laboratorio o unidad docente	Profesor Asociado		
Función en este proyecto; Especifique qué realizará	Quirúrgico X	No Quirúrgico	
	Estará encargado de la implantación de las células tumorales en los animales. Estas serán implantadas de forma subcutánea y a través de la vena caudal, el primer procedimiento para evaluar crecimiento tumoral e invasión local; el segundo para evaluar metástasis pulmonares. Capacitará al personal sin experiencia, propondrá cambios y preparará el informe y seguimiento para el CIECUAL.		
Experiencia en animales	NO	SI X	Años: >15
Debe adjuntar documentación (declaración de experiencia comprobable)	SI (identifique)		Experiencia: no mantengo en mi poder el certificado de la Universidad de Barcelona donde hice el curso de manejo y cuidado de animales.
	NO X		
Recibirá capacitación (mencione al encargado de capacitación o justifique si no la recibirá)	SI	NO X	Cuánto tiempo?
	El investigador responsable tiene amplia experiencia en modelos murinos de tumorigenesis.		

Nombre y firma	Nelson Brown Vega		
Categoría (IR, Co-I, Apoyo técnico, tesista)	Co-I		
Vínculo con el laboratorio o unidad Docente	Profesor Asociado		
Función en este proyecto Especifique qué realizará	Quirúrgico X	No Quirúrgico	
	Estará encargado de la implantación de las células tumorales en los animales. Estas serán implantadas de forma subcutánea y a través de la vena caudal. La primera modalidad será utilizada para evaluar crecimiento tumoral		

	e invasión; la segunda, para evaluar metástasis. Capacitará al personal sin experiencia, propondrá cambios y preparará el informe y seguimiento para el CIEQUAL.		
Experiencia en animales	NO	SI	X Años: >15 años
Debe adjuntar documentación (declaración de experiencia comprobable)	SI (identifique)		Trabajó en modelos de cáncer tanto autóctonos (ratones transgénicos, knockouts, Knockins) como xenotransplantes (ortólogos, subcutáneos) durante todo su entrenamiento post-doctoral.
	NO X		
Recibirá capacitación (mencione al encargado de capacitación o justifique si no la recibirá)	SI	NO	X Cuánto tiempo
	El co-investigador cuenta con amplia experiencia en el trabajo con modelos murinos de cáncer.		

Nombre y firma	Leandro Zúñiga		
Categoría (IR, Co-I, Apoyo técnico, tesista)	Co-I		
Vínculo con el laboratorio o unidad Docente	Profesor Asociado		
Función en este proyecto Especifique qué realizará	Quirúrgico X		No Quirúrgico
	Estará encargado de la implantación de las células tumorales en los animales. Estas serán implantadas de forma subcutánea y a través de la vena caudal. La primera modalidad será utilizada para evaluar crecimiento tumoral e invasión; la segunda, para evaluar metástasis. Capacitará al personal sin experiencia, propondrá cambios y preparará el informe y seguimiento para el CIEQUAL.		
Experiencia en animales	NO	SI	X Años: >15 años
Debe adjuntar documentación (declaración de experiencia comprobable)	SI (identifique)		
	NO X		
Recibirá capacitación (mencione al encargado de capacitación o justifique si no la recibirá)	SI	NO	X Cuánto tiempo
	El co-investigador cuenta con amplia experiencia en el trabajo con modelos animales.		

Nombre y firma	Claudio Valenzuela		
Categoría (IR, Co-I, Apoyo técnico, tesista)	Co-I		
Vínculo con el laboratorio o unidad Docente	Profesor conferenciante		

Función en este proyecto Especifique qué realizará	Quirúrgico X		No Quirúrgico
	Participará en la implantación de las células tumorales en animales. Estas serán implantadas de forma subcutánea y a través de la vena caudal. La primera modalidad será utilizada para evaluar crecimiento tumoral e invasión; la segunda, para evaluar metástasis.		
Experiencia en animales	NO X	SI	Años:
Debe adjuntar documentación (declaración de experiencia comprobable)	SI (identifique)		
	NO X		
Recibirá capacitación (mencione al encargado de capacitación o justifique si no la recibirá)	SI X	NO	Cuánto tiempo
	El Dr. Valenzuela recibirá la capacitación necesaria de parte del equipo de investigadores.		

Nombre y firma	Daniel Mancilla		
Categoría (IR, Co-I, Apoyo técnico, tesista)	Co-I		
Vínculo con el laboratorio o unidad Docente	Lab manager		
Función en este proyecto Especifique qué realizará	Quirúrgico X		No Quirúrgico X
	Participara en la implantación de las células tumorales en animales y en la supervisión diaria		
Experiencia en animales	NO X	SI	Años:
Debe adjuntar documentación (declaración de experiencia comprobable)	SI (identifique)		
	NO X		
Recibirá capacitación (mencione al encargado de capacitación o justifique si no la recibirá)	SI X	NO	Cuánto tiempo
	El Sr. Mancilla es Ingeniero en Biotecnología de la UCM, recibirá la capacitación necesaria de parte del equipo de investigadores.		

Nombre y firma	Angel Cayo		
Categoría (IR, Co-I, Apoyo técnico, tesista)	Tesista post-grado		
Vínculo con el laboratorio o unidad Docente	Tesista Doctorado en Ciencias Biomédicas		
Función en este proyecto Especifique qué realizará	Quirúrgico X		No Quirúrgico
	Participara en la implantación de las células tumorales en animales.		

Experiencia en animales	NO	SI X	Años: >15 años
Debe adjuntar documentación (declaración de experiencia comprobable)	SI (identifique)		
	NO X		
Recibirá capacitación (mencione al encargado de capacitación o justifique si no la recibirá)	SI	NO	Cuánto tiempo
	El candidato a Doctor Sr. Ángel Cayo, recibirá la capacitación necesaria de parte del equipo de investigadores.		

