

UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

**«Estudio de la angiogenesis inducida por melanoma
en lecho irradiado»**

**Autor: José Gilberto Peñate González
Director: Dr. Claudio A. Otón Sánchez**

Departamento de Medicina Física y Farmacología

AGRADECIMIENTOS

La elaboración y realización del presente estudio experimental ha sido fruto de un extraordinario equipo de trabajo, sin su ayuda difícilmente hubiese llegado al fin del viaje. Por ello es una satisfacción poder manifestar mi más profunda gratitud a quienes de una manera u otra me han ayudado, y en especial:

Al Profesor Claudio A. Otón Sanchez por su labor docente , su estímulo en el terreno de la investigación y su orientación en lo profesional. Gracias de corazón.

Al Profesor Lucio Díaz-Flores Feo por su paciencia durante los años de realización del presente trabajo. Su ayuda ha sido indispensable y su modo de trabajar todo un ejemplo para quienes damos nuestros primeros pasos en el campo de la investigación.

Al Dr. Fidel Rodriguez Hdez por su entusiasmo en el mundo de la investigación; su tesón, su ánimo y hasta sus rabietas han sido la luz durante no pocos momentos oscuros en estos cinco años.

Al Dr. Fernando Otón Sánchez, compañero y maestro, su claridad de ideas y sus continuas enseñanzas han contribuido notablemente al resultado final de esta Memoria.

Al Dr. Francisco Valladares, gracias a él hemos obtenido las preparaciones microscópicas; su ánimo incansable y su apoyo han sido otro de los pilares del presente trabajo.

Al Dr. Ricardo Gutierrez, por su ayuda, apoyo sin límites y dedicación durante muchas tardes.

Al Laboratorio de Física Médica y Radiactividad Ambiental del Departamento de Medicina Física y Farmacología de la Universidad de La Laguna, en especial al Profesor D. José Hernandez Armas y a Juan Granados, por su inestimable colaboración en la realización de la dosimetría del presente trabajo.

A los Servicios de Oncología Radioterápica y de Protección Radiológica del Hospital Universitario de Canarias, por todas las facilidades dadas.

A la Unidad de Radiobiología del Departamento de Medicina Física y Farmacología de la Facultad de Medicina de la Universidad de La Laguna.

A mi esposa María Jesús. Su apoyo, comprensión y paciencia han sido imprescindibles durante las largas tardes de dedicación a la presente Memoria.

INDICE

Capítulo 1

INTRODUCCIÓN	
1.1 ANGIOGÉNESIS	3
1.1.1 El Fenómeno angiogénico	3
1.1.1.1 Las regiones del árbol vascular con capacidad angiogénica	3
1.1.1.2 Secuencias y patrón de la formación capilar	4
1.1.1.2.1 Formación de nuevos vasos	4
1.1.2 Control de la angiogénesis	9
1.1.2.1 Factores angiogénicos estimuladores	9
1.1.2.2 Factores angiogénicos inhibidores	10
1.1.2.3 Influencia de la matriz extracelular	11
1.1.2.4 Interacciones intercelulares	12
1.1.3 Angiogénesis tumoral	13
1.1.3.1 Angiogénesis en las lesiones preneoplásicas	13
1.1.3.2 Angiogénesis durante la transición de hiperplasia a neoplasia	14
1.1.3.3 Angiogénesis en los procesos neoplásicos	15
1.1.4 Modelos experimentales para analizar la respuesta angiogénica	17
1.1.4.1 Modelos «in vivo»	17
1.1.4.2 Modelos «in vitro»	18
1.1.5 Nuevos ensayos sobre Angiogénesis	19
1.2 ACCIÓN DE LAS RADIACIONES SOBRE LA MICROCIRCULACIÓN	21
1.2.1 Alteraciones morfológicas	22
1.2.2 Alteraciones funcionales	23
1.2.3 Parámetros Radiobiológicos	23
1.2.4 Cronología	24
1.3 EL EFECTO LECHO TUMORAL	25
1.3.1 Comportamiento de un tumor en lecho irradiado	26
1.3.2 Elementos modificadores del efecto lecho tumoral	27
1.3.2.1 Dosis	28
1.3.2.2 Tiempo	28
1.3.2.3 Estirpe tumoral	28
1.3.2.4 Fraccionamiento	29

1.3.2.5 Hipoxia	29
1.3.2.6 Radiosensibilizantes	29
1.3.2.7 Radioprotectores	30
1.3.3 Evolución de la persistencia tumoral, recidiva o metástasis sobre lecho irradiado	30
1.3.3.1 Estudios clínicos	30
1.3.3.2 Estudios experimentales	32

Capítulo 2

OBJETIVOS

Capítulo 3 Material y método

3.1 DISEÑO GENERAL	37
3.2 ANIMAL DE EXPERIMENTACIÓN	38
3.2.1 Características de los ratones C57BL/6	39
3.2.2 Criterios de Inclusión	40
3.2.2.1 Sexo	40
3.2.2.2 Edad	40
3.2.2.3 Peso	40
3.2.3 Mantenimientos y Cuidados	40
3.2.4 Procedimientos Anestésicos	42
3.2.4.1 Para realizar la irradiación e implante	42
3.2.4.2 Previo a la necropsia	42
3.3 SERIES EXPERIMENTALES	43
3.3.1 Grupos control	43
3.3.2 Grupos según intervalo irradiación e implante	43
3.3.3 Grupos según elemento irradiado	43
3.3.4 Grupos según tipo de implante tumoral	44
3.3.5 Grupo especial de seguimiento sobre lecho irradiado	44
3.3.6 Enumeración de las series experimentales	45
3.4 MODELO TUMORAL	47
3.4.1 Mantenimiento de la línea celular	48
3.4.1.1 Criopreservación	48
3.4.1.2 «In vivo»	49
3.4.1.3 «In vitro»	51

3.5 TÉCNICA DE IRRADIACIÓN	54
3.5.1 Aparato	54
3.5.2 Isodosis y tiempo de exposición	54
3.5.3 Procedimiento de Irradiación	
3.5.3.1 Del lecho receptor	56
3.5.3.2 Del tumor sólido	60
3.5.3.2.1 Subgrupos A	60
3.5.3.2.2 Subgrupos B	60
3.5.3.3 Del cultivo celular	61
3.5.4 Dosimetría	61
3.5.4.1 Aparato	61
3.5.4.1.1 Tasa de dosis	62
3.5.4.2 « In vivo »	62
3.5.4.3 « In vitro »	64
3.5.4.3.1 Placas de Petri	64
3.5.4.3.2 Frascos de cultivo tipo Falcon	65
3.6 PROCEDIMIENTOS DE IMPLANTE TUMORAL	65
3.6.1 Implante de tumor sólido	65
3.6.2 Implante de Suspensión Celular	66
3.7 NECROPSIA Y OBTENCIÓN DE DATOS	68
3.7.1 Lecho tumoral	68
3.7.2 Metástasis linfáticas y/o hematógenas	69
3.8 ESTUDIO MICROSCÓPICO	70
3.8.1 Técnicas de microscopía óptica	70
3.8.1.1 Hematoxilina-Eosina	70
3.8.1.2 Tricrómico de Mason-Goldner	72
3.8.2 Técnicas de microscopía electrónica	75
3.9 EVALUACIÓN DE RESULTADOS	80
3.9.1 Manejo de datos	80
3.9.2 Manejo estadístico	80

Capítulo 4 Resultados

4.1 MACROSCÓPICOS
4.1.1 Lecho
4.1.1.1 Series control

4.1.1.1.1 De tumor sólido	83
4.1.1.1.2 De suspensión celular	85
4.1.1.2 Series experimentales	
4.1.1.2.1 Subgrupo IA	85
4.1.1.2.2 Subgrupo IB	86
4.1.1.2.3 Subgrupo IIA	89
4.1.1.2.4 Subgrupo IIB	91
4.1.1.2.5 Subgrupo IIIA	92
4.1.1.2.6 Subgrupo IIIB	92
4.1.1.2.7 Subgrupo IVA	94
4.1.1.2.8 Subgrupo IVB	96
4.1.1.2.9 Subgrupo VA	96
4.1.1.2.10 Subgrupo VB	98
4.1.1.2.11 Subgrupo VIA	99
4.1.1.2.12 Subgrupo VIB	100
4.1.1.2.13 Subgrupo Especial	102
4.1.2 Metástasis linfáticas y/o hematógenas	103
4.2 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	
4.2.1 Volumen tumoral	108
4.2.1.1 Según elemento irradiado	110
4.2.1.2 Según intervalo temporal	113
4.2.1.3 Según tipo de implante	115
4.3 HALLAZGOS MICROSCÓPICOS	
4.3.1 Series control	
4.3.1.1 Serie control de tumor sólido	118
4.3.1.2 Serie control de suspensión celular	133
4.3.2 Series experimentales	
4.3.2.1 Subgrupos IA y IB	147
4.3.2.2. Subgrupos IIA y IIB	154
4.3.2.3 Subgrupos IIIA y IIIB	172
4.3.2.4. Subgrupos IVA y IVB	181
4.3.2.5 Subgrupos VA y VB	188
4.3.2.6 Subgrupos VIA y VIB	197

Capítulo 5

Discusión

5.1 VOLUMEN TUMORAL	210
5.1.1 <i>Influencia del elemento irradiado</i>	
5.1.1.1 <i>Irradiación del lecho</i>	211
5.1.1.2 <i>Irradiación del tumor</i>	211
5.1.2 <i>Influencia del intervalo temporal</i>	
5.1.2.1 <i>Cuando se irradia el lecho</i>	213
5.1.2.2 <i>Cuando se irradia el tumor</i>	213
5.1.3 <i>Influencia del tipo de elemento tumoral implantado</i>	
5.1.3.1 <i>Irradiación del lecho</i>	213
5.1.3.2 <i>Irradiación del tumor</i>	214
5.2 METÁSTASIS A DISTANCIA	215
5.3 ANGIOGÉNESIS	
5.3.1 <i>Origen a partir de la microcirculación del lecho</i>	218
5.3.2 <i>Origen a partir de la microcirculación del implante</i>	218
5.3.3 <i>La respuesta angiogénica se produciría por migración, sin proliferación</i>	220
5.3.4 <i>Origen a partir del territorio no irradiado</i>	221
5.3.5 <i>Cualquier combinación de las anteriores</i>	221
6. CONCLUSIONES	
7. BIBLIOGRAFIA	
8. ANEXOS	

1.INTRODUCCIÓN

La angiogénesis desempeña un papel fundamental en numerosos procesos, tanto benignos (inflamación, cicatrización y reparación de heridas.....) como malignos (crecimiento y progreso tumoral) ^{4,17}.

En el crecimiento tumoral podemos señalar una primera fase “avascular”, en la que experimenta un crecimiento lento, pudiendo permanecer en dicha situación durante años, y otra fase “vascular” tras la penetración de la membrana basal que separa el epitelio del estroma subyacente. Esta situación constituye un momento crucial en el proceso neoplásico, produciéndose una aceleración del crecimiento tumoral que conlleva un aumento de la demanda nutricional, que actúa como potente estímulo angiogénico ^{4,93}.

La estrecha dependencia entre crecimiento tumoral y angiogénesis ha despertado el interés de numerosos investigadores sobre los distintos factores que pueden influir en el proceso angiogénico ^{4,5,8,144}. Así, ha sido objeto de numerosos estudios el papel fundamental que la vascularización y la oxigenación desempeñan en la respuesta a las distintas terapéuticas oncológicas, con especial referencia al uso de las radiaciones ionizantes ^{105,111,118-123,182,218,273}.

La extensa bibliografía que sobre angiogénesis neoplásica existe, nos descubre aspectos no aclarados con relación a su posible modificación por la acción de las radiaciones ionizantes, así como la conducta del lecho receptor (con especial referencia a las modificaciones endoteliales de revestimiento vascular) o del parénquima tumoral ante la acción de las mismas ^{28,136,174}.

1.1 ANGIOGÉNESIS

La angiogénesis constituye un proceso complejo que histológicamente es definido como un mecanismo de neovascularización a través de la progresión desde los capilares preexistentes. Es indispensable en el desarrollo fetal y embrionario, así como en un elevado número de procesos durante el periodo post-natal ^{41,77,162,205,237,267-8} convirtiéndose en un componente fundamental de los mismos: procesos de inflamación, regeneración y reparación de heridas, organización de trombos, desarrollo de circulación colateral, neoplasias y en las denominadas “enfermedades angiogénicas” en las que una alteración del crecimiento capilar es su principal hecho patológico ⁷⁹, entre éstas podemos encontrar hemangiomas, psoriasis ¹⁶⁷, esclerodermia ¹⁴¹ artritis reumatoide, retinopatía diabética ⁴⁵ y glaucoma neovascular.

1.1.1 EL FENOMENO ANGIOGENICO

Las regiones del árbol vascular con capacidad angiogénica así como la secuencia, patrón y acontecimientos de la formación de nuevos vasos sanguíneos serán analizados en este epígrafe

1.1.1.1 *Las regiones del árbol vascular con capacidad angiogénica:*

En general se acepta que las yemas vasculares se originan de las paredes de capilares preexistentes y de pequeñas vénulas postcapilares ^{9,171,236,240,254}. Algunos autores aceptan solamente un origen de los nuevos vasos del área venosa de la circulación ²¹⁰,

específicamente desde pequeñas vénulas con ausencia de células musculares lisas ⁹. No disponemos de datos que indiquen que puedan originarse desde el lado arterial de la circulación.

1.1.1.2 *Secuencia y patrón de la formación capilar. Visión de la angiogénesis bajo descripción de microscopía electrónica.*

Las yemas vasculares son ya vistas a las 27 horas del estímulo angiogénico ²⁶. Durante las primeras horas los capilares preformados y las vénulas postcapilares se vuelven ampliamente distendidas y tortuosas, con cambios más acusados en estas últimas. En la pared de las vénulas se producen numerosas impresiones, que corresponden a leucocitos marginales. Entre el tercero y el quinto día el número de yemas se incrementa notablemente produciendo un rico plexo anastomótico. En algunas condiciones el proceso de neovascularización puede ser extremadamente rápido, por ejemplo durante los días 1 y 2 del ciclo menstrual en el hámster la vascularización del cuerpo lúteo crece desde los vasos preexistentes de la teca ⁹⁰.

1.1.1.2.1 *Formación de nuevos vasos:*

Los acontecimientos esencialmente implicados en el crecimiento capilar in vivo incluyen:

Activación de la célula endotelial y pericitos

Los cambios morfológicos más precoces que ocurren en la célula endotelial quiescente consisten en hipertrofia con ocupación de la luz vascular, agrandamiento nuclear, nucleolo prominente, aumento del número de organelas y la formación de pro-

yecciones desde la superficie^{9,41,171,236}. Ha sido descrito incremento de la síntesis de DNA por la célula endotelial una vez iniciado el mecanismo angiogénico²⁶. Se produce la liberación de proteasas y del activador del plasminógeno desde las “yemas” endoteliales.

Los pericitos sufren asimismo modificaciones tanto de sus características morfológicas como de sus relaciones topográficas⁵¹. Los primeros cambios incluyen el acortamiento de sus prolongaciones y un aumento del número de polirribosomas citoplasmáticos¹⁷¹.

Degradación de la lámina basal de los vasos preexistentes

Es un paso necesario para la migración de la célula endotelial desde los “vasos madre”^{9,236}. La completa disolución se produce en el área cercana al estímulo angiogénico, coincidiendo con el lugar donde la célula endotelial comienza a crecer hacia fuera, mientras similares cambios comienzan en el resto de la pared vascular. Por lo tanto las prolongaciones de la célula endotelial no tienen lámina basal, sino un substrato provisional con proteoglicanos alterados. Los cambios en la lámina basal son debidos a enzimas proteolíticas sintetizadas y secretadas por las células endoteliales activadas¹⁸⁰

Migración de la célula endotelial desde los vasos preexistentes hacia el estímulo angiogénico.

En la fase inicial de neovascularización la célula endotelial degrada la membrana basal de la pared vascular, protruye a través de la pared y empieza a migrar dentro del intersticio hacia el estímulo angiogénico, toda vez que la célula endotelial migra com-

pletamente otra le sigue y se forman cordones de células endoteliales en el estroma perivascular; la liberación de colagenasas y del activador del plasminógeno por las células endoteliales que sirven de “avanzadilla” actúan como potente agente quimiotáctico.

La migración de la célula endotelial, en respuesta a la matriz extracelular, depende de la familia de las integrinas y de los receptores de adhesión celular¹⁵⁴. La unión, proliferación y migración de la célula endotelial son mediadas por las integrinas $\alpha2\beta1$ y $\alpha4\beta3$ ¹⁵⁴

Proliferación de células endoteliales

Durante la angiogénesis, la síntesis de DNA endotelial ocurre en los vasos preexistentes antes de que se formen las yemas vasculares, según algunos autores en un intervalo tan escaso como de seis a ocho horas después de que el estímulo angiogénico fuese aplicado³⁰. La secuencia temporo-espacial de la división endotelial permanece sin aclarar, así para algunos autores la mitosis de la célula endotelial se produce concomitante a la formación de nuevas yemas²⁴⁶, mientras que la mayoría son de la opinión de que la mitosis en la célula endotelial se produce después de que inicie la migración. Las mitosis se producen tanto en los vasos “padres” como en los neoformados^{16,42}.

Migración y proliferación de pericitos desde los vasos preexistentes

Los pericitos ,cuya procedencia parece ser de los fibroblastos perivasculares²⁵³, son activados durante el proceso de angiogénesis post-natal, interviniendo en las distintas etapas e incorporándose a los neovasos^{49,51-53}.

Formación de una nueva luz vascular

Durante la angiogénesis, las células endoteliales forman canales tubulares capaces de transportar sangre. Dos modelos son considerados en la formación de la nueva luz vascular: en el primero se produciría una vacuolización intracelular en el citoplasma endotelial de células contiguas, que conduciría a una canalización intercelular por conexión de las vacuolas⁸⁴, en el segundo modelo se produciría una canalización intercelular de los distintos procesos endoteliales adyacentes; otro aspecto sujeto a controversia es el momento en el que se produciría la conexión de la nueva luz vascular con la vascularización inicial^{9,58}.

Aparición de pericitos alrededor de los nuevos capilares

En los estadios iniciales del proceso angiogénico post-natal la relación entre endotelio y pericitos permanece sin aclarar. La mayoría de los autores opinan que dicha relación ocurre principalmente al final del estadio proliferativo, tras la formación de la luz capilar, atribuyendo a los pericitos diversas funciones como la de servir de soporte a las células endoteliales en crecimiento¹⁸⁷ o influir en la regulación angiogénica¹⁹⁸; así la ausencia de pericitos en los extremos de las yemas vasculares se piensa que estimula las mitosis de la célula endotelial, mientras que su presencia en regiones más antiguas de los capilares puede inhibir la proliferación y migración de la célula endotelial^{198,235}.

Cambios en la matriz celular con desarrollo de una nueva lámina basal.

En los vasos quiescentes están presentes en la membrana basal: laminina, fibronectina, sulfato heparan, proteoglicanos y colágenos tipo IV y V.

En los estadios iniciales del desarrollo de microvasos la fibronectina es el componente predominante de la matriz provisional, configurando una delicada red fibrilar; progresivamente los depósitos de fibronectina disminuyen, volviéndose discontinuos, mientras la laminina y colágeno tipo IV aumentan, acumulándose y formando un continuo lecho en el espacio subendotelial. En los últimos estadios de angiogénesis, se incrementan las cantidades de colágeno tipo I y tipo III en el espacio perivascular.

Formación de asa capilar

Las nuevas yemas capilares, que contienen células endoteliales emigradas, empiezan a enlazarse y unirse formando asas capilares. Otras yemas capilares surgen desde estas asas originando plexos.

La formación de asas capilares ha sido bien demostrada durante la reacción angiogénica en la cornea, dónde las yemas secundarias desarrolladas desde los lugares de crecimiento de las yemas iniciales, conducen a una morfología en cepillo ¹⁸⁶.

Cambios precoces en los nuevos vasos formados

Durante el proceso angiogénico, un sustancial número de neovasos regresa, algunos requieren el estímulo angiogénico para persistir. Toda vez que algunos de los neovasos alcanzan la fuente de estímulo angiogénico, se produce una disminución del flujo en los vasos menos formados que involucionan ⁸.

La nueva microcirculación formada puede ser influenciada por los tejidos en los que se desarrolla. Así, aunque la neovascularización en las metástasis tumorales se ini-

cia desde el lecho receptor, pueden adquirir las características morfológicas de los vasos del órgano primario en el que se origina la neoplasia.

Formación de red capilar y eventual organización de mayores microvasos.

Los mecanismos que llevan al establecimiento de una circulación funcional durante el proceso angiogénico post-natal son difíciles de explicar, aceptándose dos hipótesis, que probablemente se complementen: una sería la remodelación de los nuevos capilares formados y sus vasos parentales y otra alternativa sería la anastomosis de los nuevos capilares con los vasos preexistentes de mayor calibre venosos de la circulación⁵⁰.

1.1.2 CONTROL DE LA ANGIOGÉNESIS

La formación de neovasos depende de estímulos angiogénicos para iniciar y dirigir la proliferación y migración de células endoteliales en el tejido conectivo^{74,77,78,94}. Vamos por lo tanto a referirnos a los principales factores en el control angiogénico:

1.1.2.1 Factores angiogénicos estimuladores

Se ha demostrado que dichos factores angiogénicos son capaces de iniciar el proceso angiogénico, tanto después de su liberación local tras la activación por los genes que los codifican, como por su liberación desde los lugares de almacenamiento.

Un factor angiogénico es llamado directo cuando es capaz de inducir proliferación y/o migración “in vivo” y de estimular células endoteliales “in vitro”. Cuando esta última falla o es inhibida, el factor angiogénico es llamado “indirecto ” asumiendo que su acción es la de movilizar otros factores o células “in vivo”. Según la acción que producen podemos clasificarlos en quimiotácticos, mitogénicos o angiogénicos. De otra parte señalar que pueden actuar principalmente o específicamente sobre la célula endotelial, o por el contrario, puede ser pleiotrópico e intervenir sobre otras células tales como fibroblastos, células musculares lisas, etc.

Entre los factores angiogénicos directos podemos señalar el factor de crecimiento fibroblástico básico bFGF, el factor de crecimiento fibroblástico ácido aFGF , el factor de crecimiento vascular endotelial VEGF, el factor de crecimiento endotelial derivado de plaquetas (PD FGF) y el factor de permeabilidad vascular. Los factores de crecimiento indirecto cubren un elevado número de sustancias tales como TGF- α , VEGF, TGF- β , TNF, PDGF, PGS-E...

Algunas moléculas angiogénicas están presentes en los tejidos adultos incluso en ausencia de estímulo angiogénico, por lo que se ha postulado que la posibilidad de respuesta angiogénica dependa de la activación o inactivación de estas moléculas ²⁷⁶. Así, el tejido corneal bajo estimulación angiogénica se vuelve más rico en ácido siálico ²¹⁵; por otro lado los cambios en la relación de las distintas sustancias en la composición tisular local pueden modificar la respuesta angiogénica ²⁷⁷.

1.1.2.2 Factores angiogénicos inhibidores.

Aunque el término “inhibidor angiogénico” no fue introducido hasta 1975 ²⁰, numerosos factores habían sido identificados como inhibidores de la formación de vasos. El estudio de tales factores es de gran interés ya que nos permitiría disponer de un poderoso agente en el tratamiento de las enfermedades angiogénicas, e incluso inhibir el proceso de angiogénesis durante el crecimiento tumoral. ^{47,82,237}

Podemos señalar como tales al inhibidor tisular de las metaloproteasas, la trombospodina, la protamina, el factor plaquetario-4, el interferon, esteroides péptidos sintéticos con la secuencia de aminoácido Arg-Gly-Asp-Minociclina, difluorometil-Ornitina, extractos de cartílago, la endostatina ²⁰¹ la angiostatina ^{12,32,97,98,156,159,199}.

1.1.2.3 *Influencia de la matriz extracelular.*

La diferente organización estructural y composición de la matriz extracelular durante el crecimiento vascular es principalmente debida al hecho de que las células endoteliales secretan enzimas, que digieren la membrana basal preexistente ¹⁸⁰ y sintetizan glicoproteínas, proteoglicanos y colágeno ¹⁰ que configuran la matriz extracelular de los nuevos vasos, así la célula endotelial juega un importante papel en la remodelación de la matriz extracelular que la rodea durante el desarrollo capilar.

Al mismo tiempo, los cambios en la composición de la matriz extracelular puede tener importantes efectos reguladores sobre los diversos estadios del proceso de morfogénesis vascular, modificando la organización, función y comportamiento de las células endoteliales, así como el fenotipo celular, las propiedades mitogénicas y quimiotácticas. Por lo tanto, la matriz extracelular influye sobre la proliferación y migración de la célula endotelial, y además su capacidad para diferenciarse en estructuras capilar-like y

determinar la correcta polarización celular . Por último, señalar que los componentes de la matriz extracelular influyen notablemente sobre el grado de recuperación de la célula endotelial lesionada.

Durante el proceso angiogénico, los diferentes componentes de lámina basal se distribuyen alrededor de los nuevos vasos formados y estos componentes pueden inducir la formación de la luz vascular como estructuras tubulares.

Cuando la síntesis y la degradación de los componentes de la lámina basal son alteradas, el proceso de neovascularización es inhibido; esto apoya la hipótesis de que la formación de una nueva lámina basal juega un papel primordial en el desarrollo de nuevos vasos.

Las integrinas, moléculas de la superficie celular que median en la adhesión a otras células vecinas o a la matriz extracelular, probablemente desempeñen un papel clave en la angiogénesis. Así, anticuerpos anti-integrinas, directamente dirigidos a los receptores de integrinas aumentan la formación capilar “in vitro”; este hecho sugiere que la restricción de específicas interacciones célula-matriz, puede aumentar la formación capilar, convirtiendo células endoteliales de un fenotipo proliferativo a otro diferenciado.

1.1.2.4 Interacciones intercelulares.

Podemos señalar distintas proteínas de adhesión de la célula endotelial como integrinas, selectinas, cadherinas, y miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas llamada CAMs (moléculas de adhesión celular). El componente VE-cadherina, conocida como cadherina 5 parece estar localizado tanto en las uniones intercelulares tipo

adherente como sindesmosomas y la molécula de adhesión endotelio-plaquetar “PE-CAM-1 ” (conocida como CD-31), es expresada por plaquetas y células derivadas de la línea mieloide, y es por otro lado específica para las uniones interendoteliales.

Podemos señalar que el resultado de la inhibición angiogénica es fruto de complejas propiedades de las células endoteliales, incluyendo la adhesión intercelular, las interacciones de la matriz extracelular y regulación del ciclo celular.

1.1.3 ANGIOGENESIS TUMORAL

1.1.3.1 Angiogénesis en las lesiones preneoplásicas

La neovascularización desempeña un papel clave en la carcinogénesis, la progresión tumoral y el proceso metastásico. El paso desde la fase avascular a la vascular se incluye dentro del proceso evolutivo del proceso neoplásico y generalmente es acompañado de rápido crecimiento e invasión del tumor primario.

En 1977 Brem y Gullino²¹ encontraron que en una hiperplasia mamaria inducida químicamente en el ratón, la formación de nuevos vasos (visualizados por el trasplante del tejido al iris del conejo) fue iniciada mucho antes que cualquier formación tumoral. Ellos sugirieron la hipótesis de que la angiogénesis puede ser una señal del proceso de transformación de papilomas hacia carcinoma, que aparecía meses después. Esta observación experimental fue posteriormente observada con patología humana²²

En 1989 Folkman y col⁸⁷ demostraron en un brillante modelo experimental que la actividad angiogénica, en una línea de ratón transgénico que expresaba un oncogen

híbrido (RIP1-Tag2), primero aparecía en algunos clones de células pancreáticas hiperplásicas antes que la formación tumoral.

Más recientemente Guinebretiere y col ¹⁰⁹ observaron que entre los pacientes con enfermedad fibroquística mamaria el riesgo de desarrollar cáncer de mama está relacionada con la densidad vascular intralesional; similar observación fue reportada por Fregene y col. ⁹² que estudiaron el patrón de vascularización en una serie de 58 casos con lesiones proliferativas y no proliferativas de la glándula mamaria, encontrando que las mujeres postmenopáusicas con enfermedades proliferativas de la mama tenían la densidad de microvasos más alta; ya que dichas lesiones proliferativas son a menudo pre-cancerosas, la cuantificación de la actividad angiogénica puede ser útil en la identificación de mujeres con mayor riesgo de padecer cáncer de mama.

Weidner y col. ²⁴⁶ definieron las propiedades angiogénicas de la displasia cervical y de la neoplasia intraepitelial (CIN), precursores del cáncer de cuello uterino. Las lesiones más avanzadas (CIN III) presentaban una densidad de microvasos significativamente más alta que las de bajo grado (condiloma y CIN-I).

Estos estudios sugieren que en situaciones específicas la angiogénesis puede preceder al desarrollo de tumores invasivos y que la determinación de actividad angiogénica puede ser útil para identificar lesiones benignas o pre-neoplásicas en alto riesgo de transformación a neoplasias invasivas.

1.1.3.2 La angiogénesis durante la transición de hiperplasia a neoplasia

La adquisición de un "fenotipo angiogénico" es un importante hecho en la transición desde hiperplasia a neoplasia ^{87,88}. Así, en estudios experimentales con ratones transgénicos que expresan un oncogén en las células Beta de los islotes pancreáticos y desarrollan una progresión desde estado normal hacia hiperplasia y posterior neoplasia, se ha visto que la actividad angiogénica y consiguiente neovascularización preceden a la formación neoplásica ^{102,103} demostrándose que los vasos sanguíneos originados a raíz del estímulo angiogénico contribuyen al crecimiento del tumor sólido al mantener la perfusión y por lo tanto la viabilidad del parénquima tumoral ^{74,76}.

Durante el crecimiento tumoral el cambio al "fenotipo angiogénico" se muestra estrictamente correlacionado con la adquisición de propiedades de crecimiento progresivo por la neoplasia ^{76,142,184,269}.

1.1.3.3 *Angiogénesis en los procesos neoplásicos*

Los tumores sólidos "in vivo" cuando alcanzan 1-2 milímetros de diámetro necesitan de nuevos vasos sanguíneos ^{74,81,184} para seguir creciendo, dicha neovascularización tiene su estímulo inicial fruto de la liberación de factores angiogénicos por las células tumorales o por las células inflamatorias ^{54,213}.

El resultado es un complejo proceso con múltiples pasos que finalmente conduce a la formación de yemas vasculares y formación de redes capilares originadas probablemente de las vénulas postcapilares. El estímulo angiogénico se cree que ocasiona diversos cambios en las células endoteliales, incluyendo disolución de la membrana basal, migración, proliferación y morfogénesis de la célula endotelial. Dicho proceso parece estar regulada por un número de citokinas ⁸⁵, fibrina ⁵⁷, moléculas de la matriz

extracelular, integrinas y otras moléculas de adhesión ^{24,129}, enzimas proteolíticas, carbohidratos ²²⁸, carbohidratos unidos a proteínas ^{11,188} hormonas esteroides ^{91,274} lípidos, iones metálicos y una gran variedad de sustancias de bajo peso molecular ⁴⁰.

La entrada de los vasos sanguíneos y otros componentes del estroma dentro del volumen tumoral recuerda al tejido de granulación reparativo ^{55,59,74,77,78} diferenciándose en que el proceso reparativo se produce de forma limitada y en el proceso neoplásico la expansión es continua acompañado de un proceso vascular “crónico” según demanda tumoral.

La estructura organizativa de la microcirculación en el estroma tumoral no es tan jerárquica como en los tejidos normales; los tumores muestran cambios fenotípicos como vasos dilatados e irregulares ^{108,227,267} así como una elevada proliferación de células endoteliales ^{30,48,255} y una elevada permeabilidad ^{116,132}. En definitiva, los vasos sanguíneos asociados al tumor desarrollan una membrana basal más debilitada, y tienen menos pericitos e inervación; aspectos todos ellos que pueden contribuir a una mayor permeabilidad de los vasos sanguíneos; que puede asimismo verse favorecida por diversas citokinas como el factor de crecimiento vascular endotelial (VEFG) que es secretado por diversos tipos de células tumorales.

Estas múltiples alteraciones en la función de los vasos sanguíneos y su arquitectura pueden ocasionar cambios en el aporte de flujo y originar trastornos en el intercambio de metabolitos que pueden originar una alta presión intersticial en el interior de los tumores sólidos que comprometería la penetración de nutrientes a las capas más profundas y conducir a necrosis local debido a que la perfusión tumoral parece ser insuficiente, a pesar del continuo proceso de neovascularización ^{133,134}.

1.1.4 MODELOS EXPERIMENTALES PARA ANALIZAR LA RESPUESTA ANGIOGÉNICA

Desde los estudios clásicos sobre morfogénesis y permeabilidad de los nuevos vasos sanguíneos^{33,236,269} se han realizado un elevado número de estudios “in vivo” e “in vitro” encaminados a comprender el “fenómeno angiogénico”^{8,206}. Señalar que la utilización de polímeros inertes, con capacidad de liberación sostenida de factores angiogénicos o antiangiogénicos^{151,184,223} ha sido de gran interés para algunas de las técnicas experimentales.