Nombre y firma	Withney Venturini		
Categoría (IR, Co-I, Apoyo técnico, tesista)	Tesista post-grado		
Vínculo con el laboratorio o unidad Docente	Tesista Doctorado en Ciencias Biomédicas		
Función en este proyecto Especifique qué realizará	Quirúrgico X	No Quirúrgico	
	Participara en la implantación de las células tumorales en animales.		
Experiencia en animales	NO	SI X	Años: >15 años
Debe adjuntar documentación (declaración de experiencia comprobable)	SI (identifique)		
	NO X		
Recibirá capacitación (mencione al encargado de capacitación o justifique si no la recibirá)	SI	NO	Cuánto tiempo
	La Srta. Whitney Venturini, recibirá la capacitación necesaria de parte del equipo de investigadores.		

Nombre y firma	Luis Huentemil		
Categoría (IR, Co-I, Apoyo técnico, tesista)	Tesista Pre-grado		
Vínculo con el laboratorio o unidad Docente	Tesista Tecnología Médica		
Función en este proyecto Especifique qué realizará	Quirúrgico	No Quirúrgico X	
	Participara en la implantación de las células tumorales en los animales.		
Experiencia en animales	NO X	SI	Años:
Debe adjuntar documentación (declaración de experiencia comprobable)	SI (identifique)		Experiencia:
	NO		

Recibirá capacitación (mencione al encargado de capacitación o justifique si no la recibirá)	SI X	NO	Cuánto tiempo: 10 días
	El (los) tesista (s) será capacitado en las funciones que deben cumplir para el proyecto por un periodo de 10 días, previo a la llegada de los animales del estudio. La capacitación del tesista será responsabilidad del IR y co-investigador (Rodrigo Moore y Nelson Brown).		

**NOTA:** La información requerida se basa en el documento "Sugerencias para la fundamentación de la certificación bioética animal de Fondecyt" del Comité Asesor de Bioética de Fondecyt/Conicyt ([www.fondecyt.cl](http://www.fondecyt.cl)).

8. Teléfono en caso de una emergencia con los animales en horario no laboral  
Avisar a: **Rodrigo Moore Carrasco, 9-81299203**

#### **B.- ANTECEDENTES DE LOS ANIMALES DE LABORATORIO**

1. Especie (s) utilizada(s): *Mus musculus* Cepa (si corresponde): C57Bl6
2. Edad/Estado de desarrollo: adultos (> 8 semanas de vida).
3. Peso: 30-50 gramos.
4. Sexo: Machos.
5. Lugar de obtención de los animales: **Bioterio de la Universidad de Talca.**
6. Lugar de mantención: **Bioterio de la Universidad de Talca.**
7. Lugar de procedimientos (identificar que procedimientos se realizarán en cada lugar):  
No quirúrgicos: **Bioterio de la Universidad de Talca.**  
Quirúrgicos: **Bioterio de la Universidad de Talca.**
8. Ubicación física del lugar de procedimientos: **Campus Lircay, Universidad de Talca.**
9. Número total de animales a utilizar: 54

10. Método(s) de Identificación del animal: Se utilizara marca con lápiz permanente en la base de la cola. Adicionalmente se realizara una marca en la base de la cola con una máquina de tatuar. Los animales estarán separados en jaulas individuales con un número máximo por caja de 5 individuos.

Si el lugar de obtención de los animales es distinto del lugar de mantención, indique detalladamente las condiciones de transporte de los animales. Remita certificación del SAG o institución autorizada, si procede:

### **C.- PROPÓSITOS DE LA INVESTIGACIÓN**

1. Incluya un breve resumen (abstract) en el cual se entreguen los antecedentes (bibliográficos, epidemiológicos, etc.) que dan relevancia y justifiquen la realización de esta investigación (relación costo-beneficio que justifique el sacrificar animales).

El cáncer es una de las principales causas de muerte en la sociedad actual. Este grupo de patologías se desarrolla en forma crónica, donde factores genéticos y ambientales se entrelazan en el desarrollo fisiopatológico del cáncer. Un factor de riesgo importante en el desarrollo del cáncer es el envejecimiento. De este modo, individuos mayores de 65 años presentan una prevalencia mayor de este tipo de patologías. Los mecanismos que podrían explicar este aumento en la prevalencia son diversos, pero sin lugar a dudas la acumulación de células senescentes en el organismo, podría explicar en parte este desarrollo. Nuestro grupo de investigación está interesado en evaluar cómo el proceso de senescencia celular a través del fenotipo secretor asociado a senescencia (SASP), impacta en el desarrollo tumoral y cómo este puede explicar la relación que existe entre cáncer y plaquetas. Resultados de nuestro grupo demuestran que el SASP favorece la proliferación de células tumorales *in vitro*. Por otra parte hemos demostrado que el SASP tiene la capacidad de inducir la agregación de las plaquetas. Estos y otros resultados nos permiten proponer un efecto sinérgico entre SASP y plaquetas, durante el desarrollo tumoral. En este momento se hace necesario escalar a un modelo *in vivo* que nos permita responder a la pregunta lógica de si estos mecanismos y procesos descritos hasta ahora *in vitro* ocurren también *in vivo*.

En este sentido, el estudio de patologías de alto impacto como es el cáncer, requiere de modelos que representen de forma exacta la fisiopatología de la enfermedad en estudio. Estos modelos permiten el estudio de enfermedades de forma controlada y cuantitativa, teniendo una visión más amplia de la patología en un organismo vivo. El modelo de melanoma B16F10 es un modelo ampliamente usado en la investigación del cáncer. Estas células pueden ser cultivadas y propagadas *in vitro*, lo que permite

realizar modificaciones genéticas a las células antes de su implantación, así como otras modificaciones y aproximaciones, para después ser evaluadas *in vivo*. Las células B16F10 presentar homing por el pulmón lo que nos permitirá evaluar la capacidad metastásica de las células ante diferentes condiciones de ensayo.

Actualmente la Universidad de Talca, se encuentra en el selecto grupo de universidades complejas. En este sentido crea el Programa de Investigación asociativa en Cáncer Gástrico, este programa realiza investigación de vanguardia en los mecanismos moleculares del cáncer, con un abordaje *in vitro*. Estos modelos celulares en cultivo no son suficientes para responder algunas de las preguntas planteadas por los investigadores. Es por esta razón que se hace impostergable contar con este tipo modelos, para así competir en igualdad de condiciones con otras universidades nacionales e internacionales. Cabe destacar que este modelo será utilizado en el desarrollo de tesis de pre y postgrado, impactando de forma directa en la formación de capital humano avanzado.

En pro del bienestar animal se requiere que usted provea las metodologías y fuentes mediante las que se determinó que no existen métodos alternativos para aquellos procedimientos potencialmente dolorosos o que causen aflicción en los animales		
Congresos, cursos o simposios	Título de la conferencia o Reunión en relación	Fecha de asistencia

Revistas que lee periódicamente en busca de reemplazos o refinamiento	Artículos de interés

Consulta con colegas o expertos (nombre)	Grado y campo de desarrollo	Tópico de la consulta	Fecha de consulta

Búsqueda en la Literatura (Base de datos utilizada)	Nombre del procedimiento, palabras claves y resultados (numero de papers)	Años analizados	Fecha de consulta

2. Señale el o los objetivo(s) principal(es) del proyecto.

#### Objetivo General

Determinar el efecto *in vivo* del Fenotipo Secretor Asociado a Senescencia (SASP) sobre el desarrollo tumoral, utilizando células de melanoma de origen murino previamente expuestas a factores secretados por células senescentes.

#### Objetivos específicos

- Implementar el modelo de melanoma B16F10 *in vivo*.
- Establecer el efecto del SASP sobre el crecimiento de tumores formados por células de melanoma B16F10.
- Examinar el efecto del SASP sobre la capacidad metastásica de las células de melanoma B16F10.

3. Justifique el uso de ANIMALES, en vez de usar modelos alternativos (reemplazo).

Aunque muchos procesos se pueden estudiar *in vitro* utilizando líneas celulares bien establecidas, los modelos de ratón ofrecen una herramienta irremplazable que recapitula de manera más cercana la patología de los cánceres humanos. Esto se debe a que toman en consideración los efectos celulares no autónomos que están involucrados en el inicio y la progresión del cáncer. Hoy sabemos que el microambiente tumoral es importante para el crecimiento y progresión tumoral, de tal modo que el comportamiento de las células del parénquima tumoral (células cancerosas) es dependiente de otros componentes del estroma (fibroblastos, células inflamatorias, células del sistema inmune, células endoteliales). Esto también se aplica a situaciones en las que queremos estudiar el efecto paracrino de un componente celular (por ejemplo, células senescentes) sobre otro componente celular (por ejemplo, células tumorales). En todos estos casos es recomendable utilizar modelos de xenotransplante, puesto que recapitula de una manera más rigurosa lo que ocurre en el microambiente tumoral. Además, los modelos animales nos permiten evaluar de manera más realista el efecto de nuevas drogas quimioterapéuticas sobre tumores presentes en animales.

El trabajo experimental *in vitro* permite un mejor nivel de simplificación bajo estudio, donde el investigador puede centrarse en determinados mecanismos o compuestos, sin embargo, su principal desventaja es que a veces puede ser difícil extrapolar los resultados de los ensayos *in vitro*, con la biología del organismo intacto y dentro de una maquinaria multisistémica y que confluye con diversos factores que no pueden ser replicados en ensayos por separado. Esto puede llevar a una malinterpretación de resultados, y a conclusiones erróneas acerca de organismos y la biología de los sistemas.

El trabajo *in vivo* otorga más información sobre los sucesos que ocurren dentro de la célula, tales como propiedades fisicoquímicas que no pueden ser replicados en medios acuosos de mantención. Permite tener a disposición una gran variedad de parámetros que pueden influir de forma significativa en los resultados finales. Esto último es significativo en las investigaciones donde se evalúan los procesos de formación tumoral y capacidad de metástasis, procesos donde participan proteínas, citoquinas, sistema inmune, factores epigenéticos, etcétera.

Los modelos murinos son los más utilizados en los experimentos *in vivo* en investigaciones del área oncológica. Esto se debe a que estos modelos permiten la interpretación de los resultados y la extrapolación de estos de una especie a otra dependiendo del modelo experimental utilizado; a esto se le conoce como la noción de competencia o actuación (de que fenómeno se trata y como se quiere explicar). El modelo experimental puede reproducir un efecto proveniente del sujeto original, poseer una estructura determinada. No existe un modelo perfectamente extrapolable al hombre, pero puede haber una infinidad de modelos experimentales y que ofrecen una serie de ventajas. Al

tratarse de un modelo murino, posee procesos bioquímicos y fisiológicos muy similares, tiene un tiempo generacional muy corto, un alto índice reproductivo, una talla pequeña y son relativamente dóciles.

Se pueden controlar las variables ambientales a nivel macro y microambiente, importantes para el correcto proceso experimental; su mantenimiento en cautiverio es fácil y económico.

Existen una gran cantidad de líneas genéticas tanto consanguíneas como congénitas, cientos de mutaciones, desde donde se pueden producir líneas de individuos genéticamente idénticos.

Marcelo Fernández Lomónaco. Utilización de Modelos animales en investigación del Cáncer. Laboratorio de Experimentación Animal del Centro de Investigaciones Nucleares Facultad de Ciencias. Universidad de la República. URBE Unidad de Reactivos y Biomodelos de Experimentación Facultad de Medicina. Universidad de la República.

<https://www.dnsffaa.gub.uy/media/dnsffaa/design/style000001/0000000001000002484.p df>

4. Identifique en que plataformas realizo la búsqueda de métodos alternativos (pubmed, go3rs, google scholar, etc), cuáles fueron sus resultados (n° de papers) y cuando la realizo (fecha). Nota: Recuerde que este punto tiene como fin verificar que no existen métodos alternativos viables que pudiesen reemplazar adecuadamente el uso de animales a fin de obtener los mismos resultados.