1.1.4.1 Modelos “in vivo “

Incluyen modelos donde la respuesta angiogénica puede ser analizada en áreas específicas y en condiciones controladas. Así podemos señalar el uso de córneas de conejo^{74,101} rata⁸⁹,ratón⁸ o del cerdo de Guinea que constituyen un lugar apropiado para demostrar el proceso de neovascularización , ya que normalmente son completamente avasculares y los neovasos pueden ser distinguidos de los vasos del limbo, permitiéndonos un substrato transparente en el que podemos monitorizar la respuesta angiogénica^{39,106,110,213,214}. El estímulo inductor de la neovascularización es producido por lesiones, tumores o polímeros una vez implantados en la zona central corneal. Otro modelo utilizado ha sido la membrana corioalantoidea^{2,7,75,196,247} o el saco vitelino del embrión de

pollo²⁵³ que poseen un sistema inmune inmaduro permitiendo el crecimiento de injertos. Otros sitios inmunológicamente privilegiados utilizados han sido: la "bolsa" en la mejilla, la cámara anterior del ojo del hamster⁴⁵, el saco dorsal aéreo, el método "blister"²⁴², el mesenterio^{192-194,271}.

Se han utilizado también implantes subcutáneos de cilindros de poliuretano^{17,18} y las esponjas de alcohol polivinilo, conteniendo polímeros que son liberados lentamente a través de los microporos⁶⁷; Así como el implante subcutáneo de matrices que actúan como iniciadores de la angiogénesis y permiten la introducción de sustancias test⁵⁶ y la introducción de células o fármacos en alginato^{212,224}.

1.1.4.2 Modelos "in vitro"

El fenómeno angiogénico ha sido estudiado morfológicamente por diferentes sistemas in vitro^{58,86,113,163}. Después de la introducción de métodos para cultivo de células endoteliales^{100,131} se comprobó que éstas, aisladas tanto de pequeños como grandes vasos han sido capaces de formar "in vitro" "redes capilares-like" cuando se mantienen bajo condiciones de cultivo apropiadas^{83,149,160,178,208}.

Los "sistemas in vitro" con formación de estructuras "capilares like" han sido realizados en cultivos de células endoteliales de varios tipos de vasos sanguíneos, tales como vena humana umbilical¹⁶⁰, aorta bovina⁶⁸ capilares bovinos^{84,179} y capilares de ratas^{164,234}.

Los resultados de los estudios han permitido establecer diferentes parámetros entre los que podemos señalar el grado de recubrimiento de una superficie desnuda en una capa confluyente de células endoteliales; en estas condiciones, la migración de célu-

las endoteliales da un valor cuantificable de la respuesta angiogénica ²⁰⁸. Un segundo aspecto estudiado ha sido la quimiotaxis y quimiocinesia de las células endoteliales usando diferentes procedimientos ^{195,256}. tales como el ensayo fagocinético en el que las células se mueven sobre una monocapa de oro y fagocitan las partículas coloidales, dejando “ huellas migratorias” ²⁶⁴. También se ha comprobado el grado de proliferación endotelial en cultivos con factores test, que es determinada por la síntesis o el contenido de DNA ²⁴⁴.

Los estudios “in vitro” nos han permitido analizar los cambios en la función de las células endoteliales durante la angiogénesis, así como las modulaciones en la producción de citokinas ²⁴³ actividad fibrinolítica , síntesis de la lámina basal ,la formación de vasos con relación al estroma ^{160,191} o el papel de los pericitos en la angiogénesis usando co-cultivos tanto de pericitos como de células endoteliales ⁴¹.

Estas posibilidades para el estudio "in vitro " de la angiogénesis se han visto reforzadas por la posibilidad de ensayos tridimensionales ^{103,162,272}.

1.1.5 NUEVOS ENSAYOS SOBRE ANGIOGENESIS

En la última década la investigación básica sobre angiogénesis se ha desarrollado de manera importante y varios estudios experimentales independientes demostraron que el crecimiento tumoral y la progresión neoplásica son angiogénico-dependiente ⁸⁰ así como su relación con la posibilidad de metástasis a distancia ^{95-6,125,197}.

El conocimiento de esta relación ha originado que numerosas investigaciones se hayan encaminado a la identificación de reguladores inhibidores de la angiogénesis y la caracterización de su mecanismo de acción. En la actualidad se encuentran bajo investigación en ensayos clínicos diferentes inhibidores de la angiogénesis por la FDA:

TNP-470 (Derivado de la fumagilina). Ensayos en fase II

SQUALAMINE. Ensayos en fase I

VITAXIN. Ensayos en fase I

MARIMASTAT (Inhibidor de las metaloproteasas). Ensayos en fase III en cáncer de páncreas, pulmón, gástrico, mama y glioma.

RhuMab VEGF. Ensayos en fase II

TALIDOMIDA. Ensayos en fase II en sarcoma de Kaposi, cáncer de mama y próstata.

INTERFERON ALFA-2^a

LINOMIDA

DS-4152 (TECOGALAN SULFATO POLISACARIDO)

SU5416. Ensayos en fase I

Bay 12-9566. Ensayos en fase II en cáncer de páncreas y pulmón.

AG3340. Ensayos en fase III en cáncer de pulmón.

Col-3. Ensayos en fase I

CM101. Ensayos en fase I.

Junto a estos hay que señalar nuevos productos; el primero descubierto por David A. Cheresh y colaboradores en el Instituto Scripps, que consiste en una proteína que

al bloquear al receptor α V β 3, perteneciente a la familia de las integrinas y que se encuentra en la superficie endotelial, provoca la muerte de las células proliferantes endoteliales. El segundo de los prometedores componentes es la proteína angiostatina, que puede ser liberada por el propio tumor y originada a partir del plasminógeno^{12,97,98,156} que fue descubierta en la orina del ratón por Michael S. O'Reilly¹⁹⁹. Se ha comprobado que en estudios experimentales con ratones puede detener el crecimiento de los vasos sanguíneos^{32,159} tanto en el primario tumoral como en sus metástasis²⁷⁵; así, en tumores implantados en los ratones a los que se les permitió crecer hasta un determinado tamaño, tras la administración de la angiostatina se comprobó que regresaba el tamaño hasta hacerse microscópico y permanecían en dicha situación tanto tiempo como tiempo fuese administrado el producto^{152,200,241,29}

Un tercer factor, la endostatina, ha sido recientemente aislado. Puede ser liberada por el tumor, es el fragmento de 20 Kda C-terminal del colágeno XVIII. Se ha comprobado en estudios experimentales que puede parar el crecimiento tumoral y causar su regresión²⁰¹.

Tras los prometedores resultados obtenidos con los animales de experimentación, se está planeando la realización de ensayos clínicos con estos nuevos elementos.

1.2. ACCION DE LAS RADIACIONES SOBRE LA MICROCIRCULACIÓN

Los estudios realizados establecen que una de las dianas más importantes sobre la que actúan las radiaciones ionizantes en los tejidos de mamíferos (en las dosis terapéuticas utilizadas) es la microcirculación y más concretamente la célula endotelial.

La sensibilidad de la célula endotelial a las radiaciones tanto in vivo^{66,99,123,219,260} como in vitro^{46,137,150,169,207,220,222} ha sido analizada por numerosos autores, demostrándose una dosis dependencia de la lesión celular.

Dada la estrecha relación entre angiogénesis y crecimiento neoplásico, es probable que la radiolesión de la microcirculación condicione modificaciones en ambos casos.

1.2.1 ALTERACIONES MORFOLÓGICAS

Las alteraciones morfológicas de la célula endotelial fruto tanto de dosis letales como de subletales han sido descritas en detalle tanto en cultivos¹³⁷ como en muestras de tejidos mamíferos irradiados.

El capilar es la estructura que manifiesta morfológicamente de forma más precoz el daño radioinducido. Los primeros días o semanas tras la radiación el endotelio muestra cambios evidentes tales como retracción^{1,66,211} pleomorfismo o vacuolización. Las células vacuoladas tienden a desprenderse, produciendo áreas de denudación de la basal y oclusión de la luz capilar por detritus y microtrombos. Ocurre entonces agregación plaquetaria y se producen trombos fibrino-plaquetarios que además obstruyen el capilar. Algunos capilares se pierden permanentemente y son sustituidos por cordones fibrosos, otros se obliteran temporalmente y eventualmente se recanalizan²¹¹. La intensidad de estos fenómenos se ha visto que es dosis dependiente.

Asociado a la pérdida celular endotelial pueden encontrarse cambios reactivos y regenerativos, como el engrosamiento y elongación de núcleos celulares, figuras de mitosis y presencia de pares o grupos de núcleos en puntos determinados de un vaso,

desprovisto por lo demás de elementos endoteliales. En ocasiones estos grupos parecen ocluir totalmente la luz del vaso ^{66,211}. Además, puede existir cierta neovascularización aún en ausencia de proliferación endotelial efectiva ²¹¹

1.2.2 ALTERACIONES FUNCIONALES

Es bien conocido el incremento en la permeabilidad vascular tras la irradiación, tanto en estudios con radiotrazadores como en tinciones vitales u observaciones ultraestructurales ^{61,63,107,153,165,181,258}.

Sólo algunas de las funciones de las células endoteliales han sido estudiadas con relación a la interacción con las radiaciones ionizantes ^{3,64,72,114,245,258,265-6} señalar asimismo que es escaso nuestro conocimiento sobre el efecto de las dosis subletales sobre la integridad funcional del endotelio.

1.2.3 PARAMETROS RADIOBIOLÓGICOS

Algunos de los estudios iniciales, usando células endoteliales de la vena umbilical, mostraron una inhibición del crecimiento en torno al 37% con dosis de 1.6 Gy y completa inhibición con dosis de 7.5 Gy. La inhibición del crecimiento fue dosis-dependiente y la disminución en la eficacia de unión fue descrita con células endoteliales de aortas bovinas cuando fueron expuestas a dosis simples entre 2.5 y 20 Gy ¹³⁷. Estos efectos fueron mayores que los observados en miocitos bajo las mismas condiciones. Explantes de células de las íntimas de aortas de conejos o monos mostraron una reducción del 50% en el crecimiento tras dosis de 2 Gy y del 99% tras dosis de 7.5

Gy⁷¹. Estas células fueron además más sensibles que las células de la capa medial (probablemente miocitos) y que células de la adventicia (presumiblemente fibroblastos) de los mismos vasos.⁷¹

Existen numerosos ensayos clonogénicos dirigidos a cuantificar la radiosensibilidad de las células endoteliales procedentes de diversos órganos de mamíferos^{169,207}. De éstos se obtienen globalmente las siguientes cifras:

$D_0 = 1,01$ (Célula endotelial aorta bovina) - $1,57$ Gy (Célula endotelial porcina)

$n = 1,21$ (célula endotelial aorta porcina) - 7 (célula endotelial aorta conejo)

$D_q = 3$ Gy.

En todos los casos la radiosensibilidad medida por D_0 fue mayor para las células endoteliales que para los miocitos y células de la adventicia de los mismos vasos, cultivadas en condiciones semejantes⁶⁵.

El efecto en las distintas células fue no sólo dosis dependiente sino también dosis-grado-dependiente²²²

1.2.4 CRONOLOGIA

La pérdida del árbol vascular en conjunto se inicia, para los pequeños y medianos vasos, unos días después de la irradiación, de manera lenta y progresiva, con variación de un órgano a otro: En el pulmón aparece tan rápido como un día después de una dosis

simple de 20Gys en el hemitorax de la rata y puede detectarse en ratones a las pocas horas.

A los tres meses ha desaparecido el 50% de los microvasos y no se alcanza el 100% hasta el séptimo mes. Para los vasos de mayor calibre (más de 16 μ m) la latencia es bastante mayor; Al tercer mes apenas han disminuido, lo hacen a partir de entonces y hasta los nueve meses ¹²⁴.

En sistemas vasculares simples la pérdida de células endoteliales tras la irradiación es bastante precoz. El marco radiobiológico vendría dado por la destrucción temprana de una pequeña fracción de células endoteliales de ciclo celular corto y con Alfa/Beta alto, a diferencia del resto de componente endotelial ¹²⁴. La pérdida de células musculares y otros elementos del vaso presenta una latencia mayor.

1.3. EL EFECTO DE LECHO TUMORAL (TUMOR BED EFFECT O "T.B.E")

El concepto TBE se ha utilizado para describir bien el retraso en el crecimiento que experimenta un tumor implantado en un lecho irradiado ^{14,25,172} o desde un punto de vista más amplio el conjunto de cambios observables en estas circunstancias ^{176,262}. Aunque se han intentado reproducir con otros agentes lesivos como hipertermia o quimioterapia, los resultados han sido negativos y por consiguiente este efecto lecho puede considerarse sinónimo de efecto lecho irradiado ^{25,140}.

La experimentación sobre TBE se ha realizado a través de inoculaciones directas de tumor en territorios irradiados ^{147,183,232,248-251} o, en estudios clínicos, por observación de la evolución de recidivas en lecho irradiado.

Fue descrito por primera vez por Stenstrom y col en 1955 aunque se señalan como pioneros los trabajos realizados por Frank y Kinball en 1914 y podemos considerar también los de Merwing y col. Ha sido objeto de posteriores investigaciones para describir el fenómeno: Summer²⁵¹ Clifton³⁴ Hewitt and Blake¹¹⁷ Urano y Suit²⁵⁹, y otros orientados a considerar los posibles mecanismos implicados^{15,117,135,175,251,257,259}.

Se considera como el mecanismo principal de TBE la reducida capacidad del estroma para vascularizar al tumor^{135, 251}; así, Van der Brenk y col²⁶¹ encontraron que la formación de yemas capilares en el lecho tumoral en respuesta al implante de células tumorales fue inhibida considerablemente por la irradiación previa del lecho, pudiendo reducir hasta en un 50% el flujo al tumor que crece en lecho irradiado.

Es generalmente aceptado que el fenómeno TBE es por expresión de tejidos de respuesta tardía, básicamente de proliferación lenta (p.e. el endotelio vascular); sin embargo una análisis usando el modelo lineal cuadrático muestra que el cociente Alfa/Beta es igual a 6.2, valor que está en el límite para valores alfa/beta de tejido de respuesta aguda.

1.3.1. COMPORTAMIENTO DE UN TUMOR EN LECHO IRRADIADO

Un tumor creciendo sobre lecho irradiado lo hace más lentamente que sobre lecho normal, este retraso en el crecimiento va acompañado de una disminución en el aporte vascular del lecho irradiado a las exigencias de la neoplasia en crecimiento^{135,155}

Asimismo utilizando como parámetro cuantificable la TD50 (número de células tumorales necesarias para conseguir trasplante tumoral viable en el 50% de los animales inoculados), las observaciones muestran que, aunque retrasada en el tiempo la apari-

ción del tumor, los valores finales de TD50 son siempre menores en lecho irradiado.

6,176,262

Otro aspecto descrito es que un tumor creciendo sobre lecho irradiado da más metástasis ^{173,176,262}, dato más discutible ya que los trabajos al respecto señalan que a igualdad de tamaño del tumor, el que ha crecido sobre lecho irradiado ha dado mayor número de metástasis que el que lo ha hecho sobre lecho control, sin embargo hay que señalar que el intervalo temporal en el primer caso es mayor (dado que sufre retraso en el crecimiento necesita más tiempo para alcanzar el mismo tamaño que el control) con lo que existe una nueva variable no bien cuantificada, que puede tener influencia en la aparición de metástasis; asimismo señalar que las condiciones de crecimiento en lecho irradiado pueden seleccionar un determinado fenotipo celular con capacidad de crecimiento en condiciones de hipoxia y quizás de dar mayor número de metástasis.

Un cuarto hallazgo es que responden peor al tratamiento radiológico o citostático. Como se ha comentado, el crecimiento neoplásico sobre lecho irradiado es sobre un lecho con peor vascularización, donde existe mayor grado de necrosis y el pH y la presión parcial de oxígeno son menores, el grado de hipoxia es mayor, por todo ello la probabilidad de que los clones celulares que son capaces de crecer en condiciones “tan adversas” respondan a los tratamientos citostáticos o radiológicos se ve seriamente comprometida ^{130,172}.

1.3.2 ELEMENTOS MODIFICADORES DEL TBE

La presencia o intensidad del Tumor Bed Effect puede verse afectada por diversos factores entre los que podemos señalar:

1.3.2.1. *Dosis*

El efecto TBE es dosis-dependiente ¹⁷². Las curvas dosis-respuesta para TBE presentan una forma sigmoidea ²⁸. El efecto se manifiesta tímidamente cuando el lecho ha recibido valores de dosis que oscilan entre los 5 y los 10 Gy, a partir de ahí aumenta de manera abrupta hasta una dosis de 20-30 Gy, en donde se establece un “plateau” que se mantiene hasta dosis de al menos 60 Gy ¹⁷⁴. La forma de la curva puede variar dependiendo de otros factores, pero sobre todo del parámetro utilizado para su cuantificación ²⁵: tasa de crecimiento del tumor, tiempo invertido en alcanzar un determinado tamaño...

1.3.2.2 *Tiempo*

De los estudios experimentales puede extraerse que las alteraciones biológicas responsables del TBE son sólo temporales. Si el intervalo irradiación-inoculación excede los 200 días, los parámetros receptividad y producción de metástasis son indistintos al grupo control; en tanto que el retraso en el crecimiento se mantiene modestamente. La alteración suele ser mayor para todos los parámetros cuanto menor es el intervalo citado.

1.3.2.3 *Estirpe tumoral*

Si la lesión radioinducida sobre el estroma fuese la única causa que afectara al TBE, este fenómeno sería independiente del tipo tumoral. Experiencias previas ¹⁷² han demostrado que aspectos como el retraso en el crecimiento o el tiempo potencial de doblaje podían afectarse no sólo por la existencia de células irradiadas a altas dosis, sino también por el tipo de células irradiadas; así podemos encontrar que carcinomas mamarios presentan mayor TBE que los fibrosarcomas. Las razones para ello no son bien conocidas, pero algunas pueden estar relacionadas con la capacidad angiogénica de las células tumorales ¹⁷²

1.3.2.4 *Fraccionamiento*

Trott y Kummermehr han mostrado que para el adenocarcinoma 284 el fraccionamiento afectaba al TBE (p.e mayor recuperación con dosis.split) Otras experiencias han ido dirigidas a evaluar la importancia del fraccionamiento en condiciones de mayor o menor hipoxia (existe un mayor efecto del fraccionamiento en tumores oxigenados y en la ausencia de reoxigenación, la conclusión fue que las células aeróbicas se recuperaban más que las hipóxicas).

1.3.2.5 *Hipoxia*

En condiciones normales el tejido responsable del TBE se encuentra bien oxigenado, si cambiamos las condiciones a hipóxicas en el momento de la radiación, se produciría una marcada reducción del fenómeno TBE, con mayor repercusión sobre el estroma que sobre las células tumorales.

1.3.2.6 Radiosensibilizantes

El oxígeno y los nitroimidazoles son potentes radiosensibilizantes incluso con bajas dosis por fracción. Sin embargo no influyen sobre TBE

1.3.2.7 Radioprotectores

Se ha descrito radioprotección del TBE con aminotiol WR-2721.

1.3.3 EVOLUCION DE LA PERSISTENCIA TUMORAL, RECIDIVA O METASTASIS SOBRE LECHO IRRADIADO.

La Radioterapia es una de las armas más efectivas en el tratamiento curativo o paliativo de la enfermedad neoplásica; el resultado final puede ser la eliminación total o parcial del tejido tumoral quedando el lecho irradiado con o sin tumor viable. La persistencia neoplásica o posterior recidiva en lecho irradiado experimenta una evolución característica que no ha pasado desapercibida para los clínicos e investigadores; fruto de ello se han realizado numerosos trabajos, algunos con conclusiones muy discutidas.

1.3.3.1 Estudios Clínicos

El análisis de la evolución de un tumor creciendo en lecho irradiado- bien por persistencia, recidiva o metástasis- y no subsidiario de rescate quirúrgico, es la única vía ética de obtener información al respecto. Señalar que la relevancia clínica del TBE no está clara, ya que es innecesario recurrir a dicho fenómeno para explicar la radiocurabi-

lidad de los tumores humanos y es improbable que la absoluta posibilidad de recidiva fuese modificada por dicho efecto.

Rosving ²²⁹ en 1919 apuntó la posibilidad de que la utilización de la radioterapia en pacientes con carcinoma mamario se relacionara con un aumento en el número de metástasis. Su trabajo motivó la realización de numerosos estudios; unos confirmaban su teoría, otros obtenían conclusiones distintas: así los datos obtenidos por Easson y Fisher indicaban que el tratamiento convencional radiológico postoperatorio podía aumentar el número de metástasis a distancia; Host and Brennhove ¹²⁶ compararon pacientes en Estadio II de mama que siguieron tratamiento exclusivo vs cirugía más radioterapia encontrando que la irradiación disminuía la incidencia de la recidiva local, pero encontraron mayor número de metástasis en pacientes irradiadas, similares resultados han sido reportados por Biller ¹⁶ Roswitt ²³⁰ y Dao ⁴². La publicación de los resultados obtenidos por Dao y Kovaric ⁴³, que encontraban mayor incidencia de metástasis cutáneas y pulmonares ipsilaterales en pacientes que habían recibido radioterapia torácica tras mastectomía, respecto a las que recibieron tratamiento quirúrgico exclusivo, ha sido muy criticado por otros autores porque la muestra parecía sesgada a favor del grupo quirúrgico y por las inaceptables complicaciones secundarias a la radioterapia ²⁰⁹.

En otros casos los resultados señalaban el beneficio terapéutico tanto en irradiación preoperatoria como postoperatoria: Krebs ¹⁴⁷; Chu y col ³¹ utilizando técnicas de irradiación similares a las descritas por Dao y Kovaric observaron una mayor supervivencia a los 5 años en pacientes con axila apical positiva que recibieron radioterapia postoperatoria frente al grupo que no la recibió. Series semejantes publicadas con posterioridad confirman este resultado, así la radioterapia clínica presenta infinidad de ejem-

plos en los que el paciente sin evidencia de enfermedad es sometido a radiación precisamente con la intención de disminuir el riesgo de aparición de recidiva neoplásica o de metástasis. La justificación de esta práctica y su interpretación en cuanto a eficacia estriba en la eliminación de focos neoplásicos microscópicos.

1.3.3.2. Estudios experimentales

Diversos estudios experimentales han sido realizados con diferentes tipos tumorales con el objeto de obtener información sobre los efectos de la irradiación sobre ciertos parámetros del crecimiento tumoral ²⁵⁵; por la naturaleza de nuestro estudio nos referiremos a los realizados con irradiación del lecho receptor previa al implante del tumor. Se intenta en ellos que la presencia de células neoplásicas en el lecho receptor se produzca con posterioridad al momento de la radiación, realizando el implante de inóculos celulares o trozos de tumor en lecho ya irradiado ^{147,183,232,248-50,263}, o tras inoculación intravascular directa de células neoplásicas ⁴⁴ con aptencia metastásica por el lecho receptor previamente expuesto a las radiaciones.

La importancia del lecho fue reseñada por los estudios de Koike y col ¹⁴⁶ que observaron que tras la administración de 1500 rads al hígado tres días antes de la inoculación intraportal de células ascíticas de Erlich provocaba un aumento del número de tumores hepáticos frente a los animales control. Más recientemente, Dao y Yogo ⁴⁴ encontraron un incremento en el número de metástasis pulmonares tras irradiación pulmonar de ratas de la cepa Sprague-Dawley y posterior inoculación endovenosa de células tumorales mamarias DMBA-inducidas; resultados similares han sido encontrados por nuestro grupo de trabajo tras irradiación pulmonar de ratones de la cepa

C56/BL6 y posterior inoculación endovenosa de células tumorales de melanoma B16²⁰². Sin embargo, otros estudios concluyen con resultados que apuntan a un retraso en el crecimiento tumoral^{147,183,232,248-50,263} el llamado efecto lecho tumoral o TBE .

Otros trabajos experimentales encaminan sus objetivos a aclarar posibles influencias sobre el TBE según: el tipo tumoral^{15,28,174}, intervalo temporal entre irradiación e implante¹⁷⁶ TBE y TD50^{34,259} (número de células tumorales requeridas para asegurar que el 50 % de los animales implantados desarrollan el tumor).

2.OBJETIVOS

- 2.1. Observar si el efecto lecho condiciona variación de la respuesta angiogénica estimulada por un tejido fuertemente inductor como es el tumoral.
- 2.2. Determinar si la irradiación del lecho receptor, del tejido tumoral o bien de ambos, produce diferencias en el grado de crecimiento del melanoma implantado.
- 2.3. Comprobar si se producen diferencias en el crecimiento tumoral si dejamos pasar un intervalo temporal entre la irradiación del lecho, del tumor o de ambos y el implante.
- 2.4. Cotejar los resultados obtenidos con fragmentos de un milímetro cúbico de melanoma con su propia matriz y vasos, comparándolos con un modelo de implante de células cultivadas in vitro de melanoma ,sin células endoteliales, ni matriz.

3. MATERIAL Y METODO

3.1 DISEÑO GENERAL

Con la finalidad de alcanzar los objetivos descritos, hemos utilizado como animal de experimentación la cepa de ratones de la cepa C57BL/6, cepa de referencia en el campo de la investigación experimental en oncología ^{112,128,203}, como agente lesivo las radiaciones ionizantes y como modelo experimental el melanoma murino B16 variedad F10 por su reconocida capacidad angiogénica y metastásica. ^{62,69,70,145,189,190}

Inicialmente realizamos implante bien de un milímetro cúbico de melanoma, tanto como tumor sólido con su estroma, bien células de melanoma cultivadas in vitro y en número equivalente a la muestra de tumor sólido y obtenidas de la muestra parental, consignándolos como serie control en ambos casos. Tras dejar a los animales evolucionar en un rango entre 7 y 35 días tras implante y analizar los resultados, establecimos que el intervalo óptimo hasta el sacrificio fue de catorce días, fecha en la que el tumor alcanzaba entre 1,5 y 2 centímetros cúbicos, a menor intervalo y tamaño tumoral no se apreciaron metástasis a distancia y a mayor intervalo temporal muchos animales fallecían por el crecimiento tumoral y metástasis.

Al realizar la necropsia de los animales procedimos a la recogida de datos encontrados como: las dimensiones del tumor alcanzadas, existencia de metástasis linfáticas y/o hematógenas, signos de neovascularización en el lecho tumoral, consignándolos en la hoja de recogida de datos establecida al efecto (Anexos 1 y 2)

Una vez obtenidos estos datos en las series control, establecimos diferentes grupos experimentales basados: en el tipo de elemento irradiado (lecho ó tumor), en el intervalo entre irradiación e implante (inferior a 24 horas o una semana) o en el tipo de implante tumoral utilizado (tumor sólido o suspensión celular); obteniendo un total de

quince series (2 series control, 12 series experimentales y una especial de larga duración), cada una de las series con diez animales. A los catorce días tras el implante tumoral se procedía al sacrificio de los ratones y a la recogida de datos para su posterior análisis, recogiendo los datos de las dimensiones tumorales alcanzadas para el estudio estadístico así como muestras para su estudio microscópico

3.2 ANIMAL DE EXPERIMENTACIÓN:

Hemos utilizado la cepa consanguínea de ratones C57 BL/6, desarrollada por Little en 1921 después de cruzar la hembra número 57 con el macho número 52. Fue introducida en el Jackson Laboratory en 1948 (generación F-22) y posteriormente en la empresa IFFA CREDO en 1981 (generación F-140), de donde fueron obtenidos para este experimento.

Se utilizaron un total de 214 animales (Anexo 3), de los que 140 fueron valorables para el análisis estadístico, diez por cada una de las doce series experimentales y cada una de las dos series control. De los 74 animales restantes no incluidos en el estudio estadístico 13 fallecieron por problemas durante la intervención, en 31 animales se comprobó en el recuento celular previo al implante que el número de células viables era muy escaso, por lo que se repitieron; 11 animales no fueron sacrificados el día catorce tras implante, aunque se procedió a realizar el mismo proceso de sacrificio, recogida de datos y necropsia que nos posibilitaran analizar aspectos relativos a la evolución tumoral tanto a nivel del lecho como a distancia, a distintos intervalos temporales (sus resul-

tados serán analizados aparte); finalmente en los 19 animales restantes no se cumplió el plazo entre irradiación e implante por lo que se utilizaron para realizar control fotográfico de la evolución del lecho irradiado.

3.2.1 CARACTERISTICAS DE LOS RATONES C57 BL/6

Pelaje y ojos negros. Extremidades finas. Talla bastante pequeña. Se reproducen fácilmente. Poseen notable motricidad y son capaces de preservar un ritmo circadiano. Ciertos animales pueden presentar alopecia parcial.

Supone un buen modelo experimental para estudios de toxicología y farmacología, experimentación infecciosa¹³⁹, inmunología¹²⁷ y gerontología. En el terreno de la Oncología su uso es frecuente, tanto por la posibilidad de estudio de tumores inducidos (tumores subcutáneos por 3-metil-colantreno (Kouri, 1973); tumores cutáneos tras exposición a DMBA (Thomas, 1973); linfomas por administración oral de colantreno (Akamatsu,1974)) como para la investigación con cepas tumorales trasplantables (adenocarcinoma mamario BW 10232, Leucemia mieloide C 1498, carcinoma de células prepucciales ESR 586)^{112,128}, siendo muy habitual su utilización como modelo experimental con la línea de melanoma B16. Elegido con frecuencia como animal de estudios con radiaciones ionizantes^{112,128,203}

3.2.2. CRITERIOS DE INCLUSION

3.2.2.1. Sexo:

Los animales elegidos para el estudio han sido todos machos, para evitar posibles alteraciones debidas a factores hormonales ^{19,60,239}. Para el mantenimiento de la línea celular “in vivo” subcutánea, se usaron hembras sin limitación de edad.

3.2.2.2. Edad:

La edad de los animales al inicio del experimento osciló entre las ocho y diez semanas. El animal ha completado su desarrollo y está cerca de su máximo peso, que alcanza en la undécima semana ¹²⁸.

3.2.2.3. Peso:

Se realizó control pondera de los animales con báscula de precisión Mettler PM 2000^R (GERM WEBER, S.A.), siempre antes de la inducción anestésica. Del total de 214 animales incluidos a estudio el rango del peso en gramos osciló entre 22,6 y 28 gramos, siendo la media global de 24,5 gramos.

3.2.3. MANTENIMIENTO Y CUIDADOS

La administración de agua y comida fue según demanda y la temperatura ambiente osciló entre 24 +/- 2 grados centígrados. En cada jaula se colocó un solo animal, lo que permitió un mejor control de su evolución. Tanto la comida de los animales como la viruta de madera especialmente tratada para su uso en laboratorios de experimenta-

ción animal fueron suministradas por Letica S.A.

Durante el periodo experimental los animales se mantuvieron en jaulas tipo 500 de Macrolón con rejas apilables de acero inoxidable (22 x 22 x 14,5 cm), superficie basal de 500 cm². Cada jaula fue identificada con los siguientes datos: Departamento que lleva a cabo el estudio, cepa de animales, fecha de inicio del experimento, serie de estudio, número asignado, fecha prevista de sacrificio del animal. Todos los animales en estudio sometidos a ciclos de luz y oscuridad de 12 horas. Se mantuvieron libres de parásitos.

La normativa de “Líneas Directrices Relativas al Alojamiento y al Cuidado de los Animales Del Consejo de las Comunidades Europeas”³⁷ se cumplió para los apartados de superficie por animal, ventilación, temperatura, humedad, iluminación, ruidos, sistemas de alarma y sacrificio.

3.2.4. PROCEDIMIENTOS ANESTESICOS

Para la irradiación, implante y necropsia, se procedió a inducción anestésica de los animales por medio de inyección intraperitoneal, a distintas dosis según el momento experimental.

3.2.4.1. *Para realizar la irradiación e implante:*

Anestesia superficial mediante aplicación intraperitoneal con:

ketamina + clorbutol: 0,07mgr/gr de peso (Imalgene ® Lab). (Rhône Merieux)

+

tiazina: 0,01 mg/gr. de peso (Rompún ® Lab). Bayer)

3.2.4.2. *Previo a la necropsia.*

Anestesia profunda mediante la aplicación intraperitoneal con:

ketamina +clorbutol: 0,14 mgr/gr de peso (Imalgene ®Lab.Rhône Merieux)

+

tiazina:0,02 mgr/peso (Rompun ®Lab. Bayer)

3.3 SERIES EXPERIMENTALES:

Se establecieron un total de 14 grupos de estudio, con diez animales en cada uno de los grupos, repartidos de la siguiente forma: un grupo control de implante de tumor sólido, un grupo control de implante de suspensión celular, 6 grupos experimentales con tumor sólido y seis grupos con implante de suspensión celular, que fueron asignados de la siguiente manera:

3.3.1. GRUPOS SEGÚN TIPO DE IMPLANTE TUMORAL

Si el implante era de tumor sólido correspondía a los grupos I a III

Si el implante era de suspensión celular correspondía a los grupos IV a VI

3.3.2. GRUPOS SEGÚN INTERVALO IRRADIACIÓN E IMPLANTE

Si el intervalo entre irradiación e implante era inferior a 24 horas se indicaba como A.

Si el intervalo entre irradiación e implante era de siete días se indicaba con la letra B.

3.3.3. GRUPOS SEGÚN ELEMENTO IRRADIADO

Si se realizaba irradiación del lecho se indicaba como grupo I ó IV

Si se realizaba irradiación exclusiva del implante como grupo II ó V

Si se realizaba irradiación de ambos como grupo III ó VI

3.3.4 GRUPOS CONTROL

Se realizó un grupo control de implante tumoral sólido y otro de inóculo de suspensión celular. No se realizó irradiación ni de implante, ni de lecho. De ellos se obtuvieron datos como el volumen tumoral alcanzado a los 14 días, la existencia de ganglios afectados o metástasis hematógenas.

3.3.5 GRUPO ESPECIAL DE SEGUIMIENTO SOBRE LECHO IRRADIADO

Se destinaron diez animales para evaluar el comportamiento del melanoma creciendo sobre lecho irradiado, con un intervalo entre implante y sacrificio que osciló entre 21 y 28 días. Este grupo será analizado únicamente en el epígrafe de Efecto lecho tumoral.