Tras una búsqueda de alternativas *in vitro* que permitan reemplazar el uso de animales, los resultados son concluyentes: no existe un método *in vitro* que permita evaluar el crecimiento tumoral y metástasis en un contexto sistémico. Búsqueda hecha en PubMed y Google.

- Palabras clave: Estudio de cáncer *in vitro*, estudio de metástasis *in vitro*, modelos alternativos *in vitro* de estudio del cáncer, modelos para el estudio del microambiente tumoral.
- Fecha de búsqueda: 5 de febrero 2019.

5. Explique las características que justifiquen el uso de esta(s) ESPECIE(s).

Las células B16F10 corresponden a células de melanoma que originalmente fueron aisladas de ratones de la cepa C57Bl6. Estas células tumorales "singénicas" puede ser utilizadas *in vitro* e *in vivo*, pudiendo ser implantadas de manera subcutánea para evaluar crecimiento e invasión tumoral. Asimismo, estas células pueden ser inyectadas a través de la vena caudal del ratón con el objetivo de evaluar la capacidad de formar metástasis. Cabe destacar que este tipo de células (B16F10) presenta predilección por el pulmón (lung homing, regreso al pulmón).

Es un modelo descrito de forma amplia para el estudio de la biología y el tratamiento tumoral, ya que son células que tienen la capacidad de crecer *in vivo* en ratones de la cepa C57BL/6 (modelo singénico, en ratón no modificado genéticamente, wild tipe). Este modelo, además permite abordar tanto el crecimiento del tumor primario como de metástasis, gracias a sus células pigmentadas con melanina, un pigmento oscuro producido en exceso en células de melanoma, y que facilitan en gran parte su observación macroscópica. Las líneas celulares B16 son estables en sus propiedades metastásicas, incluso después de varios subcultivos *in vitro*.

En publicaciones anteriores se ha descrito una relación proporcional entre el número de células tumorales inyectadas por vía intravenosa, y el número de nódulos tumorales ubicados a nivel del pulmón, a esto se suma que con el aumento de la capacidad metastásica, los nódulos pulmonares son mucho más grandes y consistentes en células de melanoma de crecimiento denso, en comparación a otras líneas celulares. De por sí, el proceso de metástasis implica la invasión de tejidos, vasos sanguíneos y linfáticos, además invadir el parénquima y establecer un microambiente y crecer en tumores secundarios.

Este modelo celular es más cercano a la situación real, al ser implantado en ratones con un sistema inmune funcional (modelo singenico). En los modelos alogenicos se utilizan ratones cuya principal característica es que son inmunocomprometidos, es decir no presentan un sistema inmune funcional. Con su sistema inmunitario deficiente, el ratón desnudo es capaz de recibir numerosos injertos y/o células tumorales de muchas especies diferentes sin sufrir una reacción de rechazo. Sin embargo, esta deficiencia inducida tiene como principal desventaja no contar con esta variable en sí. Para la realización de un protocolo donde se evalúa el crecimiento tumoral y la capacidad de metástasis en un modelo animal, es necesario replicar en lo posible las condiciones normales celulares y del microambiente que se pueden presentar en un organismo inmunocompetente, esa es la gran ventaja de este modelo.

Biological Behavior of Malignant Melanoma Cells Correlated to Their Survival *in Vivo*. Isaiah J. Fidler. Cancer Res January 1 1975 (35) (1) 218-224;

Caveolin-1 in Melanoma Progression Lorena Lobos-González, Lorena Aguilar, Gonzalo Fernández, Carlos Sanhueza and Andrew F.G Quest Centro de Estudios Moleculares de la Célula (CEMC), Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Chile. 11 January 2016.

5. Justifique el NÚMERO de animales a utilizar y refiérase al cálculo de tamaño muestral (que programa computacional o formula utilizo).

Se estima la utilización de 11 animales por vía de administración y grupo de estudio. En proyectos como éste, las incidencias pueden constituir el mayor problema al momento de calcular el tamaño ideal de muestra, y una correcta aplicación del concepto "Reducción". La realización de experimentos con

modelos animales, dicta que es mejor tener un exceso de individuos que quedarse corto, ya que esto último, aparte de invalidar los resultados obtenidos estadísticamente, necesariamente requerirá la repetición de la totalidad del experimento, aumentando el número de animales utilizados simplemente por un trabajo mal hecho a partir de su diseño, aumentando los costos e insumos brindados por la institución.

Para el cálculo del tamaño de la muestra se utilizó el programa GRANMO, programa de acceso libre en el sitio web del Institut Municipal d'Investigació Mèdica, Barcelona, Spain.

Para el cálculo se utilizó un análisis de varianza, con riesgo alfa de 0.05, un contraste bilateral, riesgo beta de 0.2, número de grupos 4, desviación estándar de 655 mm, una diferencia entre grupos de 1100 mm y una pérdida del 20%.

**Calculadora de Tamaño muestral GRANMO**  
Versión 7.12 Abril 2012

Català Castellano English

**Medias : Análisis de la varianza**

Riesgo Alfa:  0.05  0.10  Otro

Tipo de contraste:  unilateral  bilateral

Riesgo Beta:  0.20  0.10  0.05  0.15  Otro

Número de grupos:

Desviación estándar común:

Diferencia mínima a detectar entre dos grupos:

Proporción prevista de pérdidas de seguimiento:

**Proporciones**

**Medias**

- Dos medias independientes
- Medias apareadas (repetidas en un grupo)
- Observada respecto a una de Referencia
- Medias apareadas (repetidas en dos grupos)
- Estimación Poblacional

**Análisis de la varianza**

- Potencia de un contraste

**Otras**

**calcula** Limpia resultados Limpia todo Selecciona todo Imprimir

15/04/2019 15:04:32 Análisis de la varianza (Medias)

Aceptando un riesgo alfa de 0.05 y un riesgo beta de 0.2 en un contraste bilateral, se precisan 11 sujetos en cada grupo para detectar una diferencia mínima de 1100 entre dos grupos, asumiendo que existen 4 grupos y una desviación estándar de 655. Se ha estimado una tasa de pérdidas de seguimiento del 20%.

Se consideró un número mínimo estadísticamente significativo para las comparaciones de 11 animales por grupo, esto en consideración del tipo de modelo tumoral usado. Referencia para el cálculo: Extracellular matrix-specific Caveolin-1 phosphorylation on tyrosine 14 is linked to augmented melanoma metastasis but not tumorigenesis. Ortiz R, Díaz J, Díaz N, Lobos-Gonzalez L,

Cárdenas A, Contreras P, Díaz MI, Otte E, Cooper-White J, Torres V, Leyton L, Quest AF. *Oncotarget*. 2016 Jun 28;7(26):40571-40593. doi: 10.18632/oncotarget.9738. PMID: 27259249

Grupo de individuos para práctica:

Este ensayo requiere de una capacitación previa del equipo a cargo del ensayo, tanto de los tesistas como el personal del bioterio. Se debe tomar en cuenta la serie de procedimientos invasivos que serán aplicados a los individuos del estudio, como lo es la inyección de células tumorales a nivel subcutáneo, la medición del volumen de la masa tumoral y la posterior extracción de la masa tumoral.

Para efectos de este estudio, se determinó un n= 22 animales para desarrollar la capacitación en ambos tipos de implantación. 11 ratones para la inyección subcutánea y 11 para la inyección intravenosa. Estos animales cumplirán un doble objetivo, en primer lugar servirán para capacitar al personal en el procedimiento de inyección, como para evaluar el tiempo de crecimiento tumoral y ensayar la forma de medición de los tumores subcutáneos y pulmonares.

Grupo experimental	Sub-cutáneo	Intra-venoso	total
Medio condicionado Senescente	11	11	22
Medio condicionado control	11	11	22
Capacitación	11	11	22
Total animales protocolo	33	33	66

#### D.- DESCRIPCIÓN GENERAL DEL EXPERIMENTO

1. Describa la secuencia de TODOS los procedimientos y diseño experimental a seguir con los animales (adjunte una línea temporal y/o tabla con los grupos y condiciones experimentales, detallando el número de animales por grupo). El detalle de procedimientos no quirúrgicos (manipulación y administración de sustancias) debe incluirse en la **Sección E**. El detalle de los procedimientos quirúrgicos debe incluirse en la **Sección F**.

**Protocolo resumido:** 54 ratones de más de 30 días de vida serán divididos en dos grupos para la realización tanto de ensayos de formación y crecimiento tumoral (n=27), como de ensayos de formación de metástasis (n=27). Cabe destacar que de los 54 animales, 18 serán utilizados para la estandarización del modelo y la capacitación del personal. A su vez, cada experimento contemplará dos grupos experimentales. El grupo control recibirá las células B16F10 suspendidas en 100 µl de medio condicionado por células en activa proliferación

y el grupo SASP recibirá las células B16F10 previamente suspendidas en 100  $\mu$ l de medio condicionado por células senescentes. Los animales serán sedados con Xilacina 10mg/kg o acetopromacina 1mg/kg de forma intramuscular (Anesthesia and analgesia in laboratory animals, 2nd Ed. 2008. Academic Press). Una vez sedados, un grupo de animales será inoculado subcutáneamente en el flanco derecho (figura 1) con  $3 \times 10^5$  células tumorales B16F10, con o sin previa exposición al medio condicionado por células senescentes (ensayo de formación y crecimiento tumoral), mientras que el segundo grupo será inoculado a través de la vena caudal con  $2 \times 10^5$  células B16F10 (ensayo de formación de metástasis). La jeringa que se utilizará para la inoculación es de 25G de espesor y 16 mm de largo.

Terminada la inyección subcutánea o la inoculación intravenosa, procedimientos que tardan aproximadamente de 1 a 2 minutos, los animales serán devueltos a sus jaulas con acceso libre al agua y comida. Se evaluará su estado general a la hora de realizado el procedimiento y posteriormente cada 24 horas por los siguientes 21 días que dura el experimento. Finalizado este tiempo, los animales serán anestesiados con una mezcla de ketamina (ketostop, DrangPharmainvetec S.A) y xilazina (Xylaret, Agroland) en una relación 3:1 (2.2  $\mu$ L/g de peso). Se evaluará la presencia de reflejos. Cuando estos no sean perceptibles, se procederá a la dislocación cervical, para posteriormente remover la masa tumoral y los pulmones, según sea necesario.

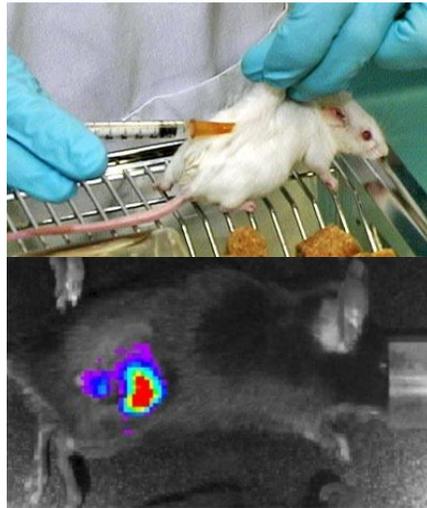


Figura 1. Imagen representativa del procedimiento utilizado para la inoculación del tumor subcutáneo.

La aparición de tumores subcutáneos se monitorizará mediante palpación. Los diámetros perpendiculares más grandes de los tumores resultantes serán medidos periódicamente (1 vez al día, durante todo el periodo experimental) con un caliper o pie de metro (figura 2). El volumen de los tumores se calculará con la siguiente fórmula: ancho x largo x  $\pi$  / 6 (Current Protocols in Immunology, 2000). Los animales serán sacrificados a los 21 días o cuando los tumores alcancen el límite bioético permitido de 2500 mm<sup>3</sup>.



Figura 2. Caliper, instrumento para medir el tamaño tumoral.