ESQUEMA RESUMEN DE LAS SERIES

SERIES	DOSIS (Gy)		INTERVALO RT-IMPLANTE		MODELO TUMORAL	
	LECHO	TUMOR	< 24 HORAS	7 DIAS	SÓLIDO	SUSPENSIÓN
CONTROL T.S.*	0	0	SÍ	
CONTROL S. C.*	0	0		SÍ
IA	80	0	SÍ		SÍ	
IB	80	0		SÍ	SÍ	
IIA	0	80	SÍ		SÍ	
IIB	0	80		SÍ	SÍ	
IIIA	80	80	SÍ		SÍ	
IIIB	80	80		SÍ	SÍ	
IVA	80	0	SÍ			SÍ
IVB	80	0		SÍ		SÍ
VA	0	80	SI			SÍ
VB	0	80		SÍ		SÍ
VIA	80	80	SÍ			SÍ
VIB	80	80		SÍ		SÍ

- C.T.S. EQUIVALE A SERIE CONTROL DE TUMOR SÓLIDO
- C.S.C.EQUIVALE A SERIE CONTROL DE SUSPENSIÓN CELULAR

3.3.6. RELACION DE LAS SERIES EXPERIMENTALES

GRUPO CONTROL TUMOR SOLIDO: Implante de tumor sólido en lecho no irradiado.

GRUPO I: Irradiación del lecho receptor e implante de tumor sólido no irradiado.

SUBGRUPO IA: El intervalo entre la irradiación del lecho e implante fue inferior a 24 horas.

SUBGRUPO IB: El intervalo entre la irradiación del lecho e implante fue de siete días

GRUPO II: Irradiación de tumor sólido e implante en lecho no irradiado.

SUBGRUPO IIA: El intervalo entre la irradiación del tumor sólido y el implante en lecho no irradiado fue inferior a 24 horas.

SUBGRUPO IIB: El intervalo entre la irradiación del tumor sólido y su implante en lecho no irradiado fue de siete días

GRUPO III: Irradiación tanto del lecho como del implante de tumor sólido

SUBGRUPO IIIA: El intervalo entre la irradiación del lecho y el implante de tumor sólido irradiado fue inferior a 24 horas

SUBGRUPO IIIB: El intervalo entre la irradiación del lecho y el implante de tumor sólido irradiado fue de siete días.

GRUPO CONTROL SUSPENSION: Implante de suspensión celular en lecho no irradiado

GRUPO IV: Irradiación del lecho receptor e implante de suspensión celular tumoral no irradiada

SUBGRUPO IVA: El intervalo entre irradiación del lecho y el implante de la suspensión celular no irradiada fue inferior a 24 horas.

SUBGRUPO IVB: El intervalo entre irradiación del lecho receptor y el implante de suspensión de melanoma no irradiada fue de siete días.

GRUPO V: Irradiación de suspensión celular de melanoma e implante en lecho no irradiado.

SUBGRUPO VA: El intervalo entre irradiación de la suspensión celular y su implante en lecho no irradiado fue inferior a 24 horas.

SUBGRUPO VB: El intervalo entre irradiación de la suspensión celular y su implante en lecho no irradiado fue de siete días

GRUPO VI: Irradiación tanto del lecho receptor como de la suspensión celular de melanoma:

SUBGRUPO VIA: El intervalo entre la irradiación del lecho receptor y el implante de suspensión celular de melanoma fue inferior a 24 horas.

SUBGRUPO VIB: El intervalo entre la irradiación del lecho receptor y el implante de la suspensión celular de melanoma irradiada fue de 7 días.

GRUPO ESPECIAL DE SEGUIMIENTO SOBRE LECHO IRRADIADO

En esta serie el intervalo entre implante sobre lecho irradiado y el sacrificio fue Superior a catorce días.

Cada procedimiento de irradiación, implante y necropsia, con su fecha, número de estudio y grupo se registró:

- 1) En la etiqueta de la jaula identificada con el número de Grupo y animal de estudio
- 2) En la hoja de recogida de datos confeccionada al efecto: (Anexos 1 y 2)
- 3) En el libro del Laboratorio
- 4) En el libro de Anatomía Patológica, consignando el número de Grupo y animal de estudio.
- 5) En la hoja de recogida de datos macroscópicos y microscópicos cuando se realizaba la necropsia. (Anexo 2)

3.4 MODELO TUMORAL

Se ha utilizado la línea celular maligna para estudios “in vivo” e “in vitro” de Melanoma B16-F10. La línea parental fue aislada a partir de la aparición espontánea de un melanoma en la base de la oreja de un ratón de la cepa C57BL/6 (utilizada en nuestro estudio), aislada por el Jackson Laboratory ^{189,203}.

La línea parental de Melanoma B16 es transplantable dentro de la cepa singénica por inyección subcutánea, fácil de mantener en cultivo ¹⁹⁰ y presenta en su línea original una marcada capacidad angiogénica ¹⁴⁸ y metastásica.

De la línea parenteral original se han ido separando una serie de variantes, cada una de las cuales destaca por un comportamiento característico: B16-BL6 (altamente metastásico); B16-F1 (pobremente metastásico); B16_a (amelanótico, metástasis espontáneas); B16-F10 (especificidad y rendimiento en metástasis pulmonares); B16-010 (metástasis ováricas) ó B16-PA4M (metástasis ganglionares) ^{203,239,148}.

La variante utilizada en nuestro estudio por su reconocida capacidad angiogénica y metastásica ^{62,69,70,145,189,190} ha sido la de Melanoma B16-F10, aislada por Fidler en 1971 ³⁰⁵ y obtenida por nuestro Departamento a través del Frederick Cancer Research .

3.4.1 MANTENIMIENTO DE LA LINEA CELULAR

Para su disponibilidad las células de melanoma se mantiene en el Laboratorio de Radiología y Medicina Física de tres formas:

3.4.1.1 Criopreservación

De la población parenteral recibida (tres millones de células de melanoma B16/F10) separamos la mitad para iniciar el experimento o destinarlas a reservorio tanto “in vivo” como “in vitro”; La otra mitad fue dividida en seis viales (cada uno con 250.000 células) y tras su tratamiento con agentes crioprotectores, realizamos la inmersión en Nitrógeno líquido a -196°C de los mismos, con el objeto de tener una reserva de la cepa recibida. Dicha población parenteral fue convenientemente etiquetada y ano-

tados los datos en el libro del Laboratorio con fecha 16 de Febrero de 1994.

3.4.1.2. “*In vivo*”

Una segunda vía se obtuvo inicialmente tras la inyección subcutánea de células de melanoma en el flanco derecho de ratones hembras destinadas a este fin. La elección de este punto anatómico estuvo basada en la distensibilidad cutánea que permite el crecimiento de nódulos solitarios, homogéneos y de fácil acceso.

Entre los días siete y catorce el tumor alcanza un tamaño entre 1,5 y 2 centímetros. La elección del tamaño tumoral indicado se estableció sobre la base de que a mayor tamaño encontrábamos grandes zonas necróticas intratumorales y algunos animales fallecían encontrándose en la necropsia frecuentemente metástasis linfáticas y preferentemente metástasis pulmonares.

El procedimiento de extracción tumoral es el siguiente: se procede a aplicar una dosis supraletal de anestésico vía intraperitoneal (apartado 2.2.3.2.), a continuación se realiza la sujeción del animal para facilitar el manejo operatorio. La zona de acceso, fácilmente delimitada por palpación del nódulo tumoral, es rasurada y tratada con una solución de Povidona Yodada al 10 % (Betadine ®); se realiza una incisión amplia y se extrae el nódulo tumoral en condiciones estériles. Colocamos el material obtenido en una placa de Petri y se fragmenta, desechando las zonas necróticas y lavándose con suero fisiológico. Los fragmentos de aproximadamente un milímetro cúbico, pasan a otra placa donde reciben un nuevo lavado con fisiológico y una solución antibiótica (Anfotericina B: 200µg/ml; Penicilina: 10000 U/ml; Estreptomina: 10000 µg/ml).

Estas fracciones de melanoma (figura 1) pueden implantarse tal cual en nuevos

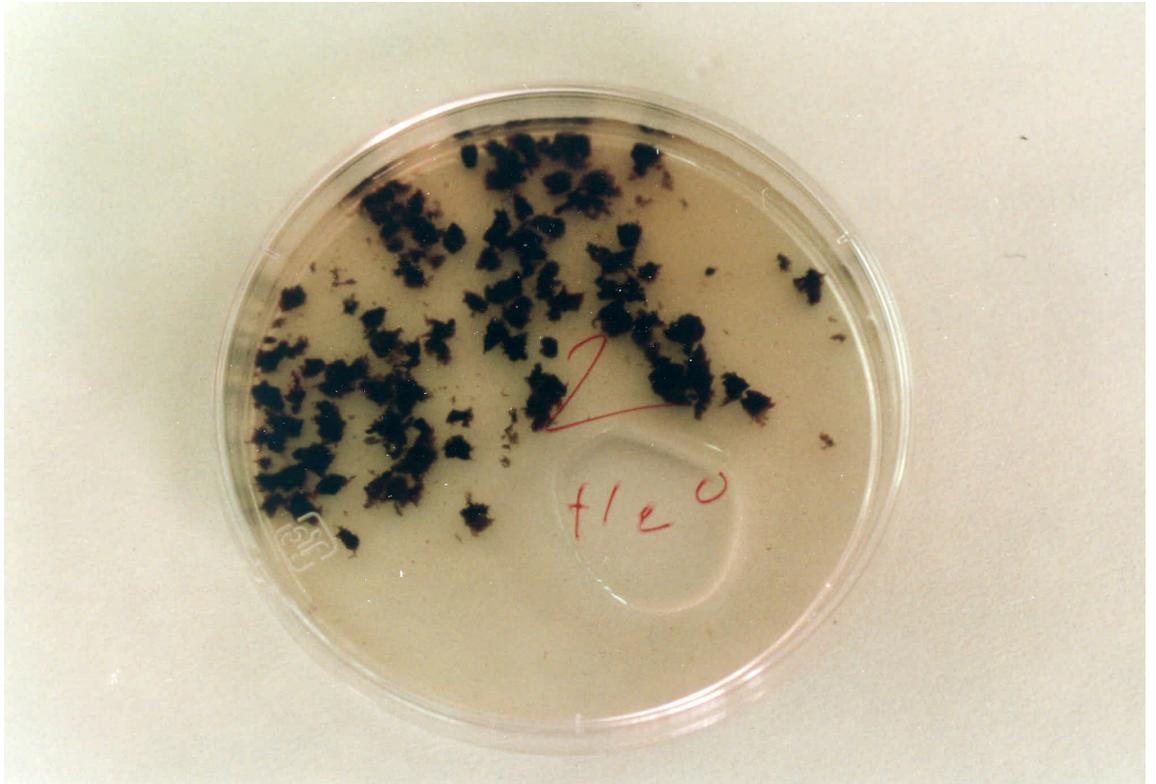


Figura 1: Fragmentos milimétricos de melanoma dispuestos en una placa Petri

ratores hembras, colocándose subcutáneamente a través de una pequeña incisión y colocando el fragmento tumoral en la zona ya señalada, actuando como animales reservorio. Se procede a repetir la operación transcurridos entre siete y catorce días o tras alcanzar un tamaño entre 1,5 y 2 centímetros.

Asimismo las fracciones de melanoma obtenidas pueden utilizarse por disgregación para promover cultivo (ver apartado 3.4.1.3.)

Cuando el objetivo fue el de servir de soporte al tumor irradiado para las series IIB y IIIB, el fragmento tumoral se colocaba en la pata posterior derecha del animal a nivel subcutáneo y distal, de tal forma que el nódulo tumoral pudiese ser irradiado utilizando el dispositivo plomado; lo que nos permitiría proteger el resto del animal, que debía servirnos de reservorio viable durante siete días, hasta la extracción del fragmento tumoral irradiado para su posterior utilización en los subgrupos IIB y IIIB.

3.4.1.3 "In vitro"

Las células de melanoma se mantienen en cultivo monocapa albergadas en frascos tipo Falcon, suministrados por Bibby Cultures, de 25 centímetros cuadrados de superficie basal (figura 2).

El medio de cultivo consiste en una mezcla de Minimal Essential Medium (MEM) con solución salina balanceada de Hank (HBSS), libres de Calcio y Magnesio, suplementada con un 10 % de suero bovino fetal. Los frascos permanecen en incubadora modelo Yamato IT62 de la casa HTEC, a 37 ° C, en un ambiente humidificado compuesto de 95% de aire atmosférico y 5% de anhídrido carbónico.

El cambio de medio se realiza cada tres días y subcultivos cada seis o cuando las



Figura 2: Crecimiento en cultivo en frascos tipo Falcon de suspensión celular de melanoma irradiado. Obsérvese la disposición “en colonias” obtenidas tras irradiación de la suspensión.

células llegan a la confluencia. Para subcultivar se desprenden las células de la pared basal del frasco por medio de tripsina EDTA fría y, previa dilución, se siembran en nuevos frascos con medio de cultivo. La subcultivación nunca se realiza en más de cinco ocasiones a partir de un medio primitivo, ya que están descritas degeneraciones fenotípicas; por ello los cultivos han de ser renovados con células provenientes de tumor “in vivo”. Para ello se parte de los pequeños fragmentos de tumor obtenidos de los animales reservorio (2.4.1.2), son sometidos a un nuevo lavado con una mezcla de MEM y la solución antibiótica de Penicilina, Anfotericina B y Estreptomicina. A continuación se procede a convertir los acúmulos en entidades celulares simples por disgregación química, incubando en Tripsina al 0,1%. El resultante se somete a centrifugación a 200 rpm durante tres minutos, se desecha el sobrenadante, identificándose las células tumorales como un pequeño acúmulo negro en el fondo del tubo. Esta se diluye en medio de cultivo por agitación vigorosa, se pasa a los frascos y por fin a la incubadora.

Señalar que las células de los medios de cultivo son aptas para obtener tumor subcutáneo, para ello deben ser inyectadas a nivel subcutáneo de los ratones hembras destinados al papel de reservorio del tumor fuente, con tal de que se inyecten más de 10000 células.

El acúmulo tumoral resultante de la centrifugación puede también destinarse a reservorio por congelación en Nitrógeno líquido. Para ello hay que añadirle ácido épsilon-amino-caproico, para evitar el daño celular por la formación de espículas de hielo, procediéndose después a su criopreservación, anotando en el libro del laboratorio el lugar de su colocación y la fecha de la misma.

3.5. TECNICA DE IRRADIACIÓN

3.5.1. APARATO

El aparato utilizado para el experimento ha sido la Unidad de Telecobaltoterapia del Servicio de Radioterapia del Hospital Universitario de Canarias (Gammatron 3 de la casa Siemens) entre Febrero de 1994 y Diciembre de 1995 y posteriormente tras el cambio de Unidad a finales de 1995 se utilizó de la marca Theratron Phoenix.

Una vez realizada dicha sustitución, continuamos el estudio experimental, manteniéndose las condiciones del mismo y realizándose los controles dosimétricos para comprobar que se mantenían las condiciones previas en cuanto a homogeneidad de la dosis prescrita.

Se eligió la utilización de una fracción única de 80 Gy basándonos en experiencias previas de nuestro grupo de trabajo ²²⁶ que demostraron que con dicho esquema se inhibía la migración y/o proliferación de los elementos del tejido conectivo afecto, dato que nos permitía estudiar la respuesta tumoral tras implante en un ambiente tan hostil.

3.5.2. ISODOSIS Y TIEMPO DE EXPOSICIÓN

Se eligió la isodosis del 100% a partir de la curva de rendimiento en profundidad de un haz directo de fotones gamma de Cobalto-60 de diez por diez centímetros y teniendo como referencia la profundidad a la que considerábamos el lecho receptor (zona circundante al nervio ciático), que oscilaba entre 0,9 y 1,1 centímetros.

Elegimos la misma isodosis cuando realizamos la irradiación de los animales

con tumor, para las series IIB y IIIB, cubriendo la pata del animal con gasas húmedas y considerando en este caso como volumen blanco la pastilla tumoral.

Aceptamos también la misma isodosis cuando realizamos la irradiación de los cultivos celulares en los Frascos tipo Falcon, colocando la cara dónde se encontraban las células lo más alejada al haz de irradiación, de tal forma que entre las gasas húmedas colocadas y la cara anterior del frasco se evitaba que el efecto “build up” provocase una infradosificación al volumen blanco: “la suspensión celular”, procedimos de la misma forma cuando irradiamos tumor sólido en los Petri para las series IIA y IIIA.

Al inicio del experimento (Febrero de 1994) la fuente de Cobalto 60 presentaba una actividad de 53 Tbq y una tasa de dosis de 0,74 Gy/minuto, a 60 centímetros para un campo de diez por diez centímetros en Diciembre de 1996 en el momento de retirar la unidad antigua la actividad de la fuente era de 42 Tbq y la tasa de dosis de 0,58 Gy/minuto. Con estos datos, para alcanzar una dosis lecho de 80 Gy a la isodosis del 100% y con un campo de diez por diez, el tiempo de irradiación fluctuó entre 108 y 135 minutos.

Tras el cambio de la Unidad de Telecobaltoterapia y por lo tanto de la fuente de Cobalto-60 el tiempo de irradiación para alcanzar 80 Gy osciló entre 52,3 y 58,5 minutos. En Enero de 1996 la nueva fuente tenía una actividad de 218,6 Tbq y la tasa de dosis era de 1,53 Gy/minuto a la distancia de 80 centímetros y para un campo de diez por diez centímetros y en Febrero de 1997 la actividad era de 191,4611 Tbq y tasa de dosis de 1,37 Gy/minuto.

3.5.3 PROCEDIMIENTO DE IRRADIACIÓN

Variaba según se realizase irradiación del lecho receptor, del cultivo celular o del tumor sólido.

3.5.3.1 Del lecho receptor

El área elegida para estudio fue la pata posterior derecha del ratón, con el animal en posición prona; diseñándose un blindaje plomado al efecto de proteger el resto del ratón del efecto lesivo de las radiaciones ionizantes. Para la obtención del molde definitivo- realizado en la unidad de Radiobiología perteneciente al Departamento de Medicina Física y Farmacología de la Facultad de Medicina de la Laguna- se procedió inicialmente al sacrificio de un ratón de la cepa elegida para el estudio experimental, con una dosis supraletal de anestésico y tras su colocación en posición de tratamiento- con la pata posterior derecha extendida y el animal en decúbito prono (ver figura 3), obtuvimos un negativo en silicona; el siguiente paso fue la obtención a raíz del molde de silicona de un positivo en yeso, que una vez seco nos permitió obtener el molde en plomo; para ello calentamos el plomo hasta su fusión, y posteriormente realizamos el vertido sobre el molde de yeso confeccionado, al enfriarse el plomo y retirar el molde en yeso obtuvo una carcasa plomada de 12 cm de largo por 5 cm de ancho y 7,5 cm de alto, siendo el espesor de la protección en la zona más fina de 5 cm y de 8 cm en la parte más gruesa. La colocación del ratón se podía realizar con comodidad.

Señalar que en dicho blindaje se practicaron una abertura frontal de 1 cm de diámetro para permitir la respiración del animal y una abertura lateral derecha, justo dónde la pata posterior derecha del animal quedaba expuesta a las radiaciones ionizantes (figuras 4 y 5).



Figura 3: Contorno del ratón utilizado para la obtención del molde plomado definitivo.



Figura 4: Vista inferior de la carcasa plomada obtenida; obsérvese la abertura que permite la exposición de la pata posterior derecha del animal.



Figura 5: Dermatitis húmeda y depilación del área irradiada (pata posterior derecha del ratón), quedando bien delimitada del resto del animal (foto obtenida a los catorce días tras irradiación)

Se procedía a irradiar un animal en cada ocasión, utilizando siempre el dispositivo plomado confeccionado al efecto.

La dosimetría se realizó con dosímetros TLD, cuya lectura fue llevada a cabo por la Unidad de Protección Radiológica del H.U.C. (apartado 3.5.4.2)

3.5.3.2 Del tumor sólido.

3.5.3.2.1. *Cuando el intervalo entre irradiación e implante era inferior a 24 horas (series A)*

Tras anestesiar al ratón fuente se realiza la extracción de un centímetro cúbico de melanoma, que colocamos en una placa de Petri, y se procede a la irradiación en la Unidad de Cobalto del Servicio de Radioterapia del Hospital Universitario de Canarias.

Al objeto de evitar el “build up” se cubrió con una gasa húmeda la muestra neoplásica. Se administraron 80 Gy en una fracción única, con técnica de un campo directo, distancia foco-objeto de 60 cms ó de 80 cms según la Unidad utilizada y tamaño de campo de 10 por 10 cms. Tasa de dosis que osciló según el momento experimental y ya referida en el apartado 2.5.2.1

3.5.3.2.2 *Cuando el intervalo entre irradiación e implante es de siete días (series B):*

Se realiza la irradiación del animal fuente utilizando el blindaje plomado confeccionado al efecto para evitar una sobreirradiación del animal que debe servirnos durante una semana de soporte viable para el tumor. La técnica de irradiación utilizada fue idéntica a la irradiación del lecho, comprobándose siempre que la pata del animal (con

tumor visible y con un tamaño que osciló entre 1 y 1,5 cms) quedaba enteramente en el campo de radiación, fuera de la protección del blindaje y cubierta con gasas húmedas para evitar el efecto build up.

3.5.3.3 *Del cultivo celular*

Tras colocar los frascos de cultivo tipo Falcon a una distancia foco-objeto de 60 cms o de 80 cms según la Unidad de Telecobaltoterapia utilizada, se administran 80 Gy en fracción única con la oscilación de tasa de dosis entre el principio y final del experimento ya indicados; los frascos de cultivo fueron cubiertos con gasas húmedas para evitar el efecto build up y se utilizó un campo directo centrado en el centro del Falcon.

3.5.4 DOSIMETRIA

Los datos aportados a lo largo de la realización del estudio guardan una homogeneidad que nos asegura la reproducibilidad del experimento y la homogeneidad de la dosis prevista.

3.5.4.1. *Aparato*

El control de la Unidad de Cobalto 60 está protocolizado por el Servicio de Protección Radiológica del Hospital Universitario de Canarias según las recomendaciones del Consejo de Seguridad Nuclear, realizándose operaciones diarias para verificar el buen funcionamiento de la misma; asimismo semanalmente se realiza la comprobación de la homogeneidad y simetría del campo de radiación con una película radiográfica comparando haz de luz – haz de radiación en un campo de 20 x 20 centímetros.

Trimestralmente se realiza la calibración en cuba de agua de la Unidad de Cobalto 60, las medidas se realizan con la cámara cilíndrica de ionización de la casa PTW modelo 233641 de 0,3 c.c. El electrómetro digital PTW con la fuente de alimentación en + 300 v, y el potenciómetro 4.9, switch DII (= -300 V). Todas las medidas son realizadas en agua. Los controles efectuados incluyen entre otros el cálculo de la tasa de dosis y el cálculo de simetría y homogeneidad del haz de radiación, confirmándose durante todo el período experimental que se mantenían las condiciones de radiación.

3.5.4.1.1. Tasa de dosis

Dado que la realización de las series experimentales fue realizada entre 1994 y 1997 se realizaba mensualmente control del tiempo a administrar para alcanzar 80 Gy a la isodosis del 100% de referencia, según la variación en la tasa de dosis de la Unidad de Cobalto-60, oscilando entre 0.74 Gy/minuto en Febrero de 1994 y 1.37 Gy/minuto en Marzo de 1997. La variación al alza explicable sólo por el cambio, ya referido, a finales de 1995 de la fuente de Cobalto-60.

Trimestralmente al realizar la calibración en cuba de agua, se realiza el cálculo de la tasa de dosis y la comparación con las medias previas, calculándose la tasa de dosis esperada y verificándolo con los resultados obtenidos.

3.5.4.2. "In vivo "

Se realizó la colocación de dosímetros TLD, para comprobación de la dosis administrada al lecho receptor y zonas protegidas por el blindaje: Para ello simulamos la operación de tratamiento, realizando los pasos previos de anestesia, colocación del do-

símetro en el lecho (simulando el implante tumoral), colocación del animal en la bandeja dispuesta el efecto, sujeción del mismo permitiendo exponer la pata posterior derecha con el animal en prono y cubierto por la protección plomada confeccionada al efecto.

Se colocaron dosímetros tanto sobre la piel de la pata del ratón, como en la misma zona donde realizábamos el implante (que consignamos como nervio ciático) para comprobar la dosis administrada al lecho; los dosímetros fueron recubiertos de una lámina plástica para evitar su contaminación con los fluidos corporales. También fueron colocados en la zona de penumbra y debajo del plomo. Los dosímetros usados eran de termoluminiscencia (TLD-100) de la marca HARSHOW, como material termoluminiscente el Fluoruro de Litio y con unas dimensiones de: 2,5 x 2,5 x 1 mm.

Se realizaron controles dosimétricos en Noviembre de 1994, Noviembre de 1995 y en Febrero de 1997 (dado que se realizó el cambio de fuente en la unidad de Cobalto-60) que verificaban la corrección de las dosis administradas y confirmaban la validez de la protección plomada para el resto del animal.

La lectura fue llevada a cabo por la Unidad de Física Médica perteneciente al Departamento de Medicina Física y Farmacología de la Facultad de Medicina de la Universidad de la Laguna.

Las lecturas obtenidas tras un disparo único estimando dosis de 1 Gy:

	Noviembre-94	Noviembre-95	Febrero-97
Nervio ciático:	1,008 Gy	1,049 Gy	0,980 Gy
Parte anterior de la pata sobre piel:	0,84 Gy	0,837 Gy	0,834 Gy
Parte posterior de la pata:	0,94 Gy	0,83 Gy	0,980 Gy
Limite de la pata no protegido por el plomo:	0,86 Gy	0,75 Gy	0,870 Gy
Penumbra junto a la pata bajo el plomo:		0,13 Gy	0,159 Gy
Debajo del plomo:		0,12 Gy	0,110 Gy

3.5.4.3. "In vitro "

3.5.4.3.1 Placas de Petri

Se realizó la colocación de dosímetros tanto en la cara externa de la placa de Petri, como en el interior (para obtener comprobación de la dosis administrada al tumor, situado a dicho nivel)

Los resultados de control obtenidos tras administrar el tiempo estimado para 1 Gy en sesión única fueron:

	Noviembre de 1995	Febrero-97:
Cara externa Petri=	0.933 Gy	0.993Gy
Cara interna Petri=	1.091 Gy	1,018Gy

3.5.4.3.2 “Frascos de cultivo tipo Falcon ”

En ellos se mantenían los cultivos celulares de melanoma. Se realizó control colocando dosímetros TLD en el interior del mismo, en la cara en la que se encontraban las células de melanoma, y también en las caras externas del frasco; se realizó comprobación dosimétrica durante el estudio y tras el cambio de Unidad.

Los resultados obtenidos tras la administración del tiempo estimado para 1 Gy en sesión única fueron:

	Noviembre 1995	Febrero de 1997
Cara interna:	1,091Gy	1,092 Gy
Cara posterior externa:	0,895Gy	1,130Gy

3.6 PROCEDIMIENTO DE IMPLANTE TUMORAL

El procedimiento varía según se trate de tumor sólido o suspensión celular:

3.6.1 IMPLANTE DE TUMOR SÓLIDO

Se selecciona un animal de la cepa elegida y que cumpla los criterios de inclusión. Se realiza el procedimiento anestésico ya referido y se sitúa el animal en la mesa de operaciones dispuesta al efecto, asegurándonos de una correcta sujeción del ratón, que elimine movimientos bruscos. Previo a la incisión quirúrgica se realiza el rasurado de la pata posterior derecha con el animal en prono y la limpieza de la zona con Povidon-

na Yodada (Betadine); una vez efectuado este paso se procede a la incisión quirúrgica en condiciones estériles y a separar el plano muscular de la pata, de tal forma que quede expuesto a la vista el nervio ciático, se realiza disección roma y se confecciona un bolsillo, dónde se depositará un milímetro cúbico de tumor sólido (irradiado o no); tras comprobar que queda ubicado correctamente se realiza el cierre por planos y se sutura la piel, se realiza la limpieza de la herida quirúrgica y tras etiquetar el animal con su número de estudio se coloca en la jaula correspondiente realizando los cuidados y seguimiento previstos hasta el día del sacrificio del animal.

3.6.2. IMPLANTE DE SUSPENSIÓN CELULAR EQUIVALENTE A UN MILÍMETRO CÚBICO DE MELANOMA

Para obtener un número de células tumorales equivalentes a las existentes en un fragmento de 1 milímetro cúbico de tumor sólido, en primer lugar se realiza la disgregación de un fragmento tumoral de dichas dimensiones y se procede a la centrifugación a 1500 r.p.m. durante tres minutos; tras desechar el sobrenadante se realiza la aspiración mediante vacío del botón de células sedimentadas obteniendo que se alcanza el nivel 1 de una pipeta Pasteur, que tomamos como referencia; procediéndose al recuento celular utilizando una cámara de Neubauer

Para obtener la suspensión celular tumoral se seleccionaron células creciendo “in vitro”. En el frasco, se disgregan y desprenden enzimáticamente durante un minuto con

solución tripsina /EDTA (0.05% / 0.02%) en PBS w/o Calcio y Magnesio. Posteriormente se coloca en la incubadora a 37 °C durante quince minutos con la finalidad de despegar las células del frasco de cultivo, seguidamente se añade PBS tampón y posteriormente se aspira el material obtenido colocándolo en frascos y centrifugar a 1500 r.p.m. durante tres minutos. Tras desechar el sobrenadante, aspiramos mediante vacío hasta alcanzar el nivel de referencia indicado; el recuento celular aportaba valores similares a las muestras de tumor sólido, con una variación del 10 – 15% del número total de células, ya que en el caso del tumor sólido existían también células de estirpe no tumoral.

Ya nos encontramos en disposición de realizar el implante celular. Realizamos la misma operación indicada en el apartado anterior hasta el momento del implante que en lugar de ser de tumor sólido en este caso será el contenido de la pipeta Pasteur hasta el nivel de referencia indicado. Con exquisito cuidado se coloca el extremo de la pipeta en el interior del bolsillo creado en torno al nervio ciático y procedemos a verter el contenido en el mismo cuidando que se realice en dicho espacio, tras esperar unos pocos segundos realizamos el cierre por planos, la sutura de la piel y asignamos al animal su número de estudio correspondiente y lo colocamos en la jaula dispuesta al efecto hasta el día de su sacrificio.

En todos los casos que se realizó implante de suspensión celular (irradiada o no) se practicó un test de viabilidad por prueba de exclusión del Azul Tripán, basada en que las células pictóricas o aún vivas con alteraciones metabólicas graves, son incapaces de impedir la penetración del colorante del medio a su citoplasma, tornándose de un color

azul que les distingue claramente de las no teñidas que adquieren un color marrón oscuro.

De este modo, en el microscopio de luz invertida, se utiliza el recuento para aplicar la fórmula:

$$\text{Viabilidad} = \text{Número de células viables} / \text{Número total de células} \times 100$$

Los valores de viabilidad de las muestras usadas en este experimento nunca estuvieron por debajo del 85% cuando se realizaba el implante de suspensión celular no irradiada. Tras la irradiación de la suspensión celular, a las pocas horas el test de viabilidad aportaba unos valores inferiores al 30%.

3.7 NECROPSIA Y OBTENCION DE DATOS:

Transcurridos los catorce días tras la irradiación y/o implante tumoral se procedía al sacrificio de los animales incluidos en el estudio mediante la administración de una dosis supraletal de anestesia. Antes de realizar la disección del animal se recogían todos los datos externos macroscópicos de interés como pudieran ser las señales de radiodermatitis, infección, ulceración o infiltración cutánea tumoral y se anotaban en la hoja de recogida de datos de cada animal.

3.7.1 LECHO TUMORAL

Tras la administración de la dosis anestésica supraletal y verificar la muerte del animal, se procedía a su fijación en la mesa quirúrgica, sujetándolo en posición prona y tras limpiar la zona de acceso, se realizaba una incisión quirúrgica vertical, paralela al fémur de la pata, de tal forma que quedase expuesto el paquete muscular que se procedía a abrir, permitiéndonos visualizar el recorrido del nervio ciático.

Se recogían todos los datos macroscópicos de interés, como las dimensiones del tumor encontradas, la posible infiltración de las zonas adyacentes y situación del tumor; especial atención se prestaba a la existencia de vasos visibles en la zona tumoral (neovasos) y a la disposición tumoral con relación al nervio.

Se procedía a la disección de la masa tumoral realizándose su medición en los tres ejes de coordenadas (largo = x, ancho = y, alto = z), anotando dichos datos en la hoja diseñada al efecto (anexo 2).

Se realizaba la toma de muestras (tumor y tejidos peritumorales) que se incluían bien en formol para su estudio con microscopio óptica, o bien en glutaraldehído para su estudio en microscopio electrónica (indicando en la hoja de recogida de datos este aspecto y asignándose un número de entrada para cada muestra).

En cualquiera de las etapas señaladas y cuando el dato encontrado se consideraba de interés se realizaron fotografías, indicando este aspecto en la hoja de recogida de datos y en el libro de Anatomía Patológica.

3.7.2 METASTASIS LINFATICAS Y/O HEMATÓGENAS

Una vez finalizado el estudio macroscópico de la zona del lecho, se realizaba la disección del animal siguiendo las pautas habituales usadas para roedores de pequeño tamaño ²³¹ en busca de metástasis a distancia; basándonos en los datos encontrados en los animales control especial énfasis se puso en la localización de adenopatías abdominales y metástasis hematógenas (principalmente pulmonares por las características propias del melanoma B16-F10). Cuando se sospechaba la posibilidad de metástasis se procedía a la disección de la adenopatía o del órgano y se incluía en formol para su estudio con microscopía óptica o en glutaraldehído para su estudio bajo microscopía electrónica, anotando los datos de la localización y número de las posibles metástasis o adenopatías afectas en la hoja de recogida de datos correspondiente al animal en cuestión.