## 2. SUPERVISIÓN DE LOS ANIMALES

2.1. Describa el o los criterios de interrupción del trabajo con el animal durante el experimento. Nota: Incluya en su descripción el procedimiento esperado de finalización y las circunstancias en que el experimento será interrumpido para evitar sufrimientos innecesarios al animal. Si su protocolo incluye experimentos crónicos con inducción de patologías, indique explícitamente en qué momento se sacrificarán los animales y que grado de compromiso de bienestar general se espera en esas condiciones). Como comité sugerimos utilizar el protocolo de supervisión basado en el protocolo de Morton y Griffiths (Vet. Rec. 116:431-436, 1985).

**PROTOCOLO DE SUPERVISIÓN: PAUTA DE CRITERIO DE  
INTERRUPCIÓN DE PROTOCOLO.**

**Aspecto general (incluye la piel, los orificios, y la postura)** – consultar el Apéndice I al final de esta política para conocer los gráficos que se utilizarán para el PCC, y el Apéndice II para ver ejemplos de cómo debería funcionar el sistema de puntuación.

	<b>Puntaje</b>
Normal (PCC = 3)	0
No bien cuidado, menos activo, postura y marcha normal	2
Piel o pelo en mal estado (desaliñado), menos activo, signos disminuidos de aseo. (PCC = 2)	3
Piel o pelaje en mal estado, deshidratación (elasticidad de la piel disminuida), demacrado, inactivo. (PCC = 1)	6
Moribundo o severamente caquéxico.	18

**Tamaño del tumor/Grado de Necrosis**

	<b>Puntaje</b>
Tumor muy pequeño ( $\leq 7$ mm de longitud en ratones, $\leq 10$ mm de longitud en ratas en su diámetro más largo).	0
Tumor pequeño con alguna necrosis / ulceración ( $\leq 7$ mm de longitud, $\leq 10$ mm de longitud en ratas en su diámetro más largo).	4
Tumor necrótico (7-17 mm, ratones; 10-26 mm, ratas (diámetro largo)	9
Tumor grande ( $\geq 18$ mm en ratones, $\geq 27$ mm en ratas en su parte más larga diámetro), o distensión abdominal severa ( $\geq 10\%$ de aumento sobre el peso corporal original).	12

Nota: para más de un tumor, las longitudes de tumor agregadas de todos los tumores se utilizarán para clasificar el tumor. Por ejemplo, si un animal tiene tres

tumores, cada uno de los cuales mide 3, 5 y 6 mm en el diámetro más largo, la longitud total de los tumores para fines de puntuación sería de 14 mm.

**Cambio de peso corporal.**

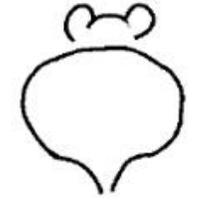
	<b>Puntaje</b>
No hay pérdida o ganancia de peso previa inoculación	0
Pérdida de peso 5-10% o aumento de peso por carga tumoral 0-5%	9
Pérdida de peso 10-15% o aumento de peso por carga tumoral 6-9%	12
<p>Continúa disminuyendo la pérdida de peso <math>\geq 20\%</math> en comparación con la medición inicial de hasta 2 días (animales sometidos a un tumor, y que NO se sometieron a tratamiento quimioterapéutico) o 4 días (animales sometidos a tratamiento y que recibieron tratamiento quimioterapéutico). Pérdida de peso <math>&gt; 30\%</math> resultará en eutanasia inmediata.</p> <p>Aclaración sobre las pérdidas de peso:</p> <p>Se utiliza una pérdida de peso del 20% de hasta 2 días para obtener una puntuación de 18 para determinar los puntos finales.</p> <p>Pérdida de peso del 30%: si un animal ha perdido <math>&gt; 30\%</math> de su valor inicial, será sacrificado de forma inmediata.</p>	18

**Suma de puntuaciones y curso de acción.**

<b>Puntaje</b>	<b>Curso de acción</b>
0-7	Monitoreo diario de rutina
8-13	<p>Control diario cercano, que puede incluir monitoreo dos veces al día y pesaje diario. Puede suplementar en el fondo de la jaula. Ejemplos de suplementación adecuada:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Fuente de agua sola, néctar de napa, SC o IP</li> <li>2. Alimentación sólida como pellets de tocino (<a href="http://www.bio-serv.com/product/Bacon_Softies.html">http://www.bio-serv.com/product/Bacon_Softies.html</a>)</li> <li>3. Alimentación sólida/hidratada como un gel calórico (<a href="http://www.clearh2o.com">www.clearh2o.com</a>)</li> </ol>
14-18	Consultar al personal veterinario sobre considerar una posible eutanasia
>18	Eutanasia inmediata
Ulceración	Aislamiento en otra jaula para evitar posibles compañeros de jaula agresivos.
Pérdida de peso $>30\%$	Eutanasia inmediata

Propuestas de estudios en animales que utilizan la muerte o estado moribundo como criterio de valoración: consultar IACP 003.

### Apéndice I. Guía de puntuación de la condición corporal (PCC)

	<p><b>BC1</b></p> <p>El ratón está demacrado:</p> <p>Estructura esquelética extremadamente prominente; poca o ninguna cubierta de carne. Vértebras claramente segmentadas</p>
	<p><b>BC2</b></p> <p>El ratón está sub-condicionado:</p> <p>Segmentación de la columna vertebral evidente. Los huesos pélvicos dorsales son fácilmente palpables.</p>
	<p><b>BC3</b></p> <p>El ratón está bien acondicionado:</p> <p>Segmentación de la columna vertebral evidente. Los huesos pélvicos dorsales son fácilmente palpables</p>
	<p><b>BC4</b></p> <p>El ratón está sobre condicionado:</p> <p>La columna vertebral es una columna continua. Vértebras palpables solo con presión firme.</p>

## Apéndice II: Ejemplo de escenarios de puntuación

Ejemplo N°1: Un ratón desnudo se presenta con las siguientes condiciones:

- Normal (Puntaje de condición corporal (PCC) =3)
- Un tumor de 6 mm en su diámetro más largo con alguna ulceración.
- Pérdida de peso por carga tumoral del 8%

La siguiente tabla se utiliza para resumir y calificar el escenario anterior:

<b>Características del individuo</b>	<b>Puntaje</b>
Normal (PCC = 3)	0
Un tumor de 6 mm en su diámetro más largo con alguna ulceración.	4
Pérdida de peso por carga tumoral 8%	9
<b>Puntaje total</b>	<b>13</b>

*Acción requerida:* Consultar al personal veterinario o considerar eutanasia

Ejemplo N° 2: un ratón se presenta con las siguientes condiciones:

1. Piel o pelaje en mal estado, deshidratación (disminución de la elasticidad de la piel), demacrado, inactivo (PCC = 1).
2. Un tumor necrótico de 10 mm en su diámetro más largo.
3. Pérdida de peso 10-15% o aumento de peso por la carga tumoral 6-9%.

<b>Características del individuo</b>	<b>Puntaje</b>
Piel o pelaje en mal estado, deshidratación (disminución de la elasticidad de la piel), demacrado, inactivo (PCC = 1).	6
Un tumor necrótico de 10 mm en su diámetro más largo	9
Pérdida de peso del 12%	12
<b>Puntaje Total</b>	<b>27</b>

*Acción requerida:* eutanasia inmediata ya que este animal ha superado la puntuación máxima de 18.

NOTA: Las observaciones anteriores junto con un curso de acción más agresivo podrían haber minimizado el dolor y la angustia de este animal.

2. Agregue otros criterios de supervisión de animales dependiendo de las características de los procedimientos que usted esté realizando.

El estado general de los animales será evaluado diariamente por el personal capacitado. En caso de encontrar evidencias de sufrimiento, los animales serán sometidos a eutanasia humanitaria. La evaluación del estado general será realizada con la pauta de cotejo disponible en el bioterio de la Universidad de Talca. Con mi firma al final del Protocolo me comprometo a observar esta pauta. Los animales que presenten pérdida extrema de peso corporal, respiración rápida, encorvamiento, pilo-erección, apatía u otros signos serán sacrificados inmediatamente y serán sometidos a necropsia para determinar las causas probables de estas anomalías. Los procedimientos se realizarán con todas las medidas destinadas a reducir el sufrimiento de los animales durante y después del procedimiento, incluida la anestesia profunda (isoflurano) y la analgesia adecuada.

**E.- PROCEDIMIENTOS NO QUIRÚRGICOS (Manipulación del animal y administración de sustancias).** Nota: haga referencia en forma detallada a todos los procedimientos a realizar con los animales a fin de minimizar su sufrimiento acorde a las normas de bienestar animal (ej. grupos y diseño experimental, vía de administración de compuestos, vehículo en que serán disueltos los compuestos, etc).

1. Identifique y describa el o los procedimiento(s) no quirúrgico(s) a realizar.
  - Control de peso diario
  - Palpación y medición del tumor
  - Inyección subcutánea, este procedimiento será realizado por el investigador a cargo o bajo su supervisión. Para este proceso se utilizarán jeringas estériles de 25G y 16 mm de largo, la zona de punción será prolijamente aseada con una solución de clorhexidina al 2%. Terminado el proceso la zona de punción será presionada para inducir el cierre de la herida y observada para evidenciar la pérdida de líquido. Posteriormente se procederá como indica el punto D1.
  - Inyección intravenosa, este procedimiento será realizado por el investigador a cargo o bajo su supervisión. Para este proceso se utilizarán jeringas estériles de 25G y 16 mm de largo, la zona de punción será prolijamente aseada con una solución de clorhexidina al 2%. Se determinará la posición de la vena caudal, una vez puncionada se verificará estar dentro de vena y se procederá a inocular las células tumorales. Terminado el proceso la zona de punción será presionada para inducir el cierre de la herida y observada para evidenciar la pérdida de líquido. Posteriormente se procederá como indica el punto D1.
  
2. Indique nombre y experiencia de la(s) persona(s) que efectuará(n) los procedimientos no quirúrgicos.
  - Todos los integrantes del equipo, los profesores a cargo tienen la experiencia previa y capacitarán al resto del personal, incluyendo a estudiantes de pre y post grado.
  
3. Indique las condiciones en que se mantendrán los animales en los períodos entre las distintas intervenciones.

Los animales se mantendrán en una habitación con luz y temperatura controladas. Se permitirá un máximo de 5 animales adultos por jaula. Los animales también serán monitoreados diariamente por personal veterinario y técnicos experimentados. Si un animal muestra signos de morbilidad importante, el personal veterinario se comunicará de inmediato con el investigador para generar un plan de tratamiento o eutanasia.

**F.- PROCEDIMIENTOS QUIRÚRGICOS**

1. Identifique y describa el o los procedimiento(s) quirúrgico(s) a realizar. Indique métodos de asepsia que utilizará.
  - Eutanasia programada e humanitaria
2. Indique nombre y experiencia de la(s) persona(s) que efectuará(n) procedimientos quirúrgicos.
  - Rodrigo Moore Carrasco, TM. PhD.
  - Nelson Brown Vega, MD. PhD.
3. Condiciones del lugar donde se efectuará el procedimiento quirúrgico.
  - Todos los procedimientos serán realizados en la sala de procedimientos del Bioterio de la Universidad de Talca.
4. Si el o los procedimientos(s) quirúrgico(s) incluye supervivencia del animal indique el cuidado postoperatorio requerido e identifique a la persona responsable.
  - No aplica.
5. Indique si los animales a utilizar en el estudio, han sido previamente sometidos a algún procedimiento invasivo o quirúrgico.
  - No aplica.
6. Justifique si un mismo animal será sometido a procedimientos quirúrgicos más de una vez.
  - No aplica.

#### **G. DOLOR Y AFLICCIÓN.**

1. Indique en la Tabla, cuántos animales sufrirán las siguientes categorías de dolor y/o aflicción. Nota: todos los animales a utilizar deben ser contemplados en la tabla.