3.8 ESTUDIO MICROSCOPICO:

Las muestras obtenidas fueron analizadas bien con microscopía óptica convencional o bien con microscopía electrónica, utilizando para ello diversas técnicas que a continuación se señalan. Asimismo se realizaron tomas fotográficas de los hallazgos relevantes.

3.8.1 TECNICAS DE MICROSCOPIA ÓPTICA

Las piezas obtenidas fueron seccionadas según la orientación más adecuada, los cortes seriados, de un grosor de 6 micras, se realizaron en un microtomo tipo Reichert-Jung 1130 Biocut.

Se emplearon las siguientes tinciones: Hematoxilina-Eosina y Tricrómico de

Mason -Goldner.

3.8.1.1 Hematoxilina-Eosina

Empleamos las siguientes soluciones: Hematoxilina de Harris y Eosina.

A) Hematoxilina de Harris

Solución A:

Hematoxilina en polvo..... 5 grs.

Alcohol absoluto..... 50 c.c..

Solución B:

Alumbre potásico cristalizado..... 100 grs.

Agua destilada..... 800 c.c.

(El alumbre potásico se disuelve en caliente)

Veinticuatro horas después de preparar las soluciones, las mezclamos y agregamos 2,5 grs. de óxido rojo de mercurio. Durante unos 20-30 minutos se mantiene en ebullición, inmediatamente después, se colocan en un matraz destapado que se introduce en agua fría.

B) Eosina

Eosina:.....2 grs.

Agua destilada:160 c.c.

Alcohol de 95%: 640 c.c.

Ácido Acético:8-10 gotas

Técnica:

1. Hacer dos pases de Xilol de 10 minutos de duración con objeto de desparafinar.
2. Mediante tres pases en alcohol de 96 y 90 grados durante 5 minutos, conseguimos la hidratación.
3. Lavamos con agua corriente durante dos minutos.
4. Teñimos con Hematoxilina de Harris durante 3 minutos.
5. Volvemos a lavar con agua corriente durante 5 minutos
6. Teñimos durante 3 minutos con Eosina.
7. Sin lavar, realizamos pases rápidos por alcohol de 90, 96 grados y absoluto.
8. Aclaremos con carboxilol.
9. Hacemos dos pases en xilol.
10. Realizamos montaje en un kitt.

3.8.1.2 Tricrómico de Mason-Goldner

Preparamos las siguientes soluciones:

A) *Solución de Bouin*

Acido Pítrico saturado en solución acuosa.750 c.c.

Formol al 37-40 %..... 250 c.c.
Ácido Acético Glacial.....50 C.

Para asegurar una correcta solución de Bouin, debe ser preparada a 60 grados C°.

B) *Solución de Hematoxilina de Weigert*

Solución A:

Cristales de Hematoxilina..... 1 gr.
Alcohol de 95 grados..... 100 c.c.

Solución B:

Cloruro Férrico al 29 %..... 4 c.c.
Agua Destilada..... 95 c.c.
Ac. Clorhídrico concentrado.....1 c.c.

Solución de trabajo:

Solución A más solución B a partes iguales

C) *Solución de Biebrich - Acid Fuchsin:*

Biebrich Scarlet, acuosa al 1 %.....90 c.c.
Acid Fuchsin, acuosa al 1 %.....10 c.c.
Acido Acético Glacial..... 1 c.c.

D) *Solución Acido Fosfomolibdico-Ácido Fosfotungstico:*

Ácido Fosfolíbico.....	5 grs.
Ácido Fosfotúngstico.....	5 grs.
Agua Destilada.....	200 grs.

E) *Solución de Azul de Anilina*

Azul de Anilina.....	2.5 grs.
Ácido Acético Glacial.....	2 c.c.
Agua destilada.....	100 c.c.

F) *Solución de Ácido Acético Glacial*

Ácido Acético Glacial.....	1 c.c.
Agua Destilada.....	100 c.c.

Técnica:

1. Desparafinar en 2 pases de Xilol de 10 minutos cada uno.
2. Hidratar en pases sucesivos de Alcohol Absoluto (5 minutos), alcohol de 96 grados.
3. Lavar en agua corriente (2-3 minutos).
4. Solución de Bouin, toda la noche a temperatura ambiente.
5. Lavar en agua corriente hasta que desaparezca el color amarillo.
6. Lavar en agua destilada.

7. Teñir con Hematoxilina de Weigert durante 10 minutos.
8. Lavar en agua corriente durante 10 minutos.
9. Aclarar en agua destilada.
10. Teñir con Biebrich Scarlet-Acid Fuchsin durante 2 minutos.
11. Ácido fosfomolibdico-ácido Fosfotúngstico durante 12 minutos.
12. Teñir con Azul de Anilina (5 minutos).
13. Lavar con agua destilada
14. Solución de Ácido Acético Glacial (3-5 minutos).
15. Deshidratar en alcohol de 90, 96 grados y Absoluto.
16. Aclarar en Carboxilol.
17. Xilol en 2 pases rápidos.
18. Montar en Eukitt.

La observación y toma de fotografías se efectuó en microscopio óptico Opthi-phot con lentes de distintos aumentos según el caso.

2.8.2 TECNICAS DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

Tras obtener los cortes con un piramidotono LKB o el Ultramicrotomo LKB, modelo Ultratomo III, con cuchillas de vidrio de 45 grados de ángulo de orientación, se utilizaron distintas técnicas para su observación en un Microscopio Electrónico JEOL, modelo "JEM 100 " (Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Universitario de Canarias).

Solución de Tampón Cacodilato Sódico

Solución Stock

Cacodilato Sódico (0.2 M).....	21.4 grs.
Agua Destilada.....	500 c.c.
Ácido Clorhídrico 1N.....	3,45 c.c.

Una vez mezcladas tienen que tener un pH de 7,3.

Solución Stock de Ácido Clorhídrico

Ácido Clorhídrico Comercial.....	3,6 c.c.
Completar con Agua Destilada	hasta 25 c.c.

De esta solución se toman los 3.45 c.c.

Solución de trabajo de tampón Cacodilato

Solución Stock de Tampón Cacodilato.....	50 %
Agua Destilada.....	50 %

Esta solución es 0,1 M

Tampón Millionig

Solución A

Fosfato monosódico.....	2,26 grs.
Agua Destilada.....	100 c.c.

Solución B:

Hidróxido sódico.....2,52 grs.

Agua Destilada.....100 c.c.

Solución C:

Glucosa.....5,40 grs.

Agua Destilada.....100 c.c.

SOLUCIÓN D:

Cloruro de Calcio..... 1 gr.

Agua Destilada.....100 c.c.

Se mezclan 37,35 c.c. de la Solución A, 7,65 c.c. de la Solución B, 5 c.c. de la Solución C y 0,25 c.c. de la Solución D. El ph final tiene que ser de 7.3.

Fijador Glutaraldehído

Tampón Millonig..... 90 c.c.

Glutaraldehido Comercial.....10 c.c.

Azul de Toluidina para cortes semifinos

Borax.....1 gr

Agua Destilada.....50 c.c.

Azul de Toluidina..... 1 gr.

Mezclar bien y añadir poco a poco 50 c.c. de agua destilada.

Resina de inclusión en Microscopía Electrónica

Epitoke (sustitute)..... 30 c.c.

DDSA.....27 c.c.

Mezclar bien y agitar 1+2

MNA.....3 c.c.

BDMA.....1,2 c.c.

Resina de trabajo: Mezclar anterior + 3+4

Inclusión en Epón

1. Glutaraldehido (2 horas).
2. Tampón Cacodilato (2 pases de 15 minutos).
3. Tetróxido de Osmio (1 hora o toda la noche)
4. Agua Destilada (varios pases)
5. Tampón Cacodilato (2 pases de 15 minutos)
6. Alcohol 50 % (15 minutos)
7. Alcohol 75 % (15 minutos)
8. Alcohol 90 % (15 minutos)
9. Alcohol 95 % (15 minutos)

10. Alcohol 100% (15 minutos)
11. Óxido de Propileno (15 minutos)
12. Oxido de Propileno + Resina EPON (30 minutos)
13. Resina EPON (una hora y al vacío).
14. Hacer los bloques
15. Colocar en Estufa a 65 grados centígrados(20 horas)

Los pases 1 hasta 12 se realizan en agitador.

Preparación del Tetróxido de Osmio

Se Disuelve una ampolla de tetróxido de Osmio (500 mgrs.) en 50 c.c. de tampón Cacodilato 0,1 M (la ampolla se rompe dentro de un frasco opaco y cerrado).

Preparación de contrastes para cortes ultrafinos:

Solución de acetato de uranil-magnesio

Acetato de uranil-magnesio.....	7,5 grs.
Agua Destilada.....	100 c.c.

Solución de Citrato de plomo

Nitrato de Plomo.....	1,33 grs.
Citrato de sodio.....	1,76 grs.

Disolvemos el nitrato de plomo en el agua destilada y añadimos el nitrato sódico

co. Agitar enérgicamente 1 minuto, repitiendo la operación cada 5 minutos, durante media hora. Una vez hecha esta preparación, añadimos 8 c.c. de solución 1N de Hidróxido Sódico. Movemos circularmente de manera suave, hasta obtener una solución transparente. Añadir agua destilada, hasta alcanzar un volumen total de 50 c.c.

3.9. EVALUACIÓN DE RESULTADOS

3.9.1 MANEJO DE DATOS

Los datos obtenidos en la necropsia fueron recogidos y anotados en una hoja del programa Excel de Microsoft, versión 5.0; indicando para cada animal de estudio las dimensiones tumorales obtenidas. Las características del programa permiten su posterior tratamiento matemático en cuanto a cálculos (volumen, medias...).

El volumen se obtuvo aplicando la fórmula del elipsoide de semiejes ¹⁸⁵

$$V = \frac{4}{3} \pi X * Y * Z$$

Dónde “V” corresponde al volumen tumoral alcanzado a los 14 días, “x “ es la medida en milímetros que indica la longitud alcanzada por el tumor, “y “sería el ancho en milímetros, “z” la altura en milímetros de la muestra tumoral.

3.9.2 MANEJO ESTADÍSTICO

Dada la naturaleza y número de grupos de estudios, utilizamos el análisis de varianza (ANVA) como procedimiento de comparación múltiple; para ello utilizamos los datos obtenidos con el programa Excel 5.0, en cuanto a volumen, media y desvia-

ción estándar y los anotamos en una hoja de tratamiento estadístico del programa SPSS 7.5 para Windows.

El análisis de la varianza (ANVA) protege al investigador contra el error de “inflación” aportándonos el dato inicial de si hay una diferencia cualquiera entre las medias de todos los grupos; si la respuesta es positiva podremos realizar combinaciones entre pares o combinaciones de grupos a posteriori, eligiendo en nuestro estudio experimental el procedimiento de Scheffe.

Cuando fue precisa la comparación entre dos muestras independientes realizamos el estudio estadístico utilizando T-Student.

Se ha elegido en todo momento un nivel de significación de $\alpha = 0,05$, es decir del 5 %, equivalente a un nivel de confianza de $\gamma = 95\%$ ($\gamma = 1 - \alpha$).

4 RESULTADOS

4.1 HALLAZGOS MACROSCOPICOS:

4.1.1 LECHO

4.1.1.1 *Series control:*

4.1.1.1.1 *Serie control de tumor sólido*

Las características macroscópicas vienen definidas por un crecimiento neoplásico sólido pigmentado de color oscuro, con áreas necróticas. La masa tumoral infiltra entre los músculos adyacentes, en ocasiones hasta alcanzar periostio sin signos macroscópicos de infiltración; asimismo, el crecimiento tumoral se produce en torno al paquete vasculonervioso, sin infiltrarlo. Es evidente la formación de neovasos que rodean y penetran la masa tumoral (figura 6).

El crecimiento neoplásico alcanzó un volumen que osciló entre 419 y 864 milímetros, con una media de 708 milímetros cúbicos.

En la tabla siguiente vienen recogidos los datos en milímetros de las dimensiones (largo, ancho, alto) del tumor encontrado, así como el volumen (en milímetros cúbicos) alcanzado en cada animal, así como la media y Desviación Estándar de la serie.

	LARGO	ANCHO	ALTO	VOLUMEN	
RATON 138	12	10	8	503	
RATON 139	15	11	10	864	
RATON 140	15	10	10	785	MEDIA
RATON 141	10	10	8	419	708
RATON 142	16	10	10	838	
RATON 143	14	10	10	733	DESV.STA.
RATON 144	15	10	10	785	166
RATON 145	12	10	8	503	

RATON 146	16	11	9	829	
RATON 147	13	12	10	817	

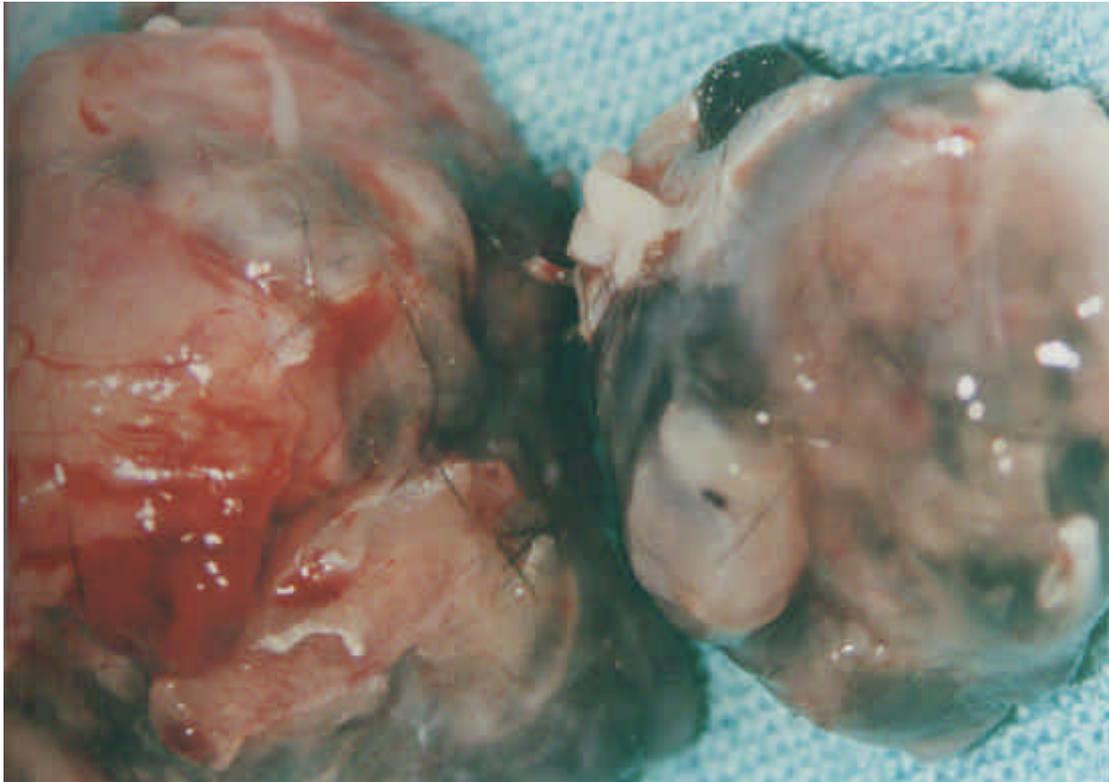


Figura 6: Muestras del crecimiento neoplásico en animales control, apréciense las frecuentes áreas de necrosis, así como la evidente neovascularización.

4.1.1.1.2 Serie control de suspensión celular

Las características macroscópicas encontradas fueron similares a las de la serie control de tumor sólido, por lo que únicamente nos referiremos a los datos del volumen alcanzado, que osciló entre 785 y 1089 milímetros cúbicos, con una media de 895 (ver tabla adjunta).

	LARGO	ANCHO	ALTO	VOLUMEN	
RATON 155	14	12	10	880	
RATON 156	16	13	10	1089	
RATON 157	16	13	10	1089	
RATON 158	15	10	10	785	MEDIA
RATON 159	14	12	10	880	895
RATON 160	14	13	10	952	
RATON 161	15	12	10	942	DESV. ST.
RATON 162	15	13	10	1021	117
RATON 192	15	10	10	785	
RATON 193	15	11	11	950	

4.1.1.2 Series experimentales

4.1.1.2.1 Subgrupo IA (*implante de un milímetro cúbico de tumor sólido no irradiado en lecho irradiado, intervalo entre irradiación e implante inferior a 24 horas*)

A los catorce días tras la irradiación de la pata posterior derecha del ratón se pone de manifiesto los efectos agudos de la radiación a dicho nivel, consistentes en edema, depilación completa y dermatitis grado III con áreas ulceradas; dichos signos quedan bien delimitados hasta la raíz de la pata, donde se localiza la zona de protección bajo la carcaza plomada (figura 7). El crecimiento tumoral sobre lecho irradiado es macroscópicamente evidente (figura 7), con características similares de la tumoración a las descritas en las series control pero con una diferencia notable en cuanto al volumen alcanzado respecto a las mismas (figura 8). Asimismo se pone de manifiesto la existencia de grandes vasos que rodean y penetran a la neoplasia. El volumen tumoral alcanzado osciló entre 99 y 314 milímetros cúbicos, con una media de 176 (ver tabla adjunta)

SERIE IA	LARGO	ANCHO	ALTO	VOLUMEN	
RATON 4	10	9,6	4	251	
RATON 8	7	7	3	99	MEDIA
RATON 9	10	7	4	147	176
RATON 10	8	7	5	147	
RATON 24	9	7	3,5	115	DESV.ST.
RATON 28	10	8	5	209	72
RATON 33	8	6	5	126	
RATON 34	10	10	6	314	
RATON 35	8	7	4	117	
RATON 70	10	9	5	235	

4.1.1.2.2 *Subgrupo IB (implante de un milímetro cúbico de tumor sólido no irradiado en lecho irradiado, intervalo entre irradiación del lecho e implante de 7 días)*

Los hallazgos microscópicos son similares a los descritos en la serie IA, por lo que únicamente nos referiremos a los aspectos diferenciales. Los signos de dermatitis grado III son evidentes y se aprecia un mayor grado de necrosis en las zonas acras. Se

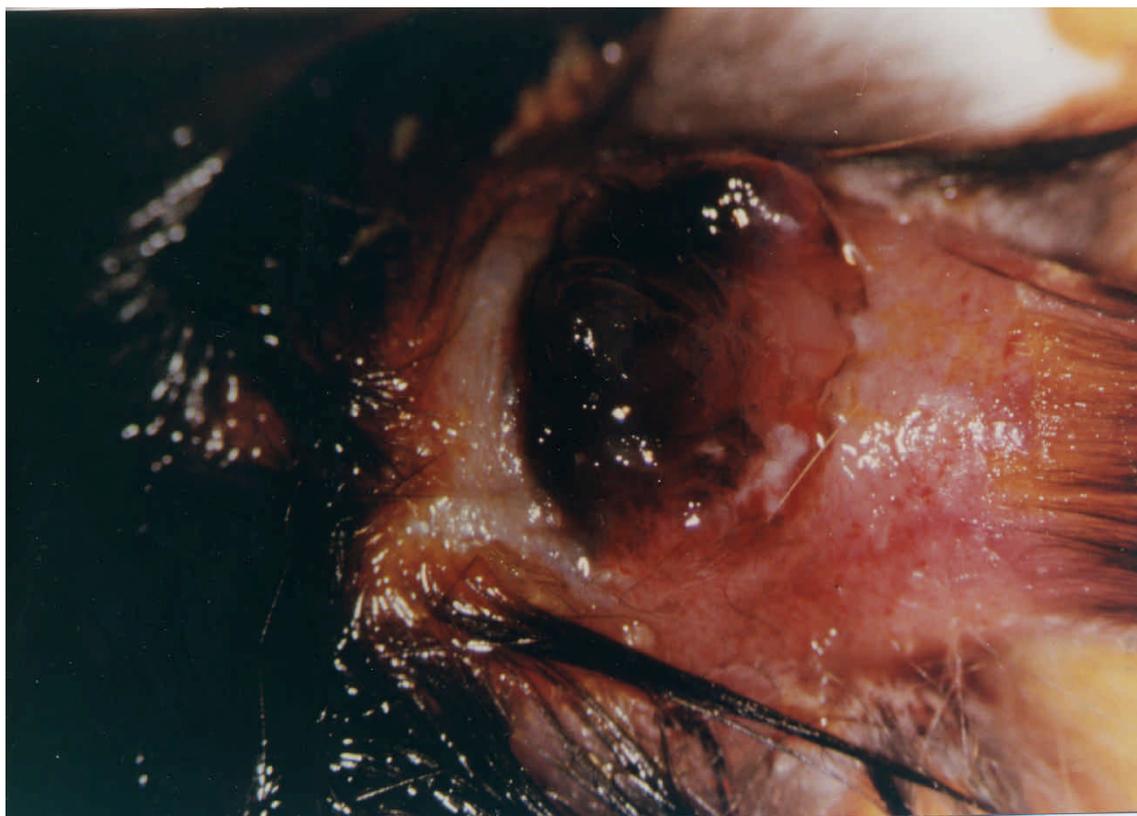


Figura 7: Se observan con claridad los signos de dermatitis y depilación de la pata, en pleno lecho irradiado puede verse el crecimiento del melanoma implantado así como la presencia de neovasos.

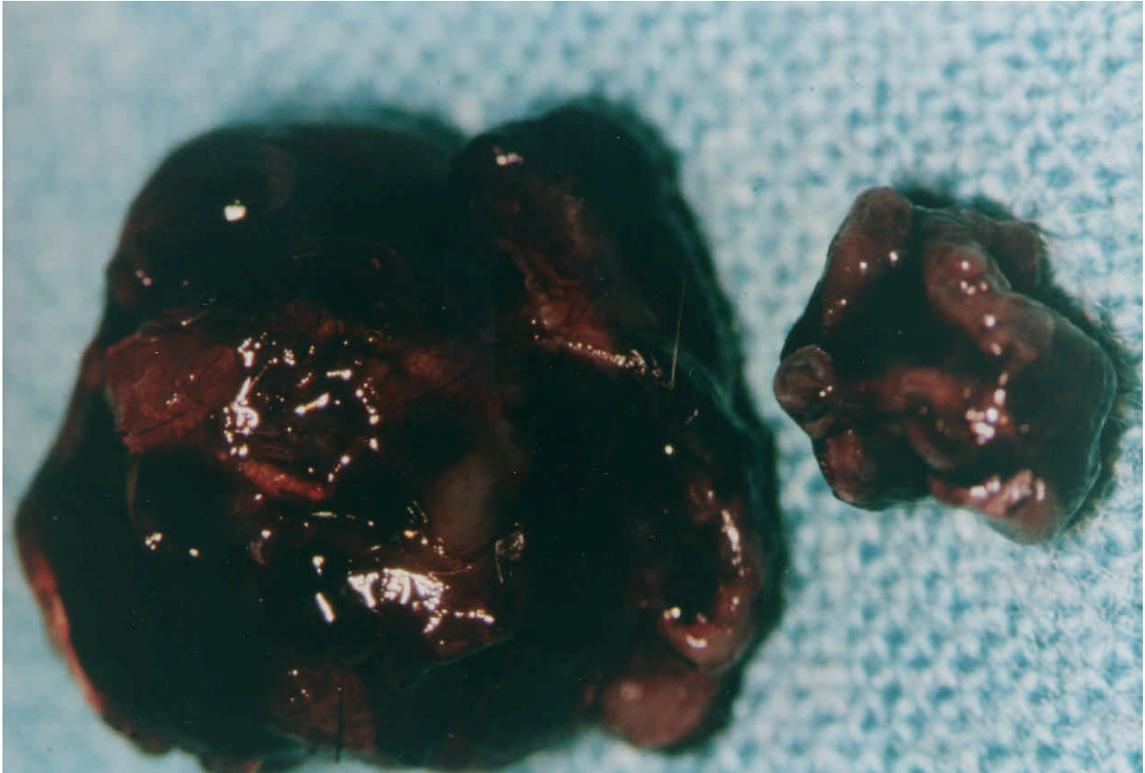


Figura 8: Se observa claramente la diferencia en cuanto al tamaño tumoral alcanzado por el melanoma implantado en animales control frente al lecho irradiado (efecto lecho tumoral)

observan signos de retracción de la pata. En cuanto al volumen obtenido éste varió entre 88 y 418 milímetros cúbicos, con una media de 188 (ver tabla)

SERIE IB	LARGO	ANCHO	ALTO	VOLUMEN	
RATON 5	7	6	4	88	
RATON 6	11	9	6	311	MEDIA
RATON 13	11	8	3	138	188
RATON 17	11	7	4	162	
RATON 18	10	7	4	147	DESV.ST.
RATON 23	8	7	3,5	103	117
RATON 26	6	5	4	63	
RATON 80	11	8	3	138	
RATPN 164	10	10	8	418	
RATON 165	11	9	6	311	

4.1.1.2.3 *Subgrupo IIA (implante de 1 milímetro de tumor sólido irradiado en lecho no radiada, intervalo menor de 24 horas entre irradiación e implante).*

Macroscópicamente a los catorce días no se encontró crecimiento tumoral palpable, con integridad cutánea en todos los casos. Al realizar la necropsia se puso de manifiesto la existencia de fragmentos milimétricos con pigmentación negruzca, que se disponían a lo largo del paquete vasculo-nervioso (foto 9), en algunos casos con aspecto de diseminación en sábana, dando un aspecto moteado en la zona de implante. Dicho material fue recogido y englobado en conjunto como muestra tumoral obtenida, osci-

lando el volumen tumoral obtenido entre 0,50 y 1 milímetro cúbico, con una media de 0,90 (ver tabla adjunta).

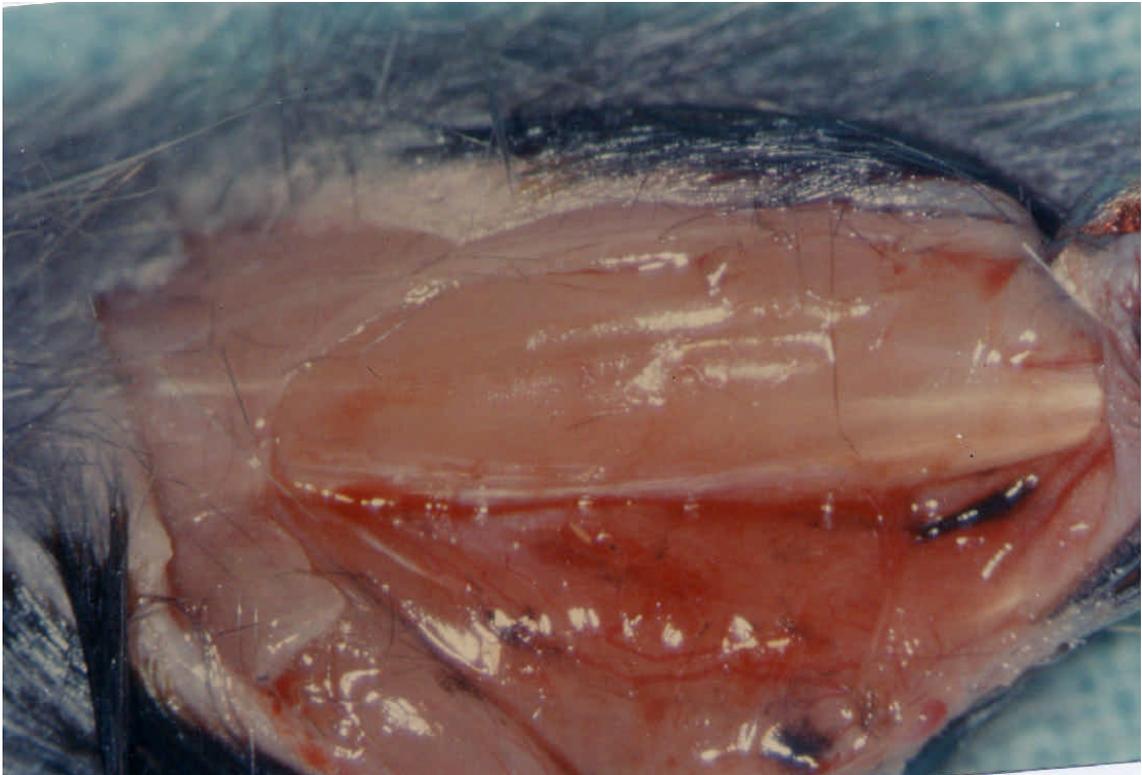


Figura 9: A los catorce días tras implante del tumor sólido irradiado se obtenían fragmentos milimétricos, en ocasiones dispuestos como un punteado “en sábana” y generalmente en situación yuxta-perineural. Apréciase el pelaje del animal. Respetado, señal inequívoca de que el lecho no fue irradiado.

SERIE II A	LARGO	ANCHO	ALTO	VOLUMEN	
RATON 73	1	1	1	0,50	
RATON 74	1	1	1	0,50	
RATON 75	2	1	1	1	
RATON 76	2	1	1	1	MEDIA
RATON 81	1	1	1	0,50	0,9
RATON 82	2	1	1	1	
RATON 83	2	1	1	1	DESV. ST.
RATON 84	2	1	1	1	0,25
RATON 85	2	1	1	1	
RATON 86	1,5	1	1	0,8	

4.1.1.2.4. Subgrupo IIB (implante de un milímetro cúbico de tumor sólido irradiado en lecho no irradiado, intervalo entre irradiación e implante de 7 días).

Los hallazgos macroscópicos son similares a los obtenidos en la Serie IIA. En esta serie el volumen tumoral obtenido osciló entre 0,10 y 0,50 milímetros cúbicos, con una media de 0,30 (ver tabla adjunta).

SERIE IIB	LARGO	ANCHO	ALTO	VOLUMEN	
RATON 194	1	1	0,5	0,3	
RATON 195	1	1	0,5	0,3	
RATON 196	1	1	1	0,5	
RATON 197	1	1	0,5	0,3	MEDIA
RATON 198	1	0,5	0,5	0,1	0,3
RATON 199	1	1	0,5	0,3	
RATON 200	1	1	0,5	0,3	DESV. ST.

RATON 201	1	1	0,5	0,5	0,14
RATON 202	1	0,5	0,5	0,1	
RATON 204	1	1	0,5	0,3	

4.1.1.2.5. Subgrupo IIIA (Implante de un milímetro cúbico de tumor sólido irradiado en lecho irradiado, intervalo entre irradiación e implante inferior a 24 horas)

En todos los animales se objetivó la existencia de dermatitis grado III bien limitada a la pata posterior derecha, con las características ya señaladas en el apartado 4.1.3. Los hallazgos de crecimiento neoplásico fueron similares a los descritos en el apartado 4.1.5 (figura 10) encontrando fragmentos milimétricos oscuros que recogidos aportaban un volumen medio de 0,7 milímetros cúbicos, con valores que oscilaban entre 0,5 y 1 milímetro cúbico (ver tabla adjunta).

SERIE IIIA	LARGO	ANCHO	ALTO	VOLUMEN	
RATON 130	1	1	1	0,5	
RATON 131	1	1	1	0,5	
RATON 132	1	1	1	0,5	MEDIA
RATON 133	1,5	1,5	1	1,1	0,7
RATON 134	1	1	1	0,5	
RATON 135	2	1	1	1	DESV. ST.
RATON 136	1,5	1	1	0,8	0,26
RATON 174	1	1	1	0,5	
RATON 175	1	1	1	0,5	
RATON 176	1	1	1	0,5	

4.1.1.2.6. Subgrupo IIIB(Implante de un milímetro cúbico de tumor sólido irradiado en lecho irradiado, intervalo entre irradiación e implante de 7 días).

Los hallazgos macroscópicos fueron similares a los descritos para la serie IIIA, con un volumen tumoral alcanzado que osciló entre 0,06 y 0,5 milímetros cúbicos y una media de 0,2 (ver tabla adjunta)

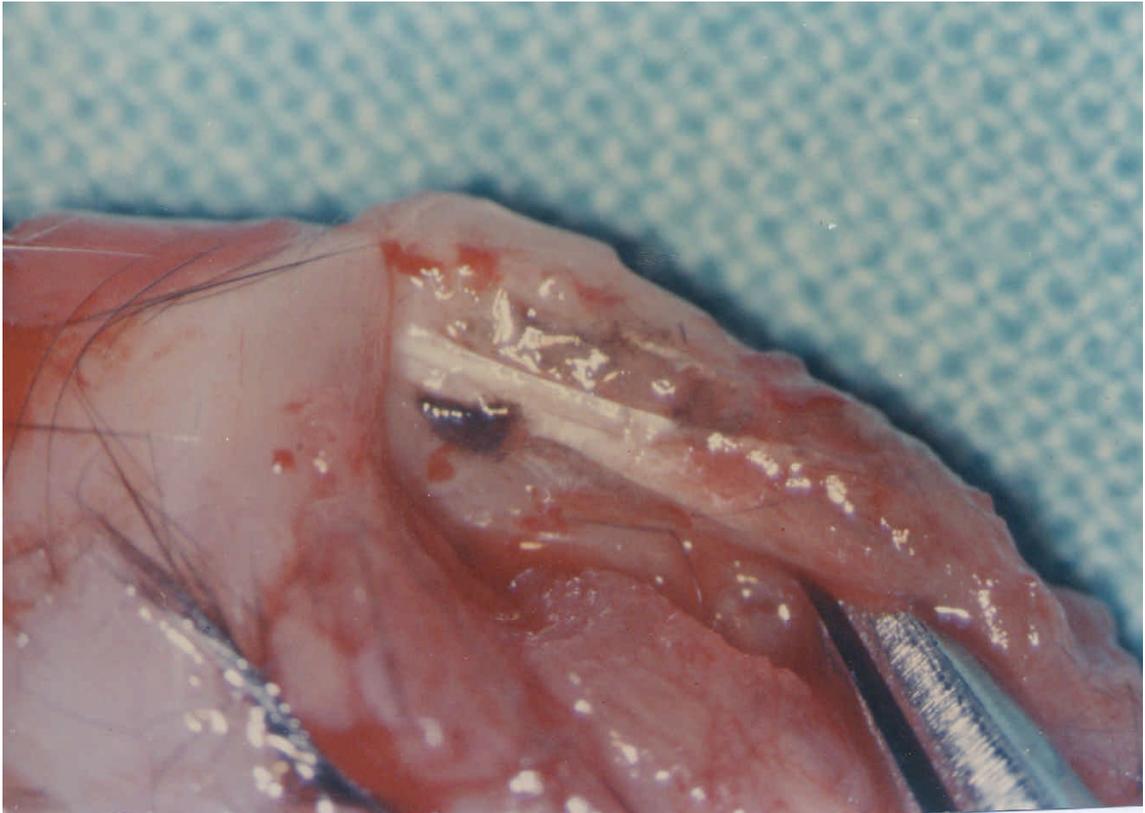


Figura 10: Se aprecia la depilación del lecho y la presencia de fragmentos milimétricos de melanoma, en situación perineural, puede observarse asimismo el moteado oscuro en áreas del lecho receptor.

SERIE IIIB	LARGO	ANCHO	ALTO	VOLUMEN	
RATON 77	1	1	1	0,5	
RATON 78	1	1	0,5	0,3	
RATON 105	1	1	0,5	0,3	
RATON 106	0,5	0,5	0,5	0,06	MEDIA
RATON 107	0,5	0,5	0,5	0,06	0,2
RATON 108	0,5	0,5	0,5	0,06	
RATON 110	1	0,5	0,5	0,1	DESV. ST.
RATON 111	1	0,5	0,5	0,1	0,18
RATON 112	0,5	0,5	0,5	0,06	
RATON 166	1	1	1	0,5	

4.1.1.2.7 Subgrupo IVA (*Implante de melanoma, como suspensión celular no irradiada, en lecho irradiado; intervalo entre irradiación del lecho e implante inferior a 24 horas*)

Los hallazgos macroscópicos son idénticos a los obtenidos en la serie IA apreciándose los signos de radiodermatitis y la existencia de una neoplasia creciendo en pleno lecho irradiado y evidentes signos de neovascularización. El crecimiento tumoral es inferior al obtenido en la serie control (figura 11), oscilando entre 101 y 524 milímetros cúbicos, con una media de 378 (ver tabla).

SERIE IVA	LARGO	ANCHO	ALTO	VOLUMEN	
RATON 27	10	10	10	524	
RATON 29	7	7	7	180	
RATON 36	8	6	4	101	
RATON 37	8	8	5	168	MEDIA
RATON 42	10	10	10	524	378

RATON 43	10	10	10	524	DESV. ST. 190
RATON 44	10	10	10	524	
RATON 45	10	10	10	524	
RATON 46	10	10	10	524	
RATON 48	8	6	5	188	

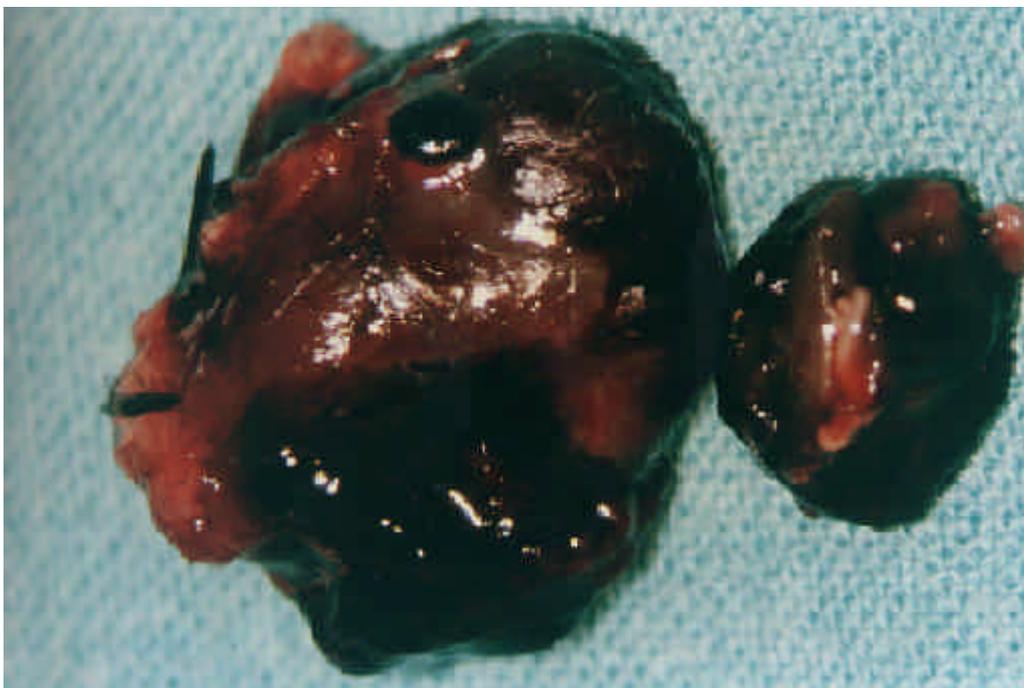


Figura 11: Muestra el dispar crecimiento de la suspensión celular de melanoma en animales control frente a la alcanzada tras irradiación del lecho y posterior implante de la suspensión celular (efecto lecho tumoral). Obsérvese la semejanza al implante de tumor sólido (figura 8).

4.1.1.2.8. Subgrupo IVB (*implante en número equivalente a un milímetro cúbico de melanoma como suspensión celular no irradiada, en lecho irradiado; intervalo entre irradiación del lecho e implante de 7 días*).

Los hallazgos macroscópicos son similares a los obtenidos en la serie IB, con existencia de crecimiento tumoral evidente en pleno lecho irradiado; éste aparece con signos de dermatitis grado III, con zonas necróticas y esfacelos (figura 12); se adivina en algunos animales signos de retracción de las zonas acras.

El volumen tumoral osciló entre 105 y .377 milímetros cúbicos, con una media de 180 milímetros cúbicos(ver tabla)

SERIE IVB	LARGO	ANCHO	ALTO	VOLUMEN	
RATON 72	10	8	7	293	
RATON 79	10	9	8	377	
RATON 117	10	5	4	105	
RATON 118	10	8	8	335	MEDIA
RATON 148	7	7	7	180	180
RATON 149	8	6	6	151	
RATON 151	7	7	6	154	DESV. ST.
RATON 152	7	7	6	154	68
RATON 153	7	7	7	180	
RATON 154	7	7	7	180	

4.1.1.2.9 Subgrupo VA (*implante en lecho no irradiado de un número equivalente a un milímetro cúbico de melanoma como suspensión celular irradiada, intervalo entre irradiación e implante inferior a 24 horas*).

Los datos obtenidos son similares a los descritos para las series IIA y IIB, sin detectarse en ninguno de los animales nódulo tumoral palpable; al realizar la necropsia



Figura 12: Depilación y necrosis, así como el crecimiento de la suspensión de melanoma en pleno lecho irradiado

se visualizaba en la zona del lecho de implante la existencia de pequeños fragmentos de pigmentación pardo-negrizca que en conjunto aportaban un volumen medio de 1,2 milímetros cúbicos, oscilando entre un mínimo de 0,2 y un máximo de 2,10 milímetros cúbicos (ver tabla)

SERIE VA	LARGO	ANCHO	ALTO	VOLUMEN	
RATON 56	1,5	1,5	1	1,2	
RATON 57	2	2	0,5	1	
RATON 63	2	2	0,5	1	
RATON 64	2	2	0,5	1	MEDIA
RATON 65	1,5	1,5	0,5	0,6	1,2
RATON 66	1	1	0,5	0,2	
RATON 67	1,5	1,5	1,5	1,8	DESV.ST.
RATON 68	1,5	1,5	1	1,2	0,6
RATON 92	2	2	1	2,1	
RATON 94	2	2	1	2,1	

4.1.1.2.10 *Subgrupo VB (implante en lecho no irradiado de un número equivalente a un milímetro cúbico de melanoma como suspensión celular irradiada, intervalo entre irradiación e implante de 7 días)*

Los hallazgos macroscópicos obtenidos fueron similares a los descritos en las series IIA, IIB y VA. En cuanto al volumen tumoral observado este osciló entre 0,10 y 0,50 milímetros cúbicos; con una media de 0,3 (ver tabla)

SERIE VB	LARGO	ANCHO	ALTO	VOLUMEN	
RATON 205	1	1	0,5	0,3	
RATON 206	1	1	0,5	0,3	
RATON 207	1	0,5	0,5	0,1	
RATON 208	1	1	0,5	0,3	MEDIA
RATON 209	1	0,5	0,5	0,1	0,3
RATON 210	1	1	1	0,5	
RATON 211	1	0,5	0,5	0,1	DESV. ST.
RATON 212	1	1	1	0,5	0,17
RATON 213	1	0,5	0,5	0,1	
RATON 214	1	1	1	0,5	

4.1.1.2.11 *Subgrupo VIA (Implante en lecho irradiado de un número equivalente a un milímetro cúbico de tumor sólido como suspensión celular irradiada; intervalo entre irradiación e implante inferior a 24 horas)*

Los datos macroscópicos obtenidos fueron similares a los descritos en la serie IIIA, apreciándose signos de irradiación del lecho y la existencia de mínimos fragmentos pardo-negruzcos que en conjunto alcanzaban un volumen que osciló entre 0,1 y 0,5 milímetros cúbicos, con una media de 0,3 milímetros cúbicos (ver tabla)

SERIE VIA	LARGO	ANCHO	ALTO	VOLUMEN	
RATON 52	1	1	1	0,5	
RATON 53	1	1	0,5	0,3	
RATON 54	1	1	0,5	0,3	
RATON 55	1	1	0,5	0,3	MEDIA
RATON 59	1	1	1	0,5	0,3
RATON 60	1	1	1	0,5	
RATON 96	1	0,5	0,5	0,1	DESV.ST.
RATON 98	1	1	0,5	0,3	0,141
RATON 103	1	1	0,5	0,3	
RATON 104	1	1	0,5	0,3	

4.1.1.2.12 *Subgrupo VIB (implante en lecho irradiado de un número equivalente a un milímetro cúbico de melanoma, como suspensión celular irradiada; intervalo entre irradiación e implante de 7 días).*

Los datos macroscópicos (figura 12) obtenidos fueron similares a los obtenidos en la serie IIIB; el volumen tumoral obtenido osciló entre 0,06 y 0,1 milímetros cúbicos con una media de 0,09 (ver tabla)

SERIE VIB	LARGO	ANCHO	ALTO	VOLUMEN	
RATON 101	1	0,5	0,5	0,1	
RATON 102	1	0,5	0,5	0,1	
RATON 113	0,5	0,5	0,5	0,06	
RATON 114	0,5	0,5	0,5	0,06	MEDIA
RATON 115	0,5	0,5	0,5	0,06	0,09
RATON 116	1	0,5	0,5	0,1	
RATON 121	0,5	0,5	0,5	0,06	DESV. ST.
RATON 122	1	0,5	0,5	0,1	
RATON 190	1	0,5	0,5	0,1	0,05
RATON 191	0,5	0,5	0,5	0,06	

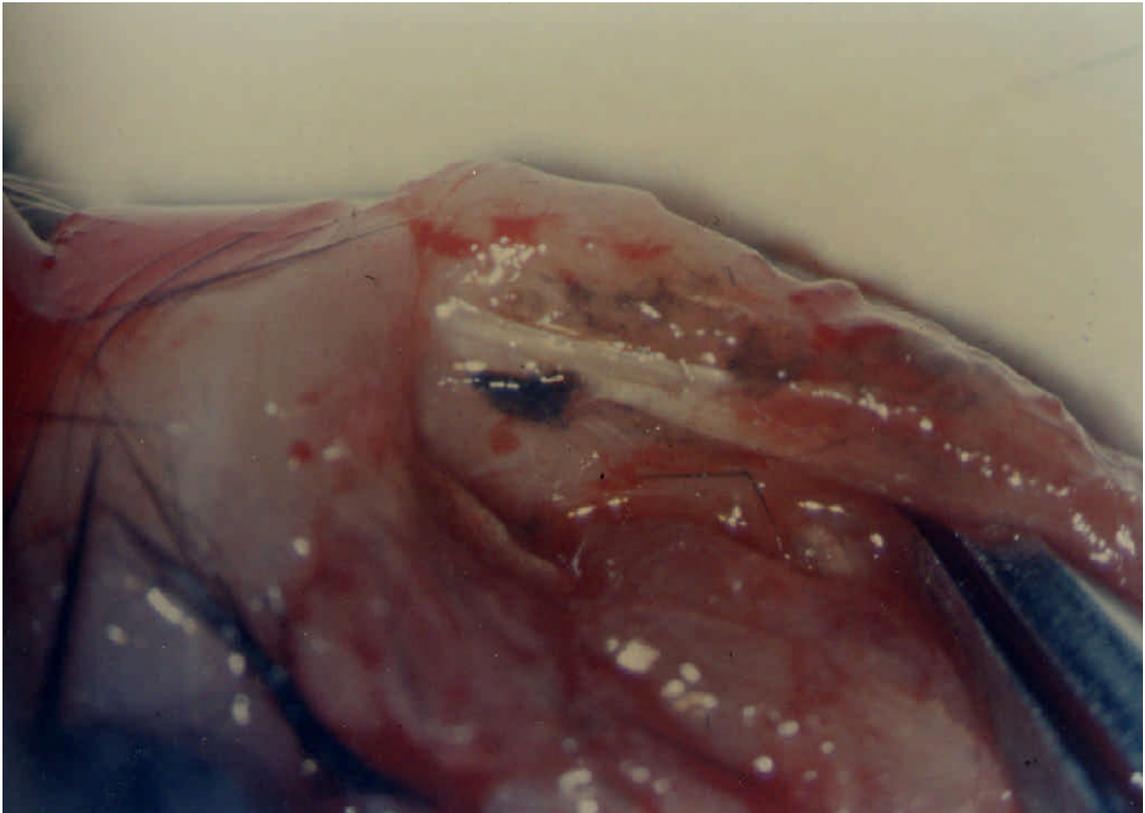


Figura 13: Resultado obtenido tras implante de suspensión celular irradiada en lecho irradiado. Apréciense los signos de depilación y la presencia de fragmentos milimétricos de melanoma y depósitos en sábana, fundamentalmente de localización perineural.

4.1.1.2.13 Serie Especial de seguimiento sobre lecho irradiado

El intervalo entre implante y necropsia fue superior a los catorce días, motivo por el que estos animales son reseñados aparte, oscilando dicho periodo entre 16 días (ratón 11) y los 28 días (ratones 21, 22 y 30).

Macroscópicamente se objetivó crecimiento tumoral, con características similares a las descritas en las series IA, IB, IVA y IVB. El volumen tumoral alcanzado osciló entre 204 y 1320, con una media de 906 milímetros cúbicos (ver tabla).

	SERIE	NECROPSIA	LARGO	ANCHO	ALTO	VOLUMEN	
RATON 11	IB	16 DIAS	13	6	5	204	
RATON 12	IB	18 DAS	13	13	6	531	
RATON 19	IVA	28 DIAS	20	14	7	1026	MEDIA
RATON 20	IVB	19 DIAS	15	12	8	754	906
RATON 21	IB	28 DIAS	17	15	10	1335	
RATON 22	IB	28 DIAS	15	14	12	1320	DES. ST.
RATON 30	IVB	28 DIAS	15	14	10	1100	441
RATON 31	IVA	25 DIAS	16	13	11	1198	
RATON 32	IA	17 DIAS	10	8	6	251	
RATON 62	IVB	28 DIAS	16	16	10	1340	

El ratón 97 correspondiente al subgrupo VIA (irradiación de la suspensión y el lecho e implante antes de 24 horas) se dejó evolucionar durante 28 días, la necropsia

reflejó datos de presencia milimétrica similares a los reportados en los otros animales de la serie sacrificados a los catorce días, sin evidenciarse signos de crecimiento neoplásico.

4.1.2 METÁSTASIS LINFÁTICAS O HEMATÓGENAS

En la tabla adjunta se presenta la relación de los animales en los que al sacrificio se observó la existencia bien de metástasis linfáticas bien hematógenas.

En todos los animales de las series control (bien de implante de tumor sólido o de suspensión celular de melanoma) se encontró en la necropsia adenopatías ilíacas homolaterales afectas por melanoma (figura 14), en el ratón 142 aparecieron también adenopatías mesentéricas infiltradas por tumor.

A los catorce días, fecha de la necropsia, en ningún animal de las series control se evidenciaron metástasis hematógenas.

En seis de los animales de la serie IVA (irradiación del lecho e implante inmediato de suspensión celular) se encontraron metástasis ilíacas homolaterales, señalar que fue en estos animales en los que mayor crecimiento tumoral se encontró en la necropsia (mayor de 500 milímetros cúbicos); en el resto de los animales en los que se irradió el lecho previo al implante tumoral (series IA, IB, IVA, IV B) no se evidenciaron metástasis linfáticas. En ninguno de los animales de las series citadas se apreciaron metástasis hematógenas a los catorce días post-implante tumoral.

En cuanto a los resultados obtenidos en la serie Especial (con un seguimiento desde la irradiación del lecho hasta la necropsia superior a los 14 días) podemos señalar que en ocho animales se evidenciaron metástasis linfáticas (regionales, abdominales y mediastínicas) y en seis ratones encontramos metástasis hematógenas (pulmonares en cuatro, hepáticas en dos, carcinomatosis peritoneal en uno) (figuras 15 y 16), coincidiendo este dato con aquellos animales con un mayor tiempo de evolución tumoral sobre lecho irradiado.

	<i>Serie</i>	<i>Volumen</i>	<i>Tiempo</i>	<i>Metástasis Linfáticas</i>	<i>Metástasis Hematógenas</i>
Ratón 138	Control t.s.	503	14 días	Sí	no
Ratón 139	Control t.s.	864	14 días	Sí	no
Ratón 140	Control t.s.	785	14 días	Sí	no
Ratón 141	Control t.s.	419	14 días	Sí	no
Ratón 142	Control t.s.	838	14 días	Sí	no
Ratón 143	Control t.s.	733	14 días	Sí	no
Ratón 144	Control t.s.	785	14 días	Sí	no
Ratón 145	Control t.s.	503	14 días	Sí	no
Ratón 146	Control t.s.	829	14 días	Sí	no
Ratón 147	Control t.s.	817	14 días	Sí	no
Ratón 155	Control s.c.	880	14 días	Sí	no
Ratón 156	Control s.c.	1089	14 días	Sí	no
Ratón 157	Control s.c.	1089	14 días	Sí	no
Ratón 158	Control s.c.	785	14 días	Sí	no
Ratón 159	Control s.c.	880	14 días	Sí	no
Ratón 160	Control s.c.	952	14 días	Sí	no
Ratón 161	Control s.c.	942	14 días	Sí	no
Ratón 162	Control s.c.	1021	14 días	Sí	no
Ratón 192	Control s.c.	785	14 días	Sí	no
Ratón 193	control s.c.	950	14 días	Sí	no
Ratón 42	IV A	524	14 días	Sí	no
Ratón 43	IV A	524	14 días	Sí	no
Ratón 44	IV A	524	14 días	Sí	no
Ratón 45	IV A	524	14 días	Sí	no
Ratón 46	IV A	524	14 días	Sí	no
Ratón 11	Especial	204	16 días	No	no
Ratón 12	Especial	531	18 días	Sí	no
Ratón 19	Especial	1026	28 días	Sí	sí
Ratón 20	Especial	754	19 días	Sí	no
Ratón 21	Especial	1335	28 días	Sí	sí
Ratón 22	Especial	1320	28 días	Sí	sí
Ratón 30	Especial	1100	28 días	Sí	sí

Ratón 31	Especial	1198	25 días	Sí	sí
Ratón 32	Especial	251	17 días	No	no
Ratón 62	Especial	1340	28 días	Sí	sí

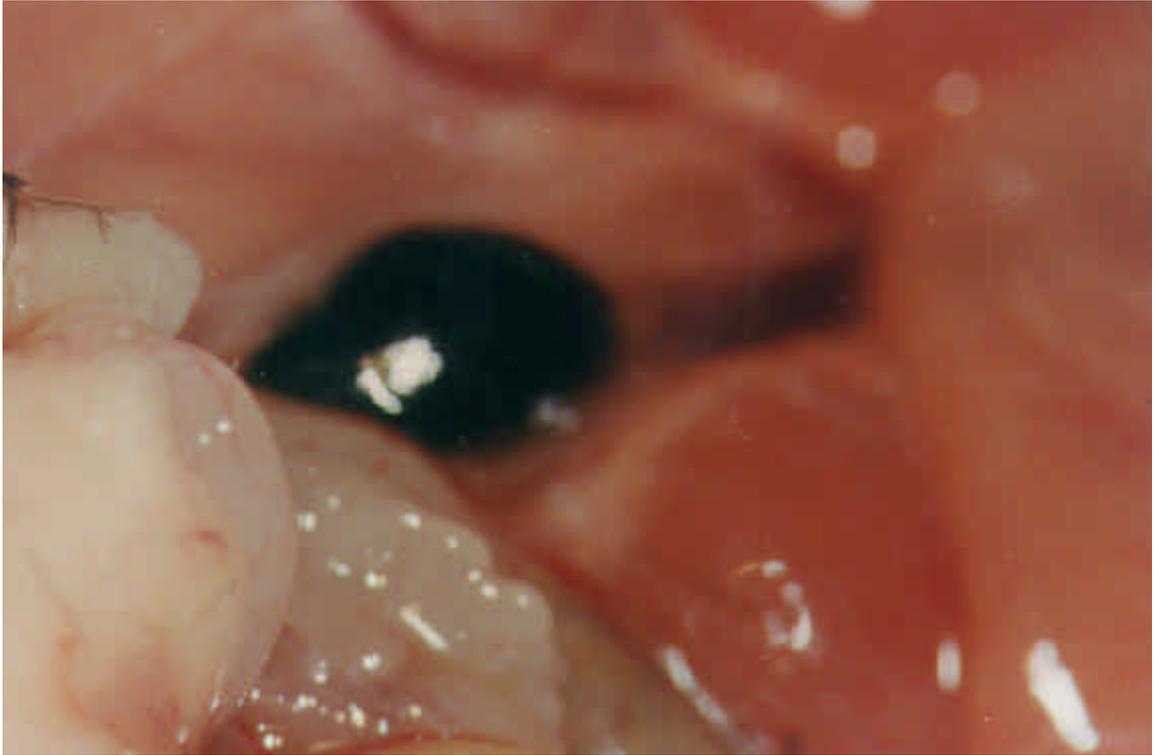


Figura 14: Metástasis linfática de melanoma

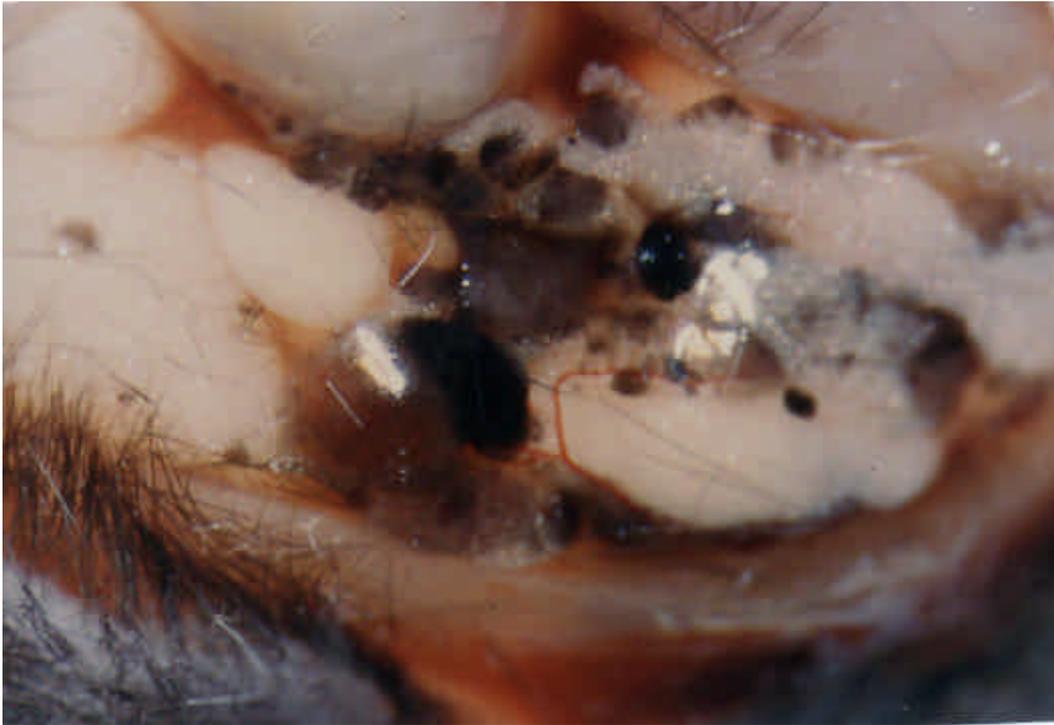


Figura 15: Carcinomatosis peritoneal



Figura 16: Metástasis pulmonares de melanoma

4.2 ANALISIS ESTADISTICO

4.2.1 VOLUMEN TUMORAL

En el Anexo 4 se recogen las medidas en milímetros cúbicos del volumen alcanzado por el melanoma en las distintas series, así como las distintas variables introducidas para el análisis estadístico con el programa SPSS para windows.

Hemos analizado el comportamiento tumoral frente a la irradiación del lecho, del tumor o de ambos, así como la posible influencia del intervalo temporal o el tipo de implante tumoral.

Aplicamos para el estudio estadístico el análisis de la varianza (ANOVA), cuando las comparaciones eran entre tres o más grupos y la T-Student para comparar muestras independientes cuando el número de grupos era de dos. Inicialmente aplicamos ANOVA con el conjunto de datos para obtener si existían diferencias significativas según las diferentes variables establecidas: elemento irradiado, intervalo entre irradiación e implante y tipo de elemento neoplásico implantado.

En la tabla 1 se reflejan los resultados globales que indican que existen diferencias significativas con $p < 0.001$ cuando analizamos bien la variable “irradiación”, bien la variable “intervalo temporal”, sin entrar a valorar en que punto se produce la significación estadística; para obtener esta información realizaremos comparaciones a posteriori para cada variable.

En referencia a la variable “tipo de implante tumoral” el resultado de ANOVA concluye que no hay diferencias significativas ($p = 1,000$) en cuanto al crecimiento del implante cuando comparábamos tumor sólido frente a suspensión celular de melanoma (tabla 2)

Tabla 1

ANOVA

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Volumen tumoral	Inter-grupos	10993111	3	3664370	341,952	,000
	Intra-grupos	1457383,1	136	10716,052		
	Total	12450495	139			
intervalo irradiación implante	Inter-grupos	38,571	3	12,857	58,286	,000
	Intra-grupos	30,000	136	,221		
	Total	68,571	139			
tipo de implante tumoral	Inter-grupos	,000	3	,000	,000	1,000
	Intra-grupos	35,000	136	,257		
	Total	35,000	139			

Tabla 2

ANOVA

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Volumen tumoral	Inter-grupos	9506548,5	2	4753274	221,199	,000
	Intra-grupos	2943946,1	137	21488,657		
	Total	12450495	139			
irradiación lecho-tumor	Inter-grupos	68,571	2	34,286	58,714	,000
	Intra-grupos	80,000	137	,584		
	Total	148,571	139			
tipo de implante tumoral	Inter-grupos	,000	2	,000	,000	1,000
	Intra-grupos	35,000	137	,255		
	Total	35,000	139			

4.2.1.1 Elemento irradiado

La comparación de los resultados obtenidos en las distintas series experimentales aporta resultados muy dispares según el elemento irradiado sea el lecho o el tumor. Así la irradiación del lecho produce diferencias notables en cuanto al volumen tumoral

alcanzado frente al de las series control, en las que el volumen tumoral alcanzado osciló entre 419 y 1089 milímetros cúbicos, mientras que cuando se irradiaba el lecho dicho volumen entre 63 y 524 milímetros cúbicos. Dicha diferencia fue más marcada cuando comparamos con los resultados obtenidos al irradiar el implante tumoral (oscilando en estos casos el material negro-parduzco entre 0,10 y 2,10 milímetros cúbicos) o cuando irradiábamos tumor y lecho (con variación en estos casos entre 0,05 y 1,10 milímetros cúbicos) (tabla 3)

Tabla 3

			Recuento	Mínimo	Máximo	Media	Desviación típica
irradiación lecho-tumor	control	Volumen tumoral	20	419,00	1089,00	823,60	180,99
	irradiación del lecho	Volumen tumoral	40	63,00	524,00	238,23	146,32
	irradiación del tumor	Volumen tumoral	40	,10	2,10	,66	,52
	irradiación de lecho y	Volumen tumoral	40	,05	1,10	,30	,26

Utilizando Análisis de la varianza (ANOVA) obtenemos que existen diferencias significativas con $p < 0,001$ cuando la variable “elemento irradiado ” era analizado:

ANOVA

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Volumen tumoral	Inter-grupos	10993111	3	3664370	341,952	,000
	Intra-grupos	1457383,1	136	10716,052		
	Total	12450495	139			

Dado que ANOVA únicamente nos ha indicado la existencia de diferencias significativas sin especificarnos dónde se producen, procedimos a realizar comparaciones a posteriori del Análisis de la Varianza mediante el método de Scheffe (tabla 4) obteniendo los siguientes resultados :

- 1) La irradiación del lecho (series I y IV), del tumor (series II y V) o de ambos (series III y VI) frente a las series control produce diferencias significativas en cuanto al volumen tumoral alcanzado con $p < 0,001$.

- 2) La irradiación bien del tumor o bien del lecho y el tumor produce diferencias significativas frente a la irradiación exclusiva del lecho con $p < 0,001$.

- 3) La irradiación del tumor frente a la irradiación del lecho y tumor no condiciona diferencias significativas con $p = 1,000$

Tabla 4

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: Volumen tumoral
Scheffé

(I) irradiación lecho-tumor	(J) irradiación lecho-tumor	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
control	irradiación del lecho	585,3750*	28,350	,000	505,1222	665,6278
	irradiación del tumor	822,9395*	28,350	,000	742,6867	903,1923
	irradiación de lecho y tumor	823,2953*	28,350	,000	743,0425	903,5480
irradiación del lecho	control	-585,3750*	28,350	,000	-665,6278	-505,1222
	irradiación del tumor	237,5645*	23,147	,000	172,0384	303,0906
	irradiación de lecho y tumor	237,9203*	23,147	,000	172,3941	303,4464
irradiación del tumor	control	-822,9395*	28,350	,000	-903,1923	-742,6867
	irradiación del lecho	-237,5645*	23,147	,000	-303,0906	-172,0384
	irradiación de lecho y tumor	,3558	23,147	1,000	-65,1704	65,8819
irradiación de lecho y tumor	control	-823,2953*	28,350	,000	-903,5480	-743,0425
	irradiación del lecho	-237,9203*	23,147	,000	-303,4464	-172,3941
	irradiación del tumor	-,3558	23,147	1,000	-65,8819	65,1704

*. La diferencia entre las medias es significativa al nivel .05.

4.2.1.2. Intervalo temporal

El análisis descriptivo (tabla 5) nos refleja una importante variación del volumen tumoral alcanzado frente a las series control de las series que recibieron irradiación y por lo tanto que se distribuyeron según intervalo temporal en implante inmediato tras irradiación (series A) o tras una semana (series B).

La comparación del volumen alcanzado a los catorce días tras implante tumoral según la variable temporal nos aporta datos muy homogéneos, oscilando el volumen tumoral alcanzado en las series A entre 0,10 y 524 milímetros cúbicos con una media de 92,86 milímetros cúbicos y en las series B entre 0,05 y 418 milímetros cúbicos, con una media de 66,60 milímetros cúbicos.

Tabla 5

			Recuento	Mínimo	Máximo	Media	Desviación típica
intervalo irradiación implante	no irradiación	Volumen tumoral	20	419,00	1089,00	823,60	180,99
	implante inmediato	Volumen tumoral	60	,10	524,00	92,86	164,30
	intervalo de 7 días	Volumen tumoral	60	,05	418,00	66,60	111,15

El análisis estadístico de la influencia de la variable “temporal” sobre el volumen tumoral alcanzado, utilizando ANOVA resulta estadísticamente significativo con $p < 0,001$.

ANOVA

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Volumen tumoral	Inter-grupos	9506548,5	2	4753274	221,199	,000
	Intra-grupos	2943946,1	137	21488,657		
	Total	12450495	139			

Utilizando el método de Scheffe del Análisis de la Varianza (tabla 6) para comparaciones a posteriori obtenemos:

- 1) Cuando comparamos los resultados obtenidos al realizar el implante tumoral bien inmediatamente tras irradiación (series A) o tras una semana (series B) frente a las series control se obtiene que existen diferencias significativas con $p < 0,001$.
- 2) La comparación de la influencia temporal sobre el volumen tumoral alcanzado (series A o implante inmediato frente a las series B o implante diferido tras siete días) no resulta estadísticamente significativa $p = 0,619 (> 0,05)$.