CONDICIÓN	Nº animales a usar cada año			
	Año 1	Año 2	Año 3	Año 4
A. Sin Dolor o aflicción				
B. Dolor o aflicción mínimo, transitorio	54			
C. Dolor o aflicción aliviado por medidas apropiadas				
D. Dolor o aflicción sin alivio asistido				

2. Anestesia, Analgesia y Tranquilizantes (indique y describa claramente todos los procedimientos a realizar para lograr este fin).

Para el procedimiento de inoculación de tumor los animales estarán sedados con Xilacina 10mg/kg o acetopromacina 1mg/kg de forma intraperitoneal (Anesthesia and analgesia in laboratory animals, 2nd Ed. 2008. Academic

Press). Una vez terminado el periodo experimental o por razones humanitarias los animales serán anestesiados con una mezcla de ketamina (ketostop, DrangPharmainvetec S.A)/xilazina (Xylaret, Agroland) en relación 3:1 (2.2 µL/g de peso), para evitar el estrés y dolor antes de la eutanasia por dislocación cervical. Según lo establecido por los autores que generaron este modelo, como por la literatura disponible, no es necesario el uso de analgesia, sin embargo, contemplamos la utilización posterior a la implantación de paracetamol (gotas) con una dosis de 200 mg/kg por vía oral en una toma.

3. Si hay animales indicados en la fila C de la Tabla, se debe justificar por qué está contraindicado el uso de anestésicos, analgésicos, sedantes o tranquilizantes durante, o después de los procedimientos que causan dolor o aflicción (incluya referencias).

#### **H.- DISPOSICIÓN DE LOS ANIMALES AL FINAL DEL ESTUDIO.**

1. EUTANASIA (indique y describa claramente todos los procedimientos a realizar para lograr este fin, como por ejemplo, fármaco, vía o ruta de aplicación y el procedimiento).
  - 1.1. EUTANASIA PROGRAMADA : La eutanasia programada se llevara a cabo a través de la dislocación cervical del animal cuando se encuentre anestesiado y sin reflejos en patas y parpados.
  - 1.2. EUTANASIA NO PROGRAMADA (criterios de punto final humanitario utilizados): Cuando se tenga evidencia de aflicción, dolor o los tumores subcutáneos superen el volumen máximo permitido (2500 mm<sup>3</sup>), los animales serán sometidos a la eutanasia humanitaria en las mismas condiciones de la eutanasia programada.
2. Eliminación de desechos (indique como se dispondrán los cadáveres).

Las carcasas serán entregadas al bioterio de la Universidad de Talca para ser almacenados a -20°C hasta su disposición final.

3. SUPERVIVENCIA Describa la disposición y destino de los animales en caso de experimentos en que los animales no son eutanasiados al término del procedimiento.

#### **I. SUSTANCIAS DAÑINAS PARA ANIMALES O SERES HUMANOS**

1. El uso de sustancias peligrosas en la investigación con animales requiere de una aprobación separada. Es su responsabilidad contar con la(s) autorización(es) correspondiente(s). Si es relevante, incluya las

autorizaciones correspondientes, con este documento. Debe comunicar al Comité de Bioseguridad de la Universidad de Talca, si sus animales tendrán algún riesgo potencial para seres humanos en forma directa o para el medio ambiente.

Señale a continuación aquellas sustancias que utilizará.

	SI	NO	Lista de sustancias y documentación, si corresponde
Radionúclidos			NO
Agentes biológicos			Si, Células tumorales de ratón b16F10
Drogas o químicos peligrosos			NO
ADN recombinante			NO

2. Describa las prácticas y procedimientos requeridos para el manejo y disposición de animales contaminados y material asociado con este estudio. También describa el procedimiento para el retiro de material y basura radioactiva y el monitoreo de la radioactividad.

3. Consideraciones de seguridad adicionales:

**J.- MATERIAL BIOLÓGICO/PRODUCTOS ANIMALES PARA SU USO EN ANIMALES** (por ej. líneas celulares, antisueros, etc).

1. Especifique el material: Células tumorales de melanoma B16F10
2. Origen: Tumor singénico de ratón, aislado de la cepa C57Bl6
3. Indique si el material ha sido probado para las potenciales infecciones conocidas que derivan de él Si ...X... No ..... No existen riesgos, las células son propagadas *in vitro* en condiciones de esterilidad.
4. Certifico que este material proviene de fuentes formales, no contaminadas y no ha estado en contacto con animales o posibles fuentes de contaminación  
Si ...X..... No .....

**K.- REQUERIMIENTOS ESPECIALES** (Especifique algún requerimiento especial de la investigación propuesta).

## L.- CERTIFICACIONES DEL ACADÉMICO RESPONSABLE

1. Certifico que, a mi juicio, la investigación propuesta no constituye una duplicación innecesaria de investigaciones previas.
2. Certifico que todas las personas bajo mi supervisión y responsabilidad que participan en los procedimientos con los animales, trabajarán de acuerdo con las normas y reglas éticas vigentes nacionales e internacionales.
3. Certifico que he revisado la literatura científica y bases de datos pertinentes sin encontrar procedimientos válidos alternativos y de existir estos, por su alta complejidad no estoy en condiciones de desarrollarlos.
4. Certifico que los antecedentes presentados en este Protocolo incluyen la totalidad de los procedimientos con animales propuestos en el Proyecto.
5. Me comprometo a solicitar y obtener la aprobación del Comité Institucional de Ética, Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Universidad de Talca antes de iniciar CUALQUIER cambio al Protocolo aprobado, sea de procedimientos como de personal.
6. Declaro mi intención y me comprometo a difundir los resultados de este estudio a través de publicaciones o comunicaciones científicas, con el fin de evitar el sufrimiento de los animales innecesariamente.

Académico Responsable:

Nombre: Rodrigo Moore Carrasco

Fecha: 11 abril 2018

Firma: .....

VºBº Director de Programa Disciplinario, Departamento, Instituto o Escuela:

Nombre:

Fecha:

Firma: .....

Nota: No se aceptaran para su evaluación protocolos que no estén firmados por el investigador responsable y el director de la unidad académica