Tabla 6

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: Volumen tumoral
Scheffé

(I) intervalo irradiación implante	(J) intervalo irradiación implante	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
no irradiación	implante inmediato	730,7430*	37,849	,000	637,0750	824,4110
	intervalo de 7 días	756,9968*	37,849	,000	663,3289	850,6648
implante inmediato	no irradiación	-730,7430*	37,849	,000	-824,4110	-637,0750
	intervalo de 7 días	26,2538	26,764	,619	-39,9794	92,4871
intervalo de 7 días	no irradiación	-756,9968*	37,849	,000	-850,6648	-663,3289
	implante inmediato	-26,2538	26,764	,619	-92,4871	39,9794

*. La diferencia entre las medias es significativa al nivel .05.

4.2.1.3 Tipo de implante

El análisis descriptivo de los resultados obtenidos (tabla 7) según el tipo de implante tumoral refleja valores similares en cuanto al volumen tumoral alcanzado, oscilando el mismo entre 0,05 y 864 milímetros cúbicos, con una media de 153,35 milímetros cúbicos cuando el implante era de tumor sólido y entre 0,06 y 1089 milímetros cúbicos, con una media de 218,65 milímetros cúbicos cuando se implantaba suspensión celular de melanoma.

Tabla 7

			Recuento	Mínimo	Máximo	Media	Desviación típica
tipo de implante tumoral	tumor sólido	Volumen tumoral	70	,05	864,00	153,35	253,71
	suspensión celular	Volumen tumoral	70	,06	1089,00	218,65	337,51

El análisis de la varianza (ANOVA) nos indica que la variable "tipo de implante tumoral" no es estadísticamente significativa con relación al volumen tumoral alcanzado a los catorce días con un valor de $p= 1,000$ (ver tablas 1 y 2). Dado que la comparación se realiza entre dos grupos (tumor sólido frente a suspensión celular de melanoma) y ANOVA puede no ser correcto realizamos también la comparación con la prueba T-Student para dos muestras independientes. En ambos casos obtenemos que la variable "tipo de implante tumoral" no produce diferencias significativas con relación al volumen tumoral alcanzado con $p=0,198$ (tablas 8 y 9).

Tabla 8

ANOVA

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Volumen tumoral	Inter-grupos	149245,11	1	149245,1	1,674	,198
	Intra-grupos	12301249	138	89139,489		
	Total	12450495	139			

tabla 9

Prueba de muestras independientes

	Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias							
	F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error típico de la diferencia	Intervalo de confianza para la media		
								Inferior	Superior	
volumen calculado según fórmula	7,912	,006	-1,292	138	,198	-65,7892	50,9027	66,4392	34,8608	
Se han asumido varianzas iguales			-1,292	127,547	,199	-65,7892	50,9027	66,5122	34,9338	
No se han asumido varianzas iguales										

4.3. HALLAZGOS MICROSCOPICOS

4.3.1 SERIES CONTROL

4.3.1.1. *Serie Control de tumor sólido*

Las características microscópicas vienen definidas por una proliferación celular sólida, con áreas de necrosis. Dicha proliferación infiltra entre las fibras musculares estriadas de los músculos adyacentes y en torno a estructuras nerviosas. En general, las masas neoplásicas están constituidas por células poligonales que poseen núcleos voluminosos con nucleolos prominentes (figura 17). Los citoplasmas son también amplios, claros o eosinófilos y presentan variable cantidad de pigmento, dependiendo del área examinada. Incluso es posible observar regiones donde se distingue alternancia de células melanóticas y amelanóticas (figuras 17 y 18). Los hechos previamente expuestos se observan con nitidez en cortes semifinos. Efectivamente, las células neoplásicas aparecen bien delimitadas, distinguiéndose en los núcleos uno ó, por lo general, varios nucleolos de diferente tamaño (figuras 19 y 20). La cromatina suele estar en su mayor parte desespiralizada y los límites nucleares son esféricos o presentan algunas escotaduras (figura 21). Los citoplasmas, amplios y con algunas microvacuolas (figuras 19 y 21), poseen melanosomas que, como se ha dicho, aparecen en un número variable. Con frecuencia se disponen en la periferia del citoplasma, presentándose como un punteado delimitante del mismo (figuras 20, 21 y 22). No obstante, hemos observado células en las que los melanosomas están en una cantidad elevada, distribuidos por todo el citoplasma y por las prolongaciones celulares (figura 20). Las mitosis son muy prominentes, poniéndose de manifiesto los cromosomas con gran nitidez (figuras 23,24). En las áreas donde las células neoplásicas infiltran el músculo

Figuras 17 y 18: Imágenes en microscopía óptica (Hematoxilina-Eosina) en las que se aprecia una proliferación celular sólida constituida por células poligonales de núcleos voluminosos y nucleolos prominentes. Es posible observar áreas con células melanóticas entremezcladas con otras amelanóticas. Se observan vasos de distinto calibre.

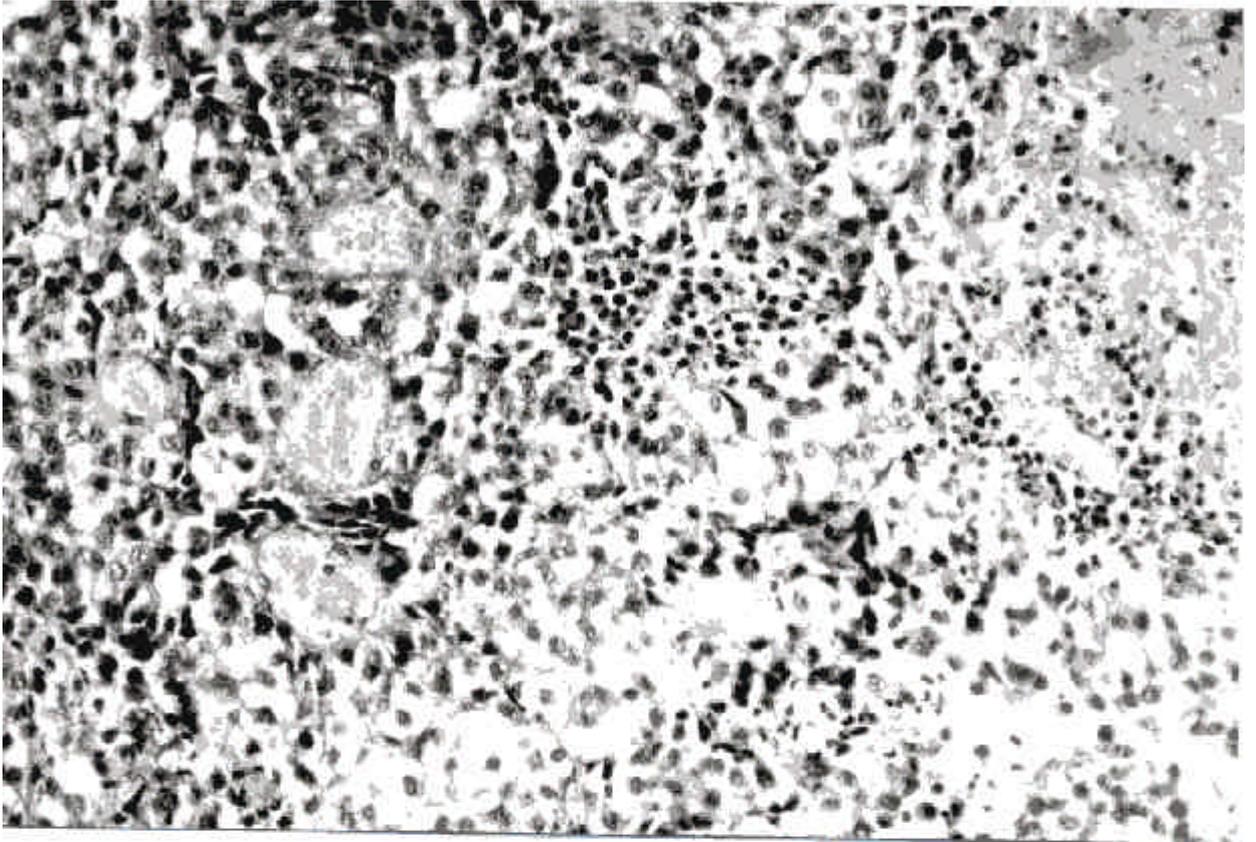
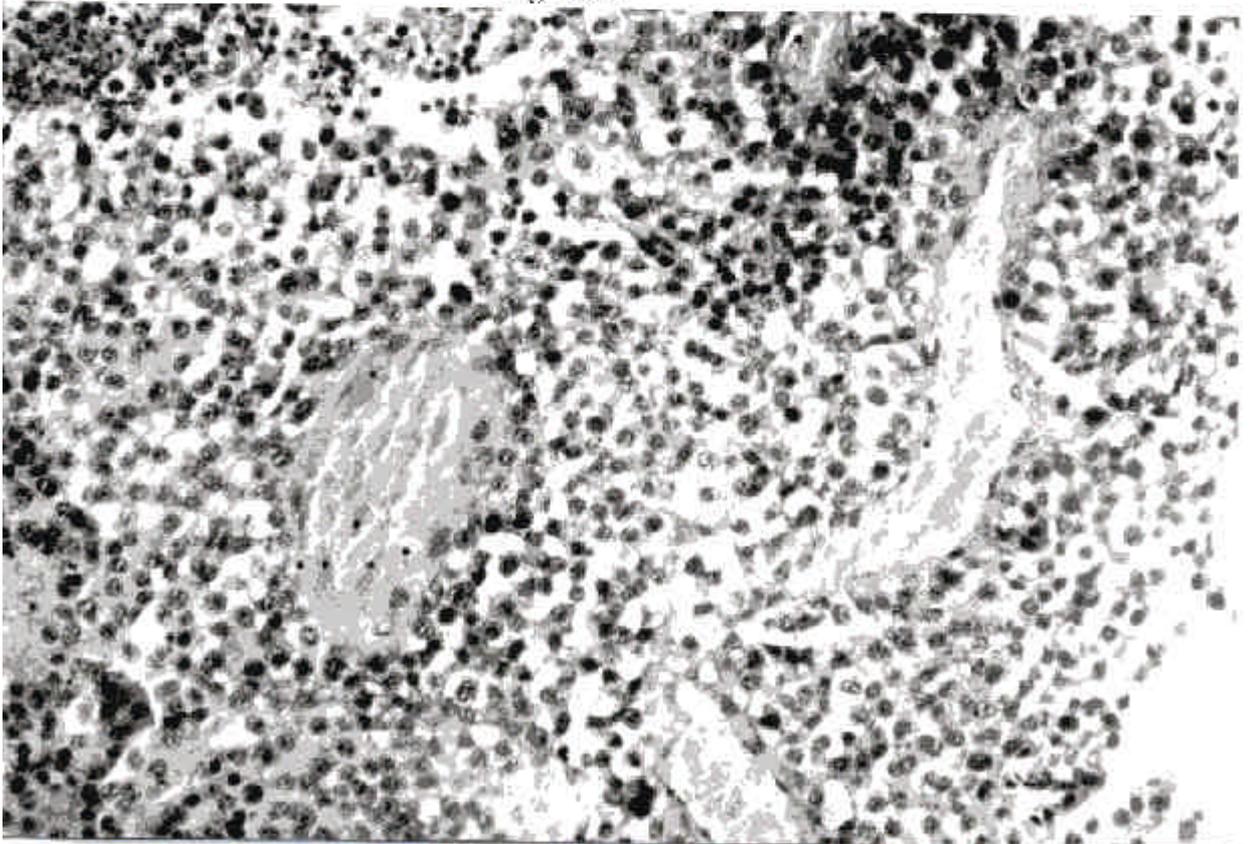


Figura 17



Figuras 19 y 20: Detalles en cortes semifinos en los que se distinguen claramente las células neoplásicas. Se aprecian con frecuencia en sus núcleos varios nucleolos de diferente tamaño.

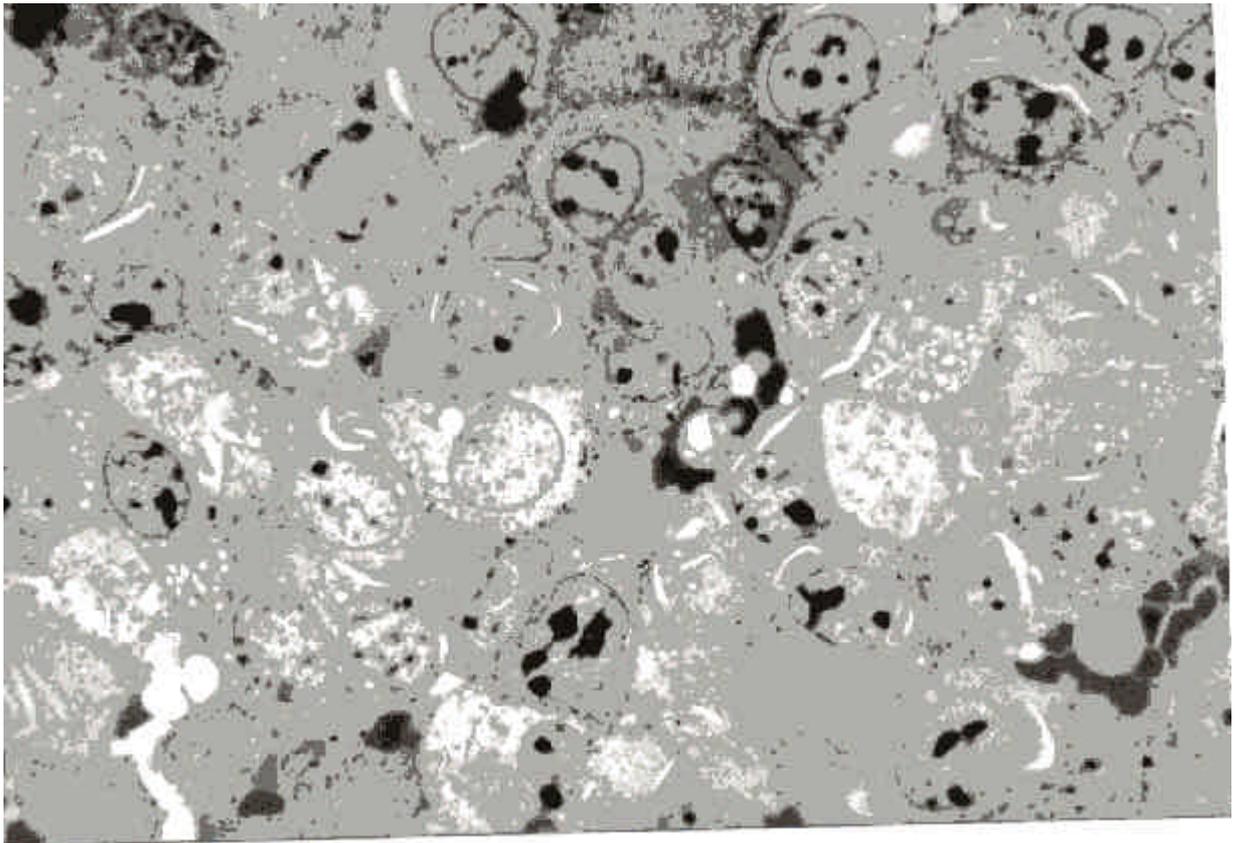


Figura 19

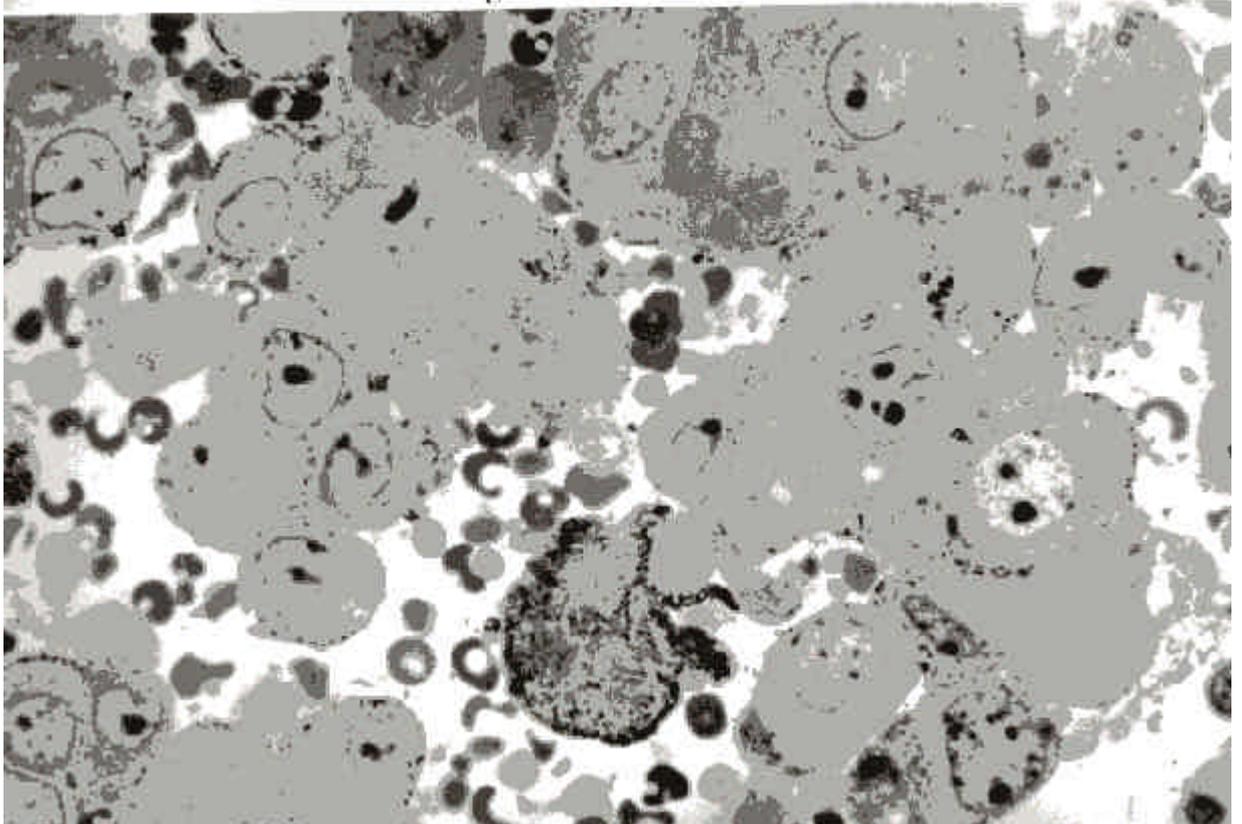


Figura 21: Area perteneciente al tejido neoplásico observada en un corte semifinos. Se distinguen como el núcleo que centra la imagen muestra profundas escotaduras y su cromatina, al igual que el resto de los núcleos, aparece desespiralizada; llama la atención en el citoplasma celular la existencia de abundantes microvacuolas.

Figura 22: Area neoplásica en la que se aprecian abundantes melanosomas en la periferia de las células tumorales. Se observa una figura de mitosis en una de las células próxima a fibras musculares estriadas.

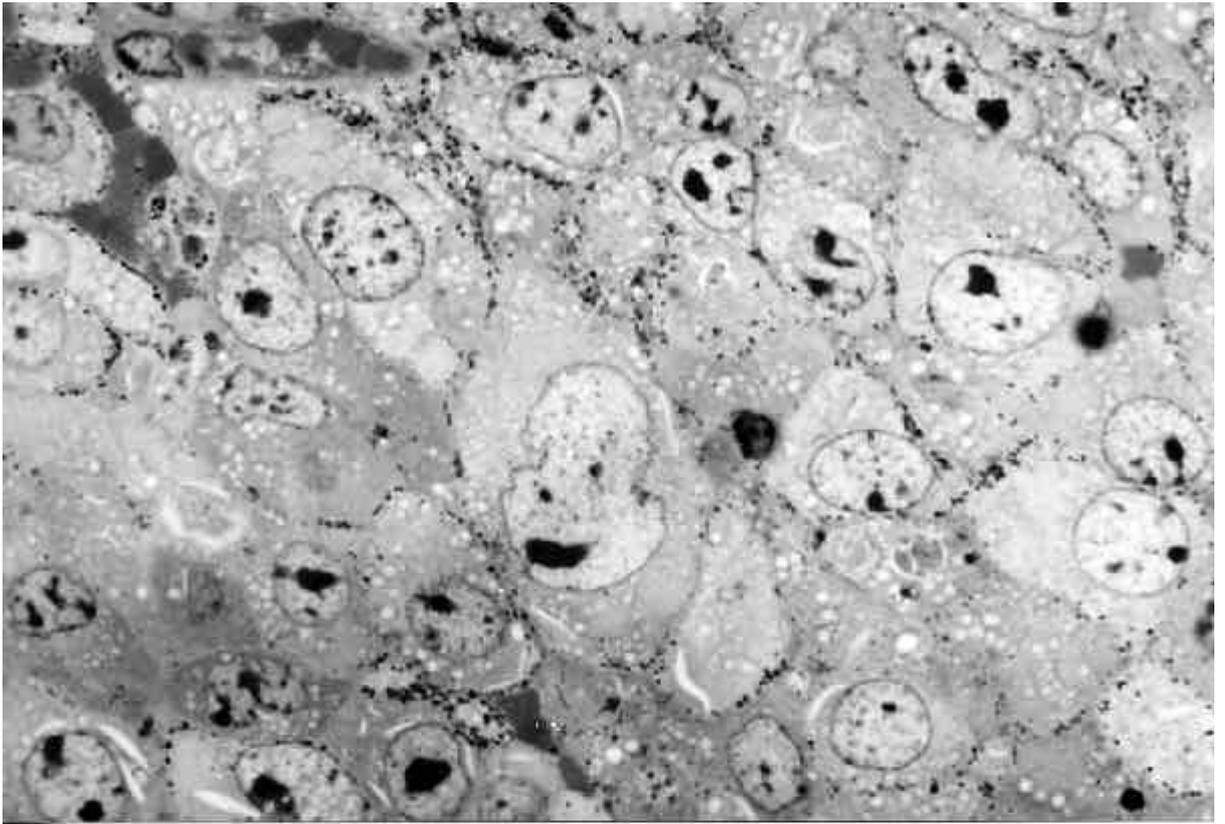
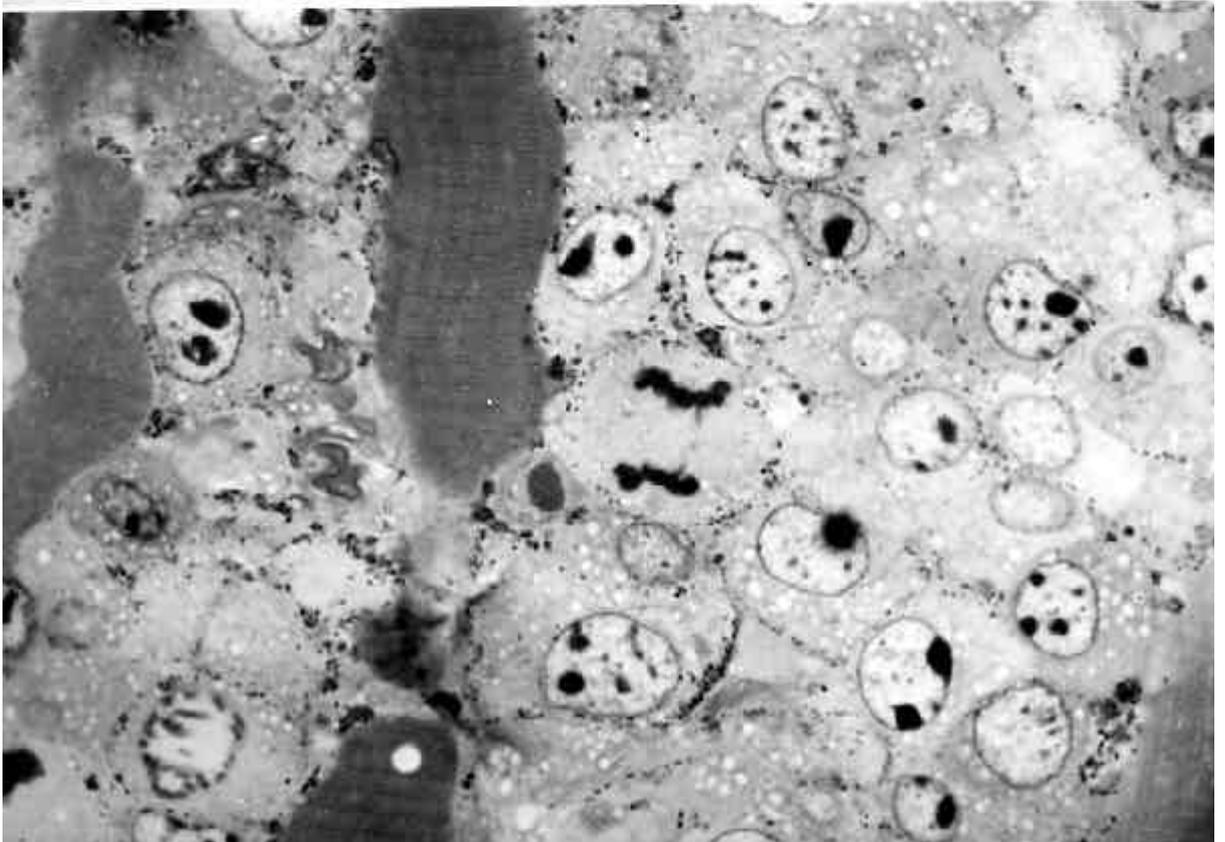


Figura 21



Figuras 23 y 24: Distintos territorios constituidos por células tumorales en las que se aprecia una intensa actividad mitótica. Apréciense la morfología de los cromosomas en algunas de estas mitosis.

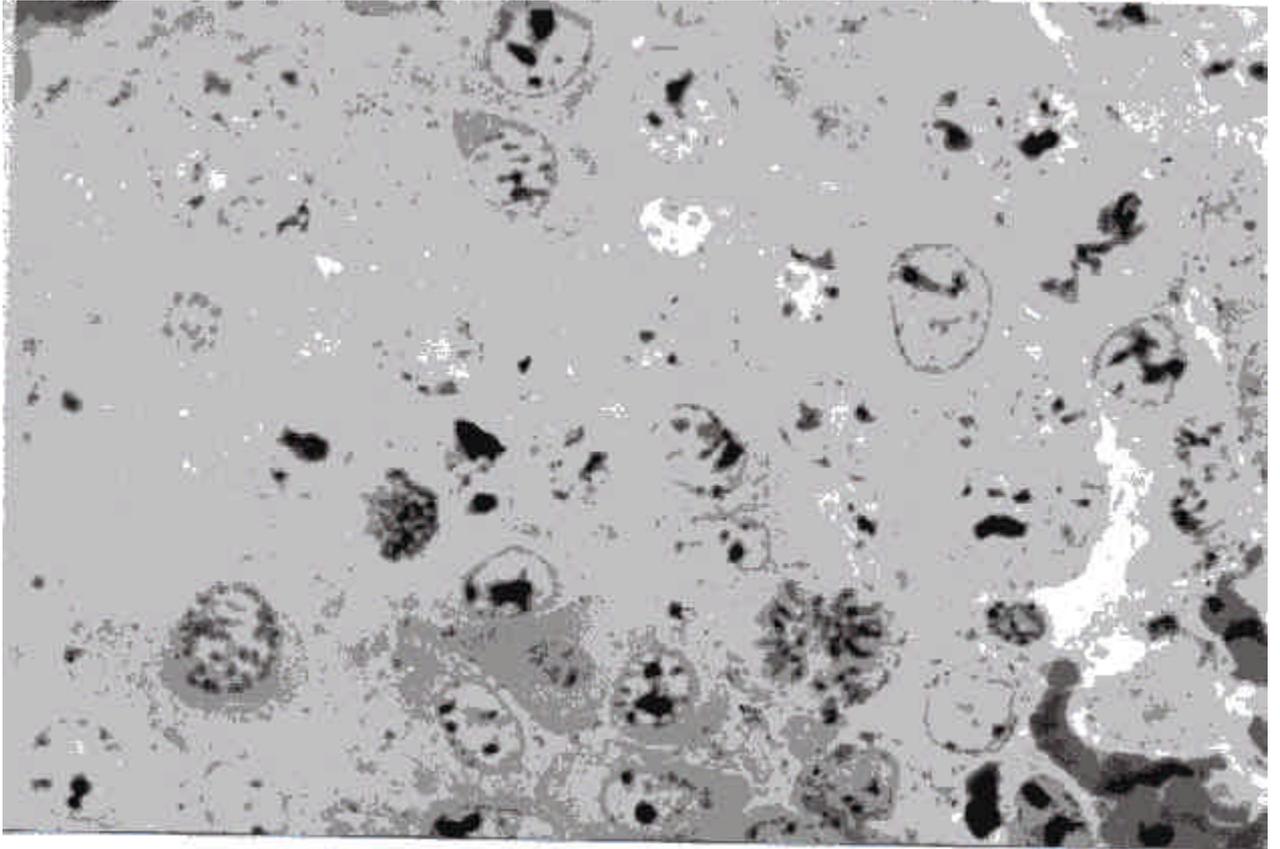
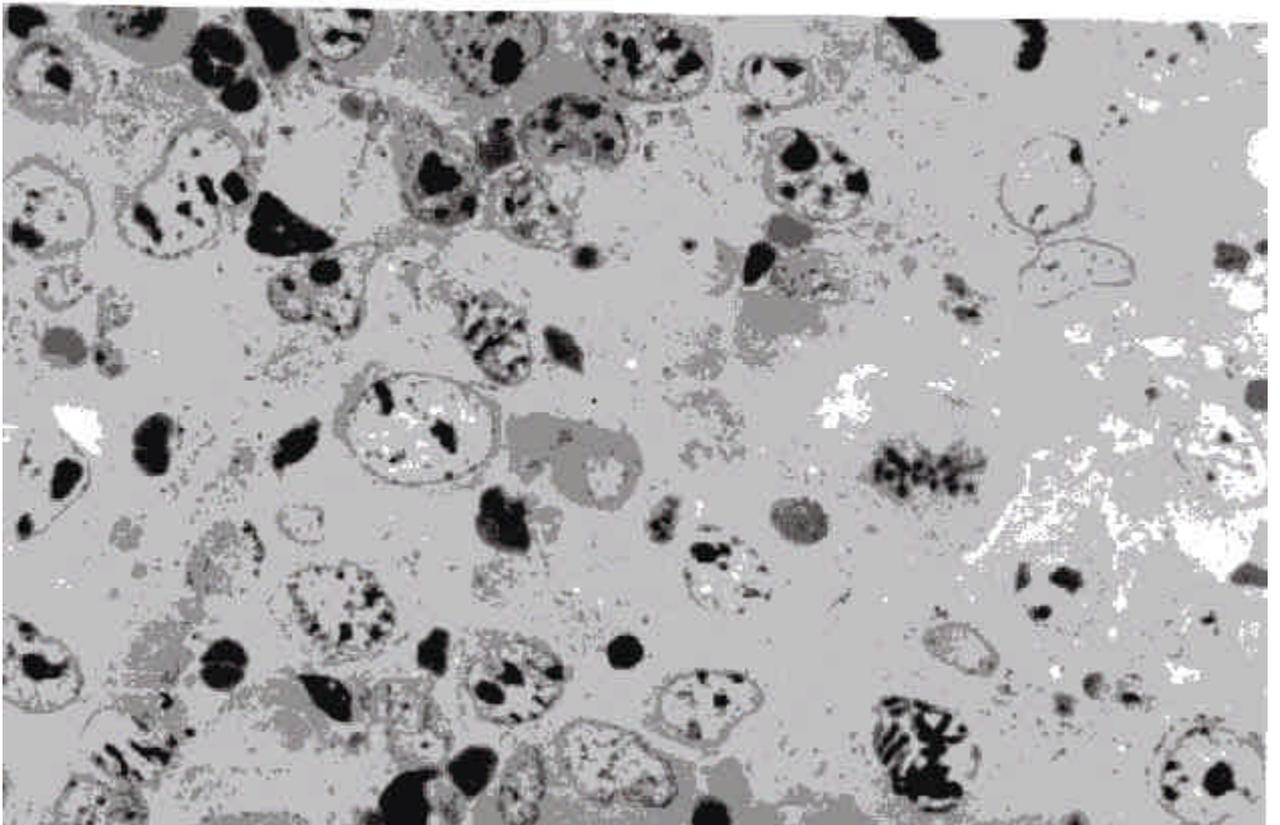


Figura 23



esquelético, las células musculares muestran considerables modificaciones, con alteraciones de los núcleos y pérdida más o menos acentuada de la normal estriación. Es llamativo observar cómo las células neoplásicas entran en íntimo contacto con dichas estructuras musculares.

Ultraestructuralmente se ponen de manifiesto los hechos previamente expuestos. Un dato de valor en la identificación precisa de las células viene dado por la demostración de melanosomas o pre-melanosomas en algunas aparentemente amelanóticas con microscopía óptica. Además de los melanosomas o pre-melanosomas, en los citoplasmas celulares se distinguen abundantes polirribosomas libres y algunas cisternas de retículo endoplásmico rugoso (figura 25). Se identifican también uniones de refuerzo entre membranas de células adyacentes. Asimismo resalta la diferente densidad que puede adquirir el hialoplasma celular en los elementos neoplásicos (figura 25). La cromatina en su mayor parte aparece desespiralizada, observándose pequeños grumos de heterocromatina debajo de la doble membrana nuclear (figuras 25 y 26). Los cromosomas se evidencian con gran nitidez en los cortes ultrafinos (figura 27), conservándose durante la fase divisional algunos de los gránulos correspondientes a melanosomas y pre-melanosomas. La ultraestructura permite también diferenciar con nitidez las células melánicas de los macrófagos, distinguiéndose en éstos últimos lisosomas secundarios que engloban agregados de melanosomas. Los macrófagos pueden también incorporar restos celulares (figura 28).

En el estroma hay variable vascularización, evidenciándose vasos de distinto calibre (figuras 17,18 y 29) revestidos por endotelio aplanado y con relativa frecuencia congestivos. Las células neoplásicas se disponen en íntima vecindad a los elementos

Figura 25: Imagen ultraestructural en la que se distinguen varios elementos celulares de diferente densidad, estrechamente unidos entre sí, muestran en su citoplasma melanosomas y pre-melanosomas, así como polirribosomas libres y cisternas de retículo endoplásmico rugoso.

Figura 26: Visión ultraestructural de dos células neoplásicas cuyos núcleos muestran la cromatina desespiralizada salvo pequeños acúmulos localizados bajo la membrana nuclear. Se distinguen claramente los nucleolos.

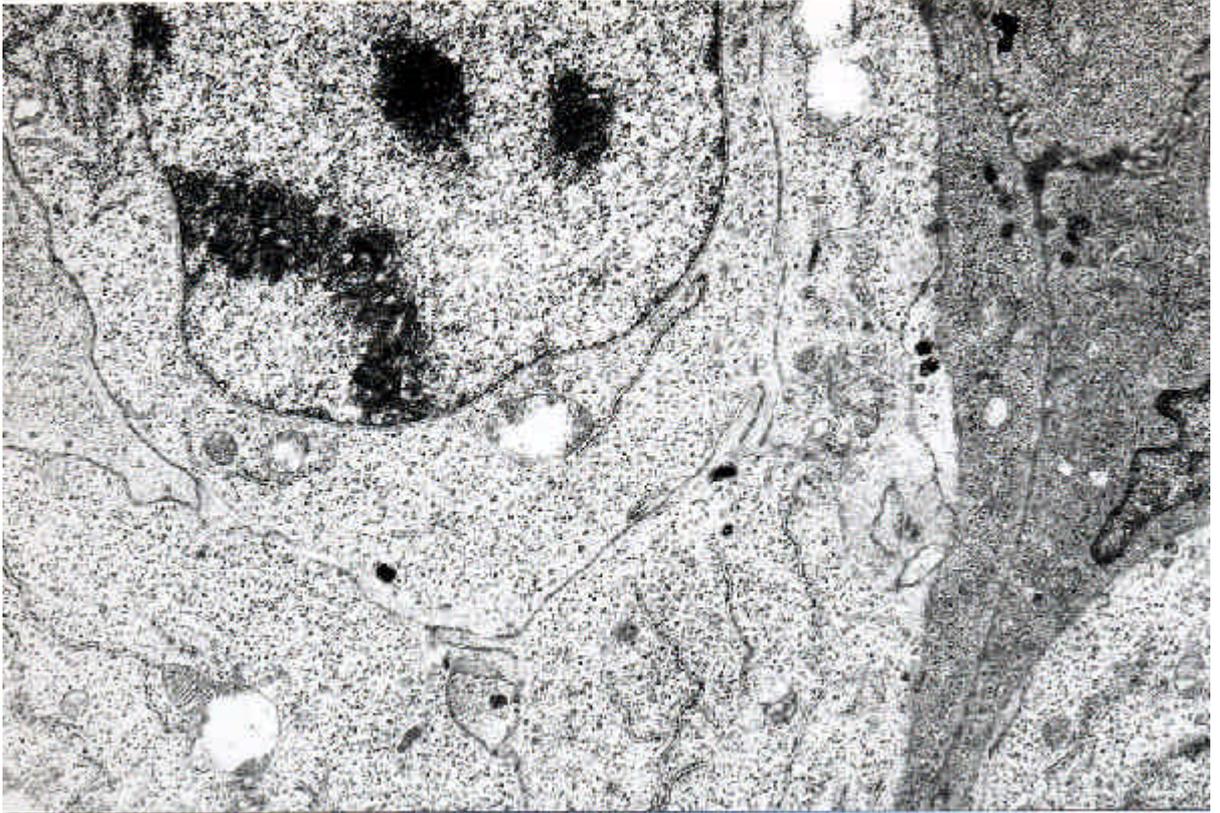


Figura 25

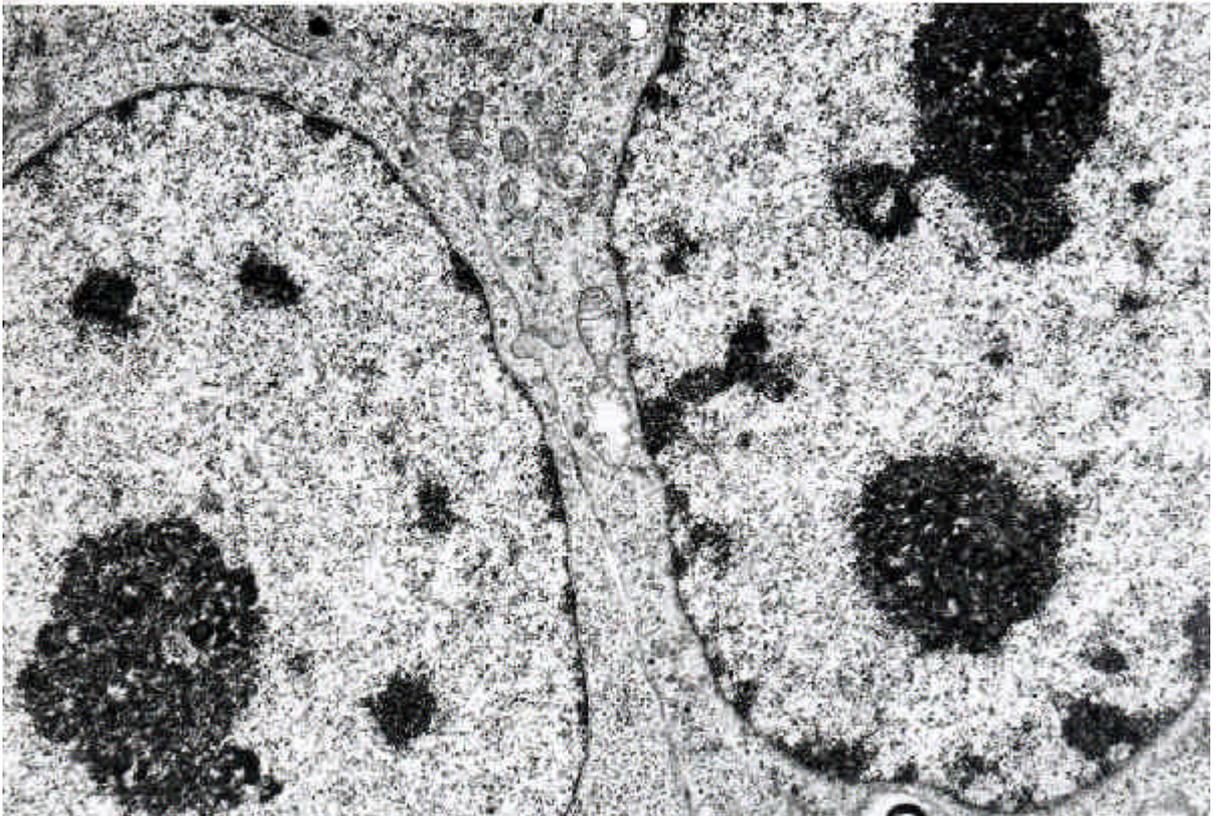


Figura 26

Figura 27: Visión ultraestructural de una célula neoplásica en mitosis. Se evidencian con nitidez los cromosomas, así como algunos gránulos correspondientes a melanosomas y pre-melanosomas

Figura 28: Imagen en corte ultrafino perteneciente a un macrófago, cuyo citoplasma aparece parcialmente ocupado por lisosomas secundarios englobando melanosomas y restos celulares.

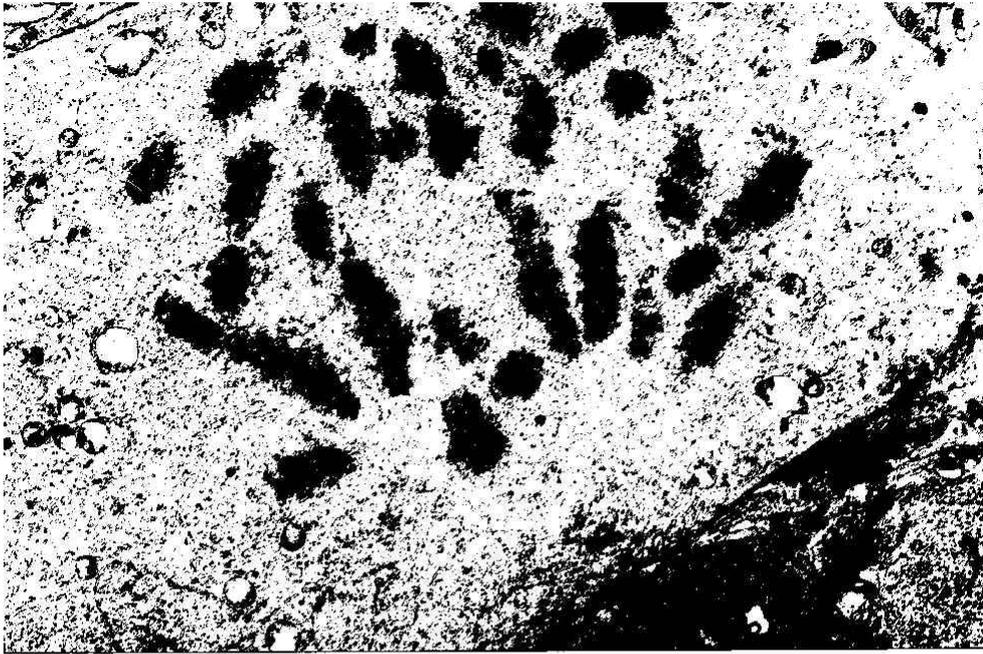


Figura 27

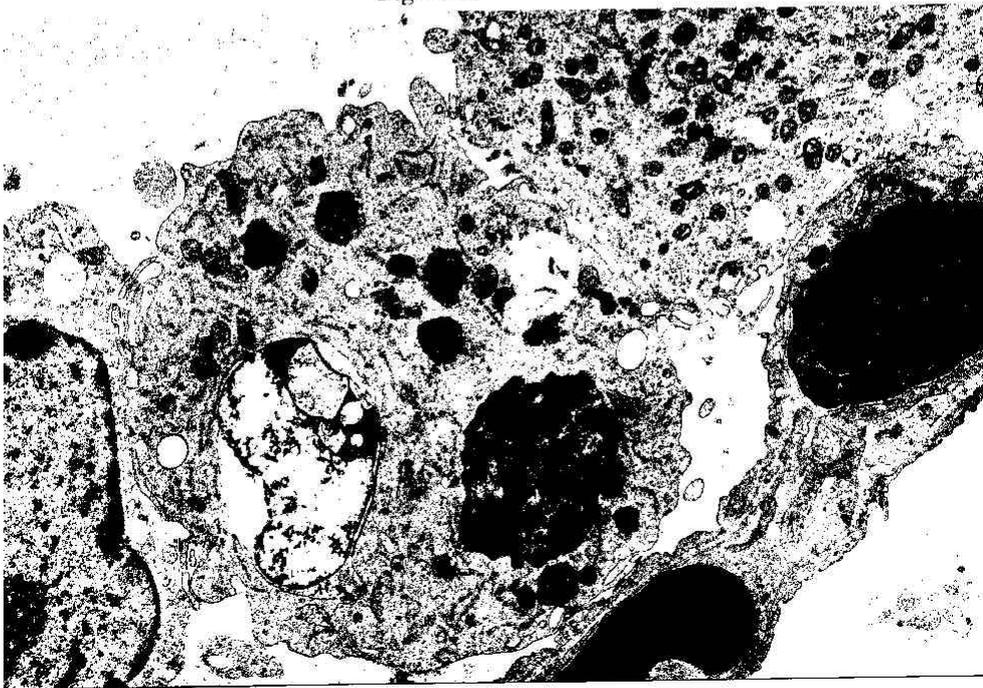


Figura 28

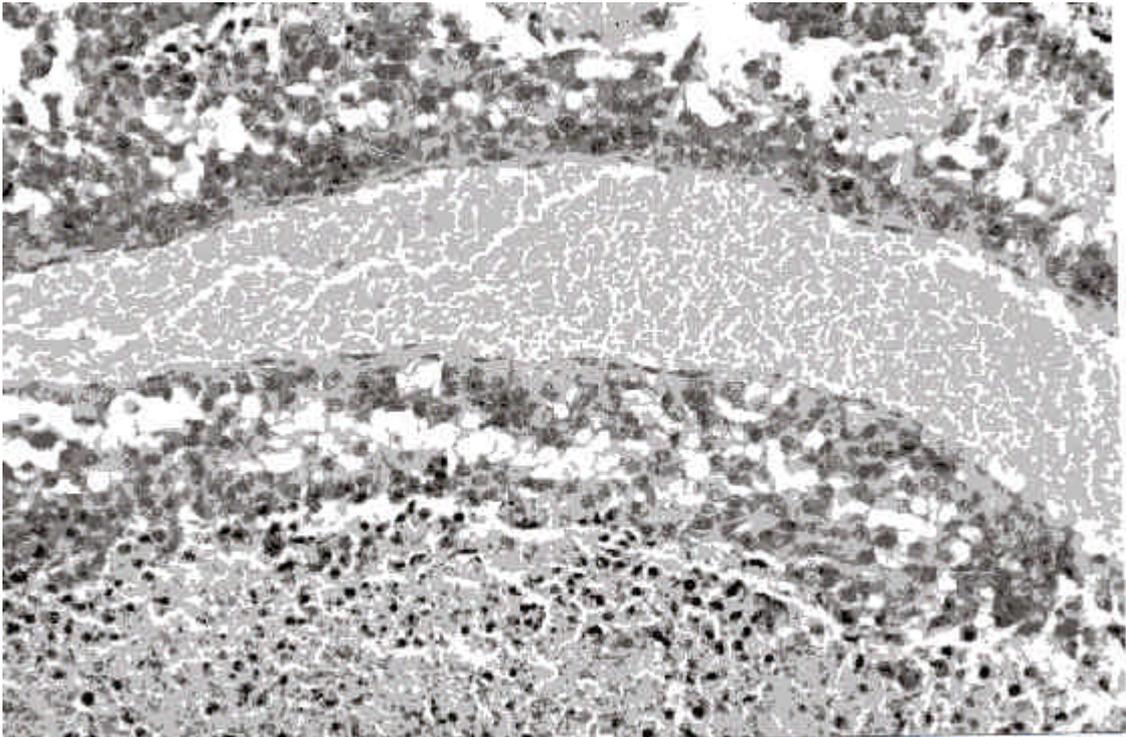


Figura 29: Area neoplásica en la que se distinguen un vaso sanguíneo congestivo, revestido por endotelio aplanado; se observa que los elementos neoplásicos se disponen en íntima vecindad a las paredes vasculares.

endoteliales. En el estroma se observa también un infiltrado inflamatorio, constituido por linfocitos, macrófagos y algunos leucocitos polimorfonucleares. Muchos de los macrófagos corresponden a melanófagos, los cuales poseen abundantes gránulos melánicos, correspondientes a lisosomas que han incorporado melanosomas liberados a partir de las células neoplásicas. Existen áreas necrobióticas, en las que los núcleos se hacen picnóticos, mientras que los límites celulares son imprecisos (figura 30). Las zonas de necrosis varían en amplitud, apareciendo con restos celulares, en los que no se reconoce la estructura primitiva. Con relativa frecuencia hemos observado áreas neoplásicas perivasculares conservadas, rodeadas por espacios necróticos, existiendo clara relación de la necrosis con su lejanía de los vasos sanguíneos (figura 31). La infiltración de los fascículos musculares estriados se observa con mayor frecuencia en las áreas periféricas de la neoformación. Aunque puede existir un “ frente delimitante” entre la neoplasia y los fascículos de células musculares estriadas (figura 32), en general este límite es infiltrante, de manera que se observan fibras o células musculares que van quedando englobadas entre las células neoplásicas (figuras 33 y 34).

El crecimiento en torno a los filetes nerviosos raramente se introduce por los espacios perineurales, aunque las células neoplásicas quedan en íntimo contacto con el epi-perinero (figura 35).

4.3.1.2. Serie control de suspensión celular

Las células neoplásicas de la suspensión celular fueron estudiadas bajo microscopía óptica y electrónica antes de su administración. En general aparecen como elementos bien delimitados, con núcleos ovoides, levemente escotados y con cromatina

Figura 30: Zona de la neoplasia que muestra signos de necrobiosis. Aparecen núcleos picnóticos y límites celulares imprecisos. Los vasos sanguíneos presentes se muestran dilatados y congestivos.

Figura 31: Area tumoral en la que llama la atención la presencia de elementos celulares neoplásicos conservados, en vecindad a un vaso sanguíneo. Las zonas alejadas del vaso muestran claros signos de necrosis.

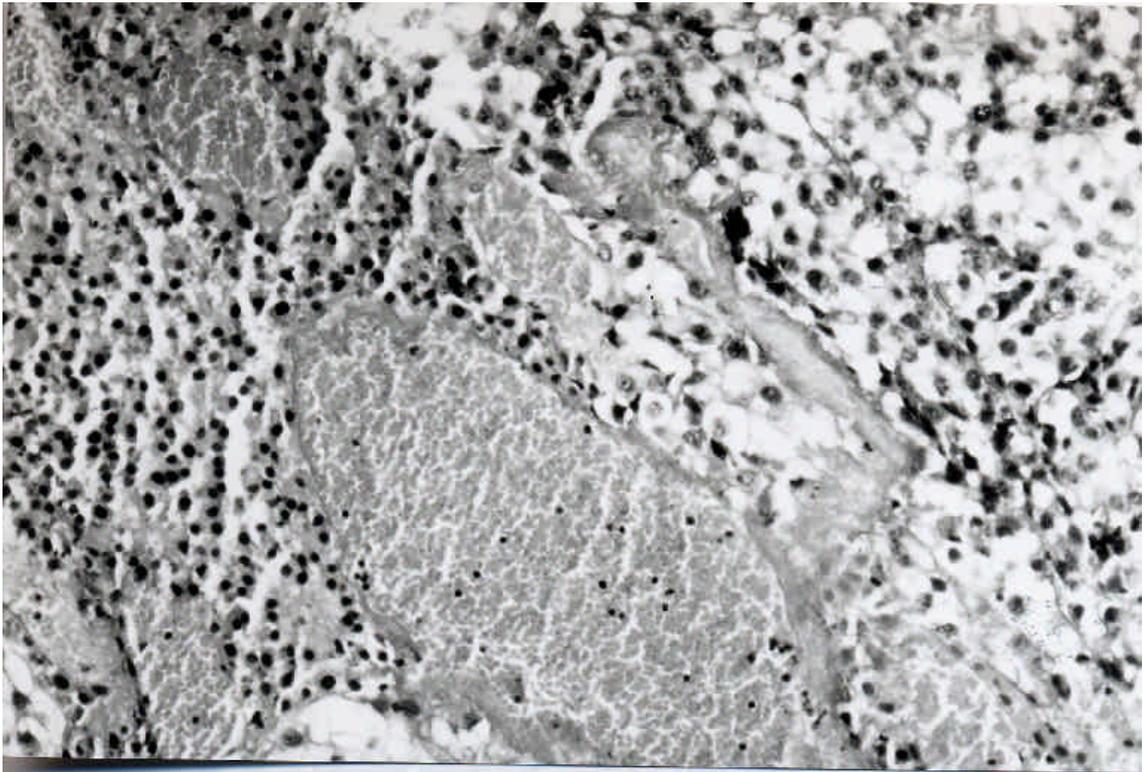


Figura 30

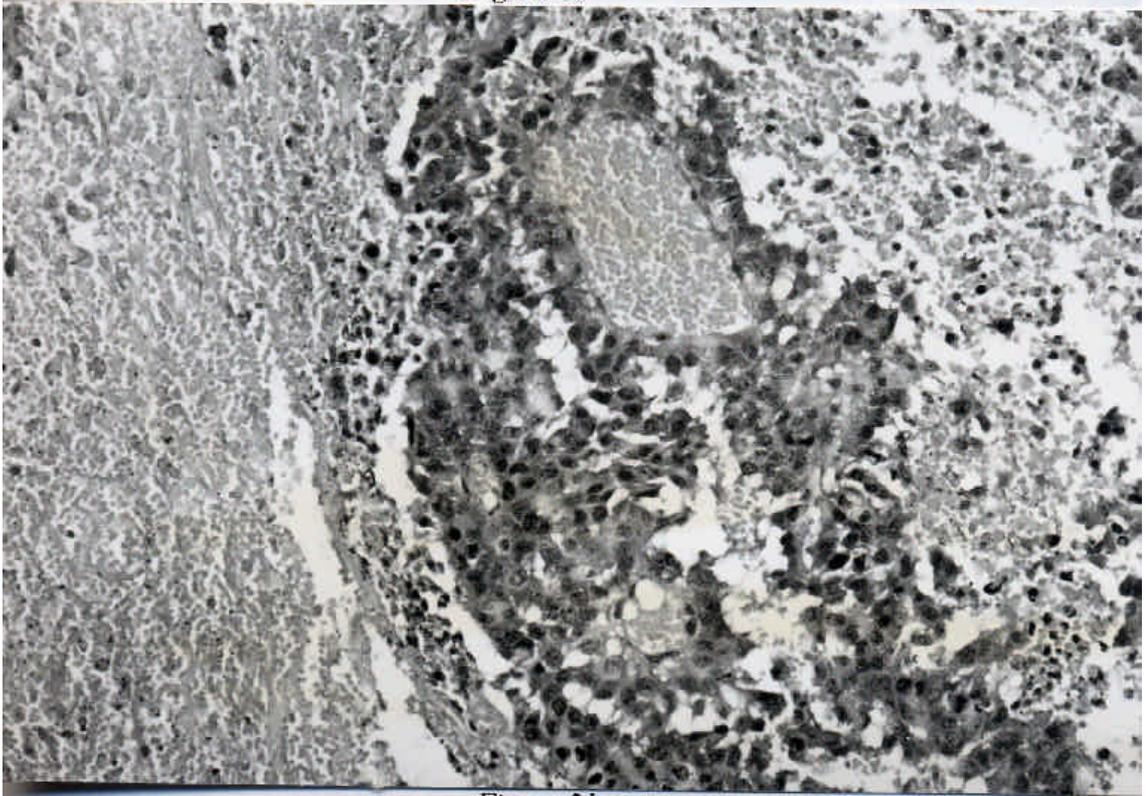


Figura 31

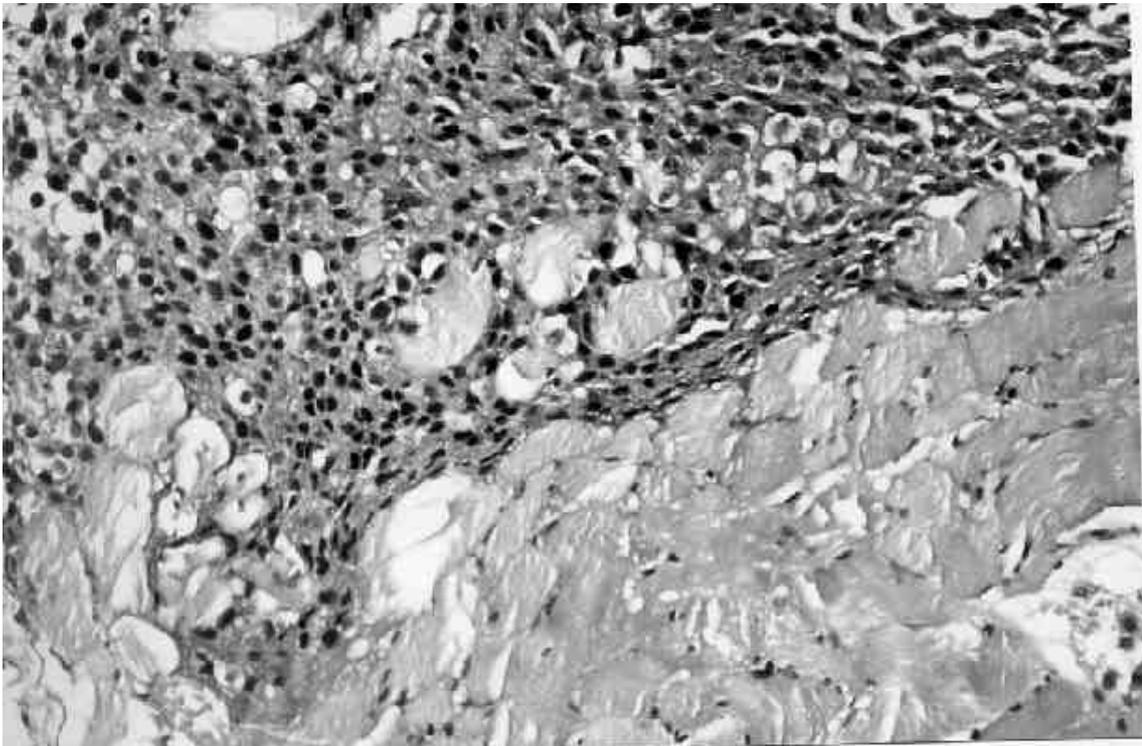


Figura 32: Territorio limítrofe entre tejido neoplásico y fibras musculares estriadas, que aparecen en la imagen cortadas transversal y oblicuamente.

Figuras 33 y 34: Distintas áreas en las que se demuestra el carácter infiltrante de las células neoplásicas. Nótese la existencia de células musculares estriadas aisladas englobadas entre las células tumorales (figura H).

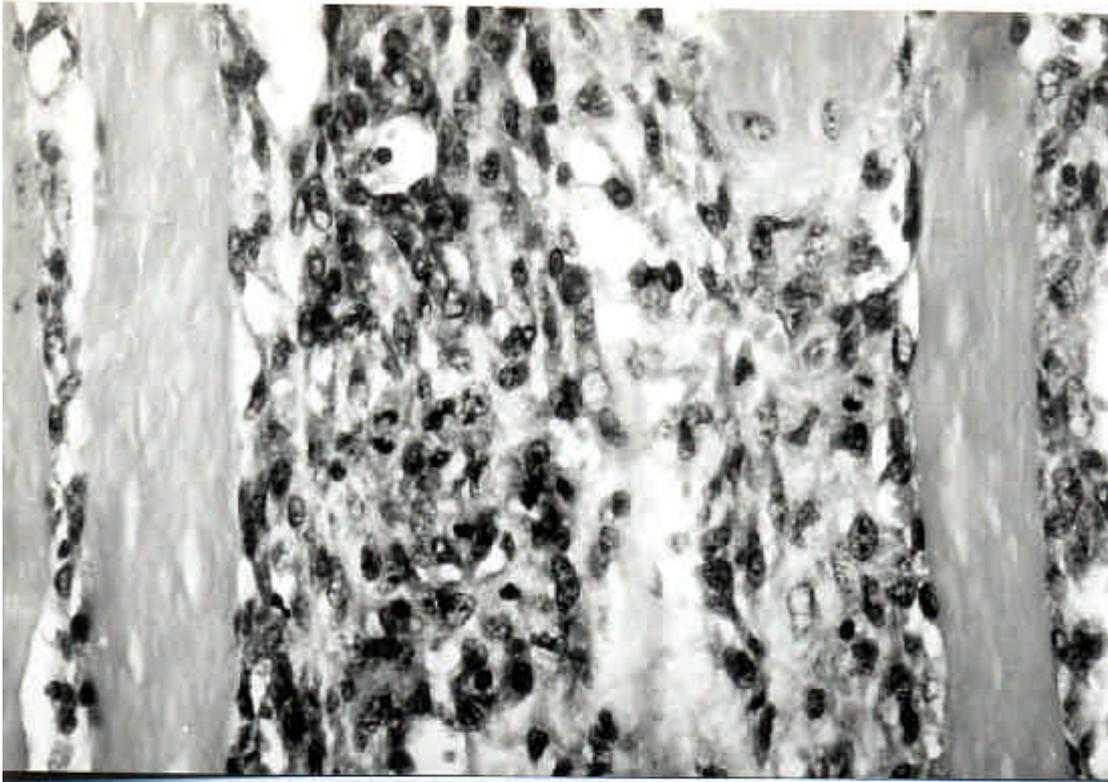


Figura 33

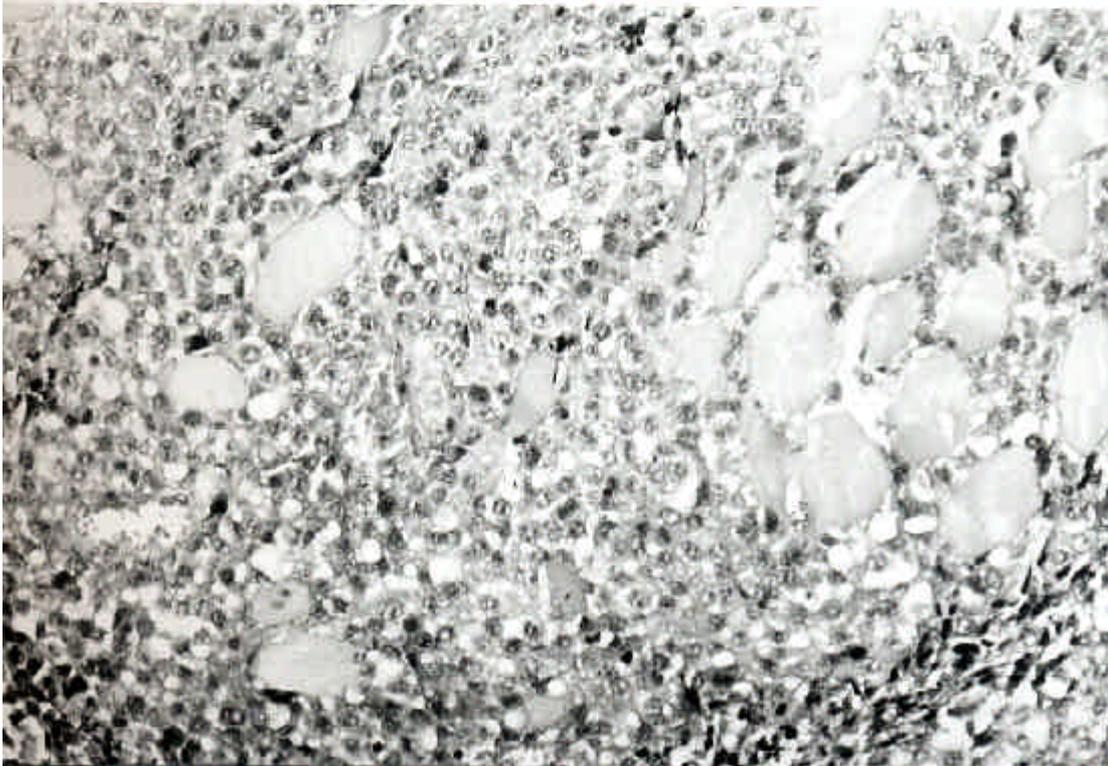


Figura 34

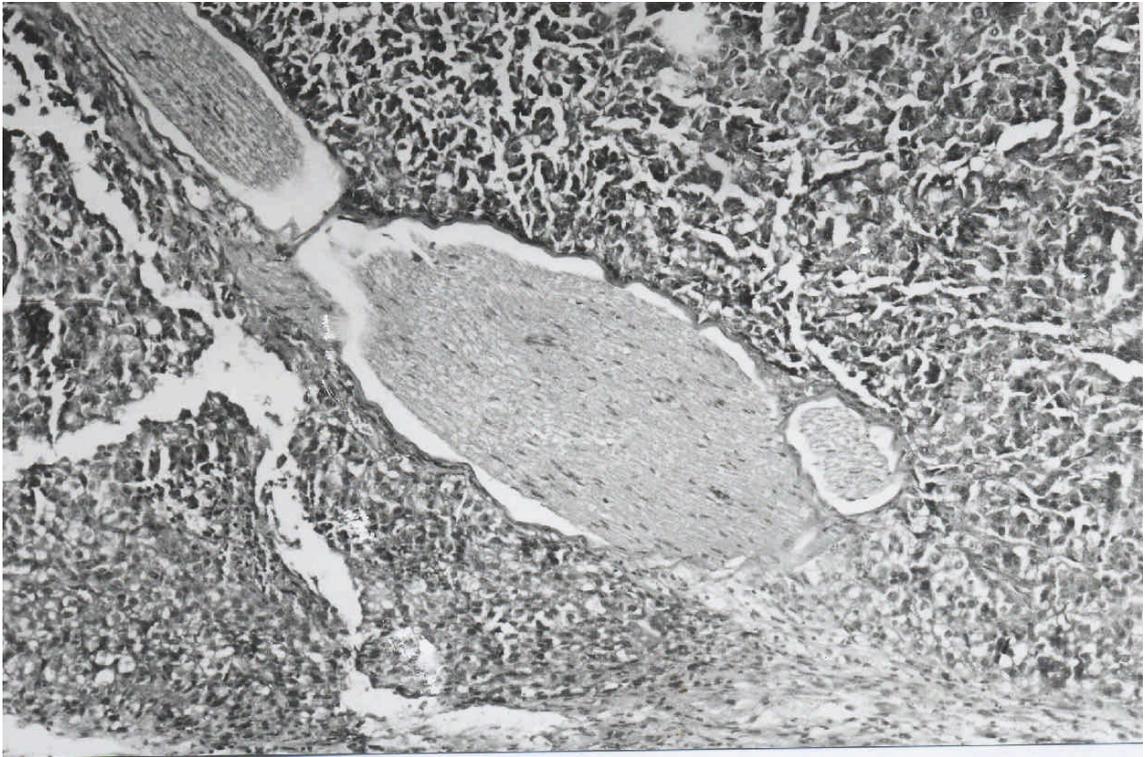


Figura 35: Detalle de un filete nervioso dispuesto entre células del melanoma. Se distingue la estrecha relación de éstas con el epi-perineuro.

en gran parte desespiralizada. Estas células suelen poseer nucleolos prominentes (figuras 36 y 37). El número de melanosomas varía considerablemente, siendo posible poner de manifiesto con microscopía electrónica la presencia de melanosomas y pre-melanosomas en células aparentemente amelanóticas con microscopía óptica (figuras 36 y 37).

La proporción de organelas es moderada, con abundantes polirribosomas libres, algunas cisternas de retículo endoplásmico rugoso, uno o varios dictiosomas de pequeñas dimensiones, variable número de filamentos y algunas vacuolas y mitocondrias elongadas o de configuración circular al corte, dotadas de crestas transversales.

Un hecho importante y a destacar es que en el cultivo celular se demostró únicamente la presencia de células melánicas, no observándose la existencia de elementos endoteliales o de otra naturaleza.

Una vez inoculadas las células, el estudio de las masas tumorales permite demostrar el crecimiento de una población celular sólida (figuras 38, 39 y 40) con variable pigmentación citoplásmica y focos de necrosis, así como una alta tasa divisional. En el estudio ultraestructural de dichas células se demuestra variable proporción de melanosomas y pre-melanosomas que permiten el diagnóstico aún en zonas amelanóticas (figuras 41 y 42). Se sigue poniendo de manifiesto la existencia de mitocondrias con crestas transversales, cisternas aisladas de retículo endoplásmico rugoso, uniones intercelulares, Aparato de Golgi moderadamente desarrollado, así como núcleos con elevada proporción de cromatina desespiralizada y nucleolos prominentes. Constatamos también, al igual que en la serie de control con implante de tumor sólido

Figuras 36 y 37: Imágenes ultraestructurales de células neoplásicas en cultivo. Se observa como su núcleo es ovoide con ligeras escotaduras y cromatina en gran parte despiralizada. Son evidentes en el citoplasma abundantes mitocondrias y algunas cisternas de retículo endoplásmico rugoso, así como algunos melanosomas.

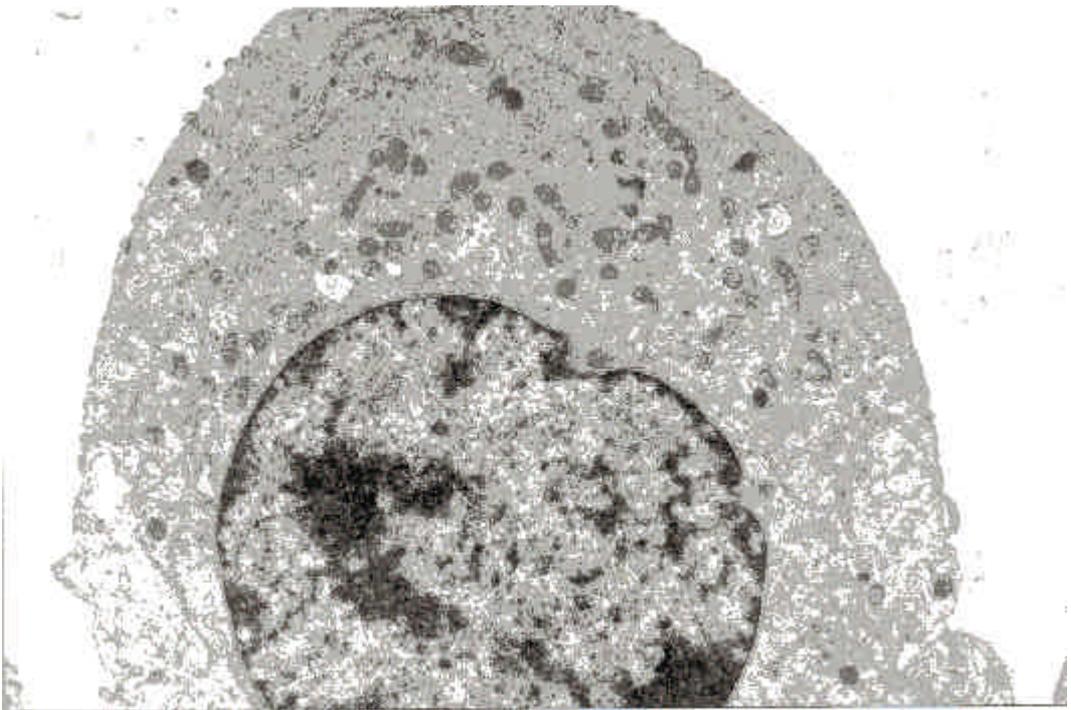


Figura 36

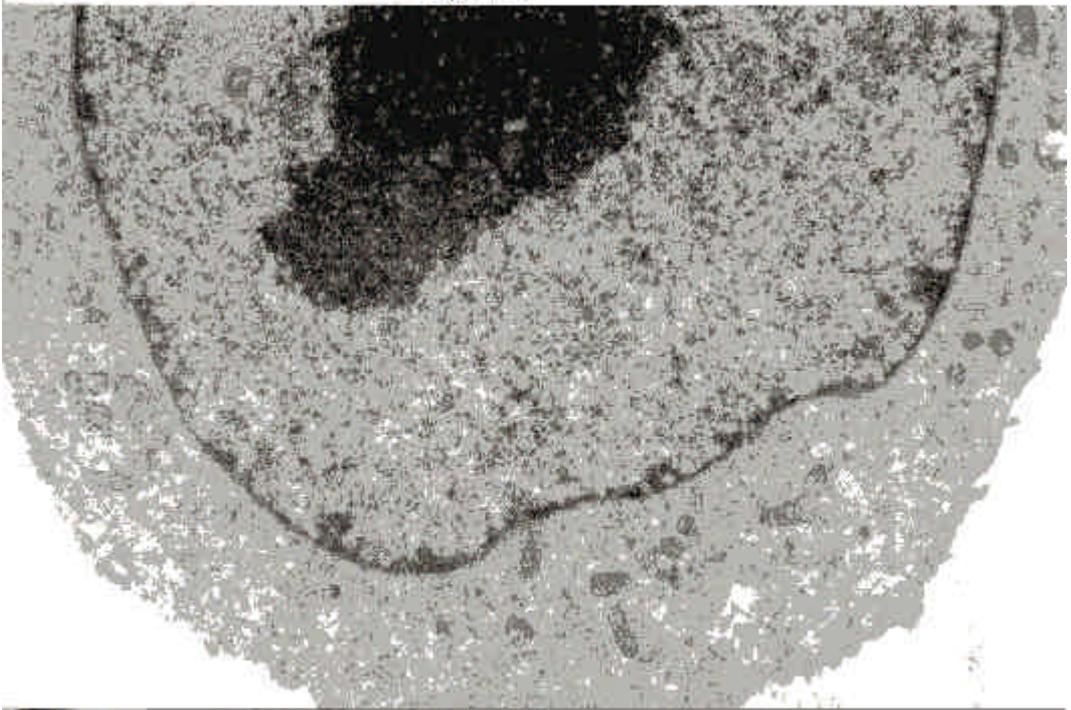


Figura 37

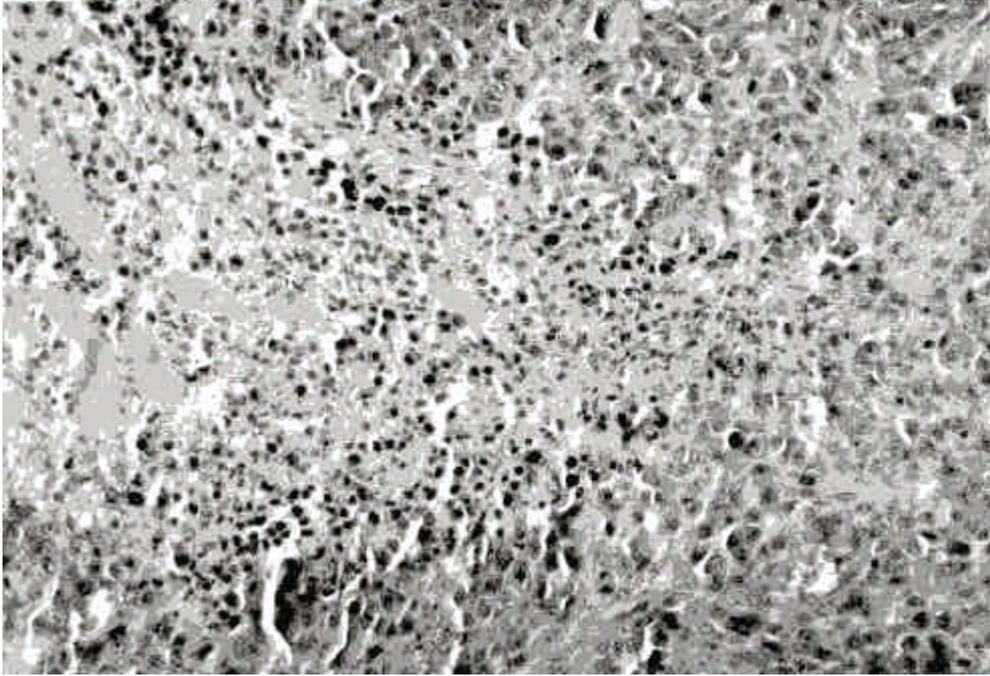


Figura 38

Figuras 38,39 y 40: Distintos territorios en los que se distingue una alta tasa divisional entre células con variable pigmentación citoplasmática. Las áreas hipercelulares coexisten con focos de necrosis.

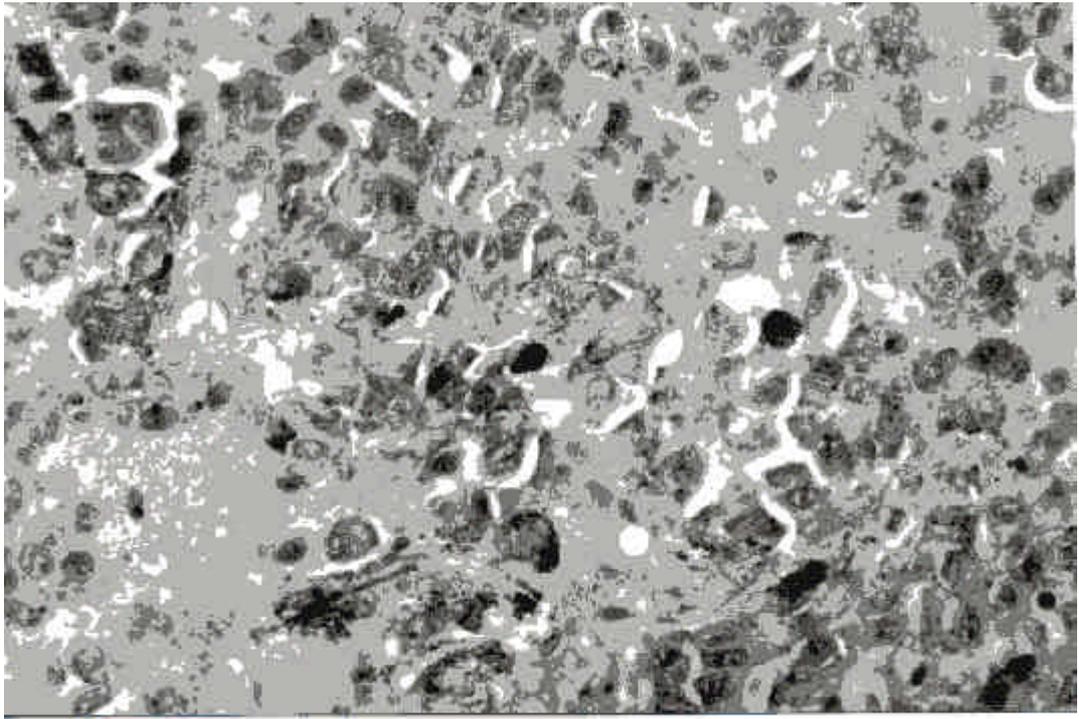


Figura 39

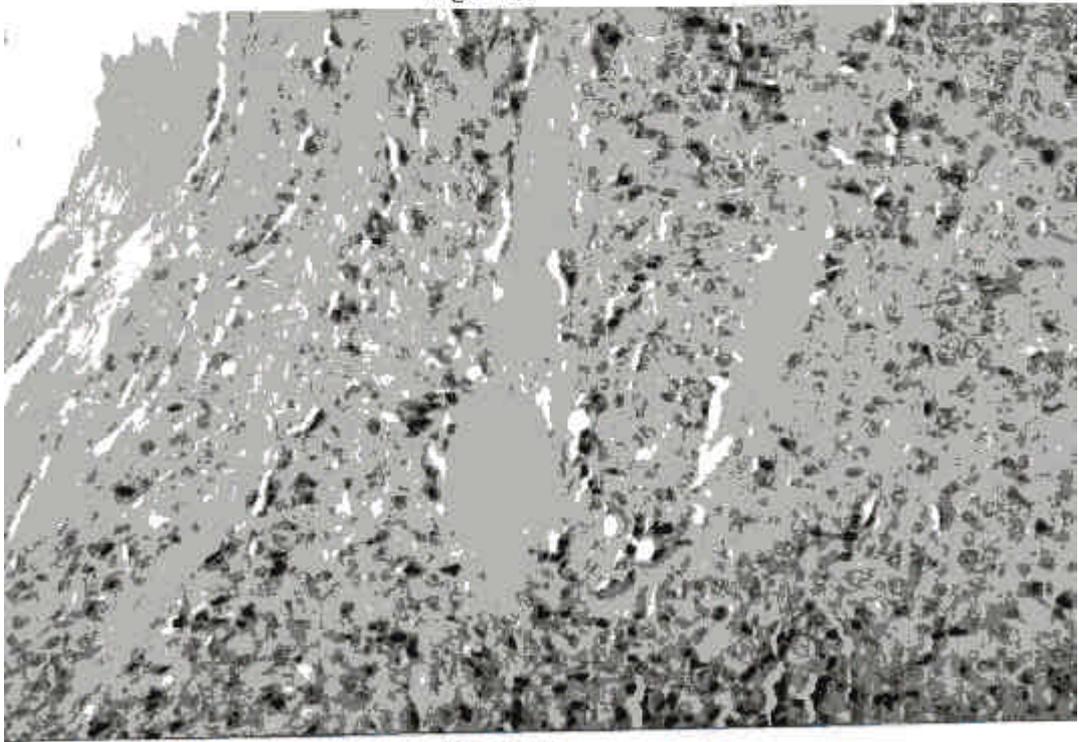


Figura 40

Figuras 41 y 42: Distintas visiones parciales de células neoplásicas, llaman la atención la existencia en la membrana nuclear de abundantes invaginaciones que en ocasiones originan imágenes caprichosas (figura 42). En el citoplasma se aprecian melanosomas y pre-melanosomas.

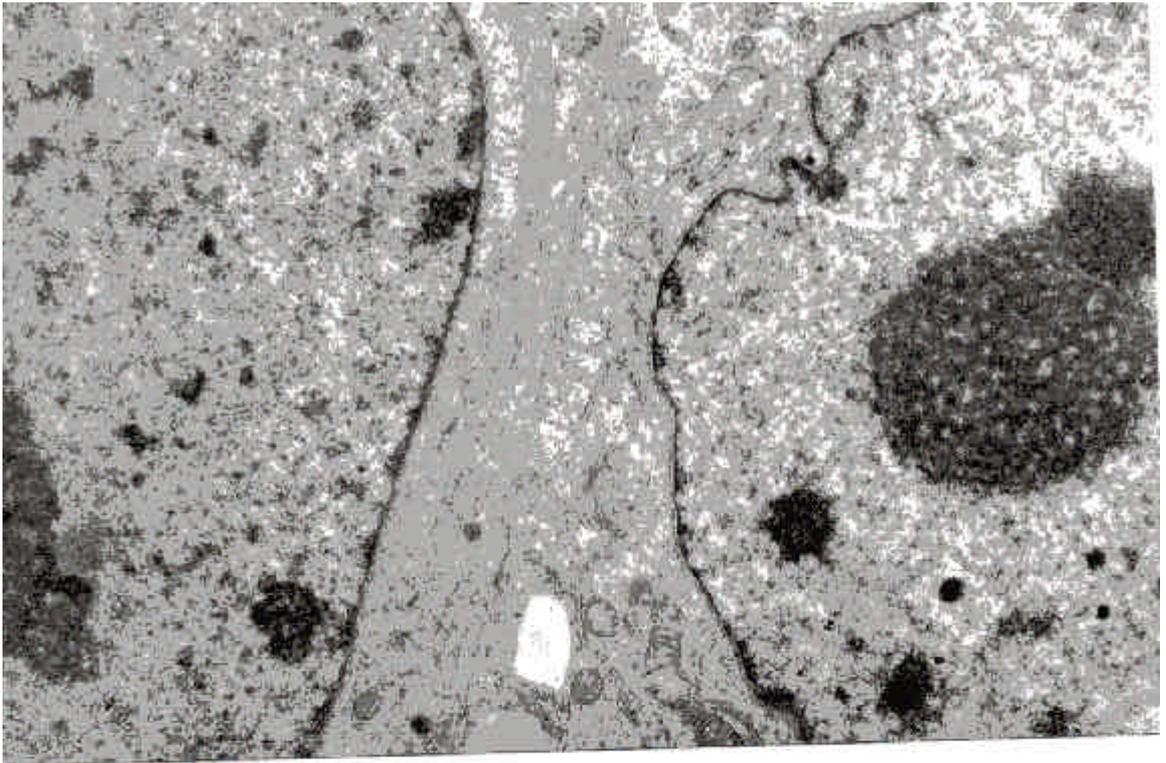


Figura 41



Figura 42

que en la serie de control con implante de tumor sólido, la infiltración de grupos celulares entre las fibras musculares estriadas (figuras 43, 44 y 45), disecándolas en pequeños grupos o de forma aislada.

4.3.2. SERIES EXPERIMENTALES:

4.3.2.1 *Subgrupos IA y IB : Implante de melanoma sólido no irradiado en lecho irradiado. Subgrupo A cuando el intervalo entre irradiación e implante fue inferior a 24 horas. Subgrupo B cuando dicho intervalo fue de siete días.*

En estas series se han observado resultados microscópicos similares al implantar tumor sólido inmediatamente después de irradiar el lecho (serie IA) o tras un intervalo de siete días; por lo que los presentaremos de manera conjunta.

En general se produce crecimiento neoplásico que infiltra músculo estriado, en torno a estructuras nerviosas y observándose vasos sanguíneos entre grupos de células tumorales. El examen histológico comparativo respecto a la serie control pone de manifiesto similar forma de crecimiento, con áreas de necrosis en zonas alejadas de los vasos, mientras que se conservan las células adyacentes a estos últimos (figura 46). La penetración entre las fibras musculares adquiere las mismas características, observándose masas neoplásicas que separan a las fibras (figura 47). El componente neoplásico infiltrante conserva su capacidad divisional, poniéndose de manifiesto figuras de mitosis (figura 48) en las que también se remarca la característica disposición de los cromosomas. En lo que respecta a la pigmentación de las células no hemos observado variación en la intensidad o distribución del pigmento (figura 49).

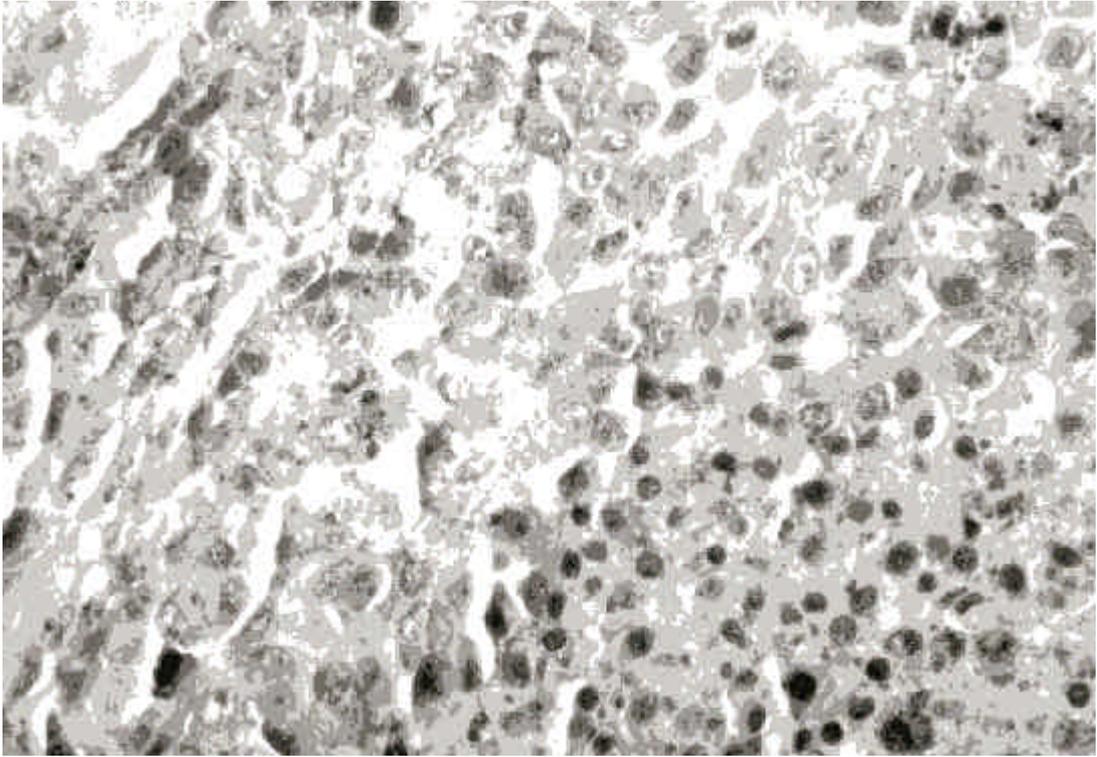


Figura 43

Figuras 43,44 y 45: Tejido muscular estriado infiltrado por células pertenecientes al melanoma.

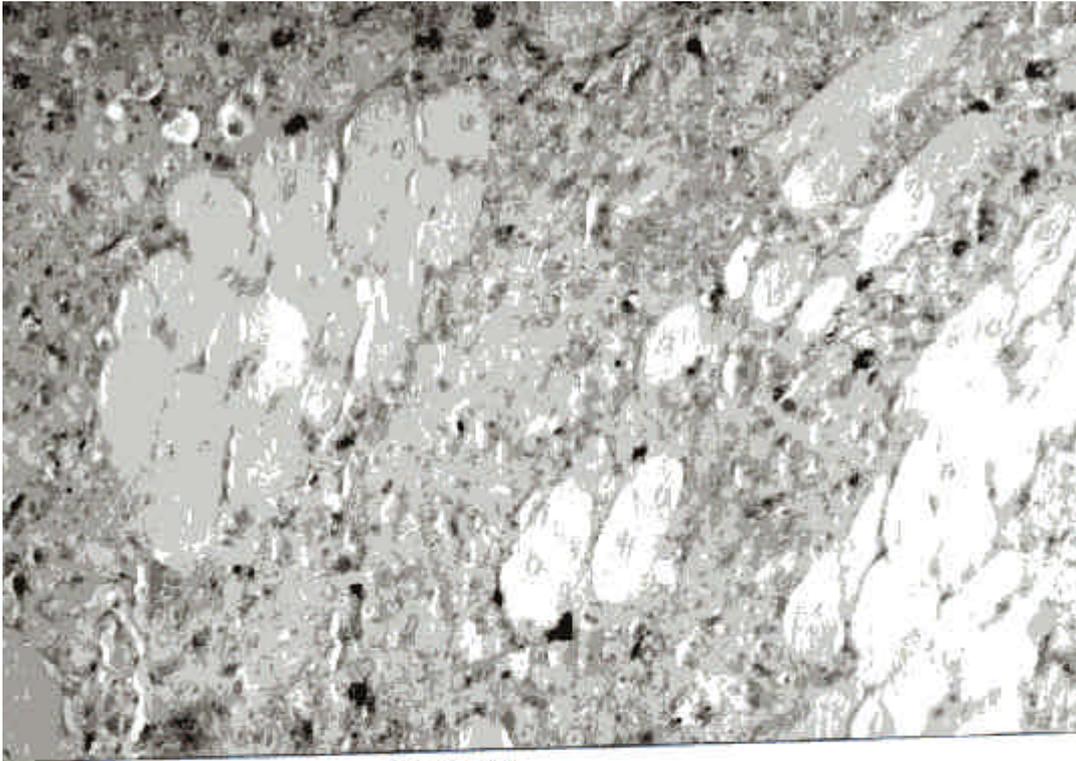


Figura 44

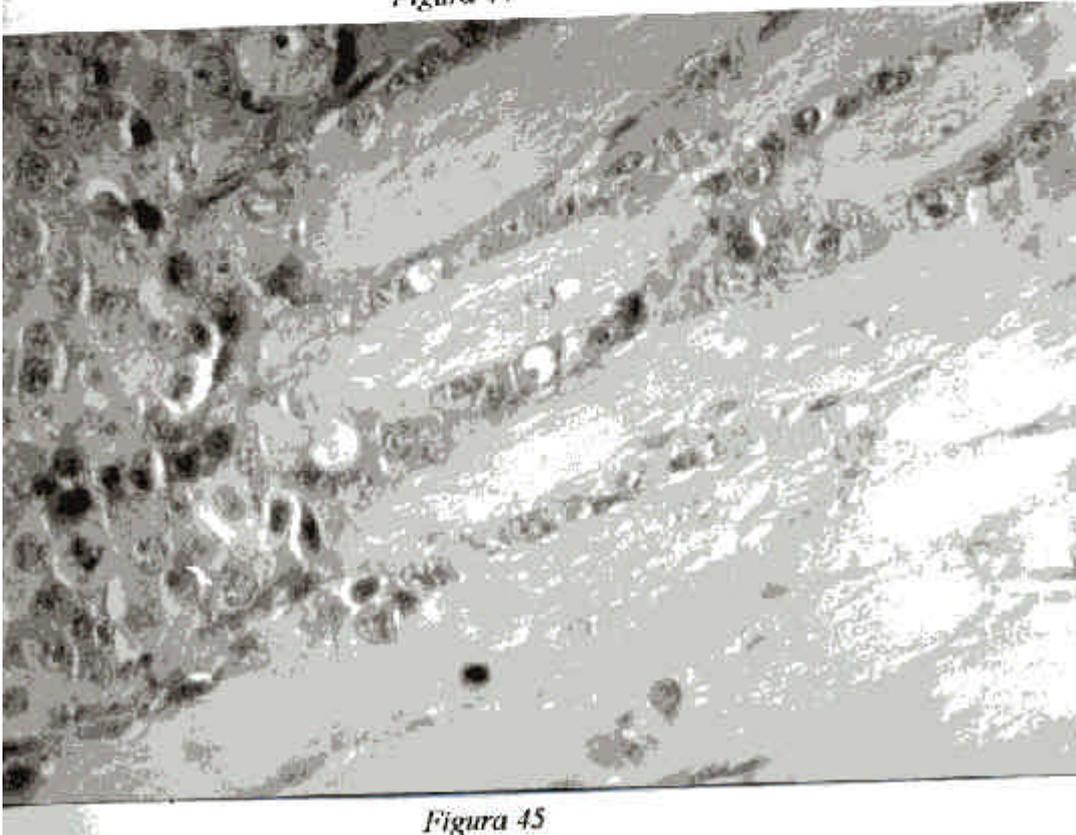


Figura 45

Figura 46: Areas de necrosis con células tumorales adyacentes a estructuras vasculares.

Figura 47: Infiltración del componente tumoral entre las fibras musculares esqueléticas.

Obsérvense regueros de células neoplásicas que dividen a estas fibras.

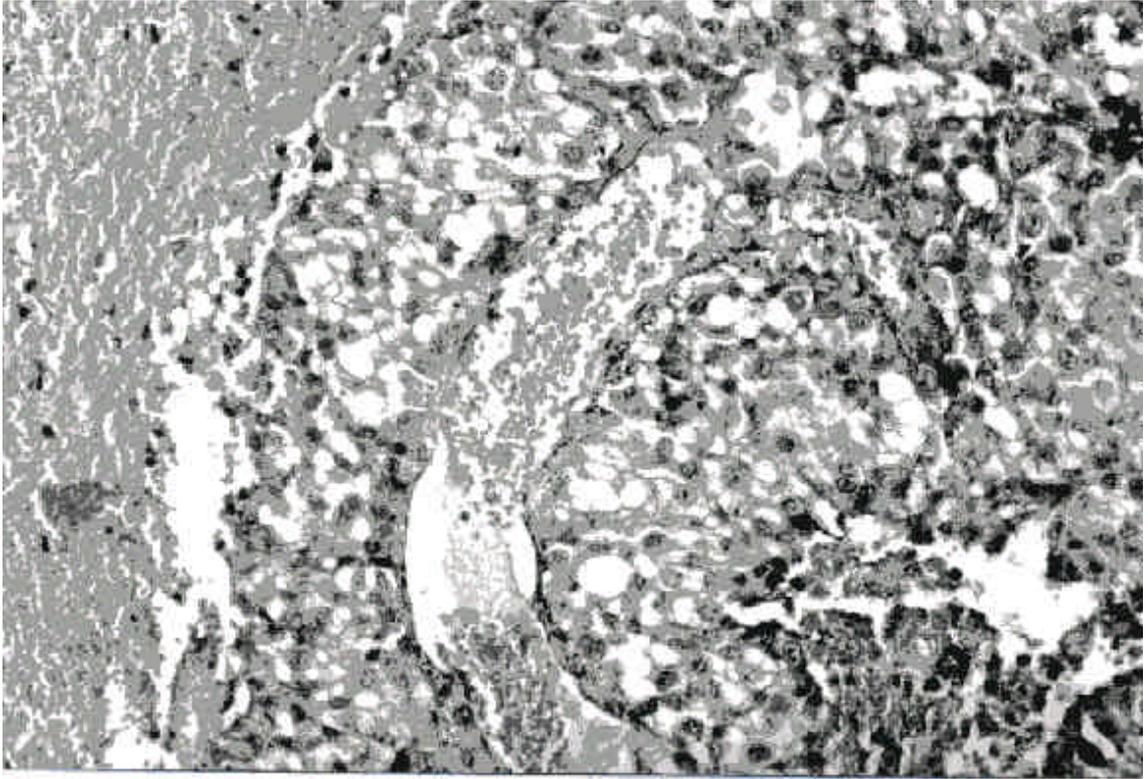


Figura 46

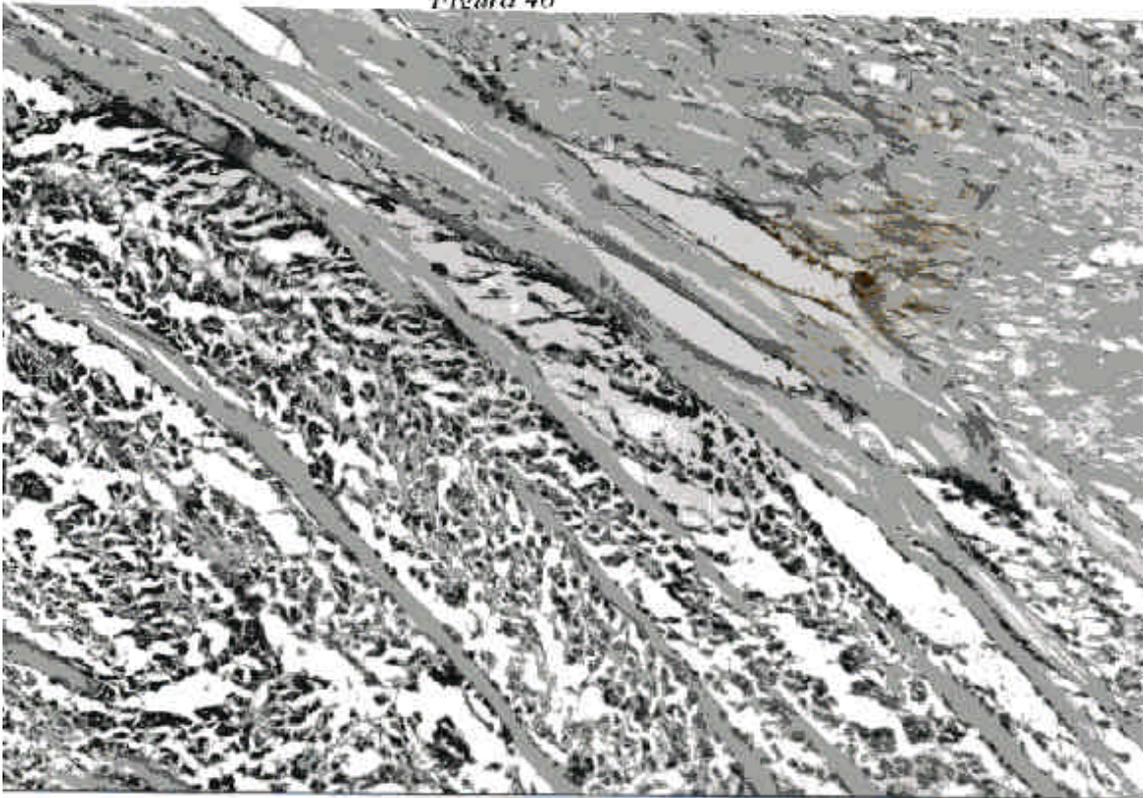


Figura 47

Figura 48: Se aprecian figuras de mitosis (Anafase) correspondiente a una célula del implante de melanoma, adyacente a fibras musculares esqueléticas.

Figura 49: Corte semifino del componente tumoral melánico donde se aprecian estadios divisionales de estas células, así como una distribución del pigmento similar al de los casos control.

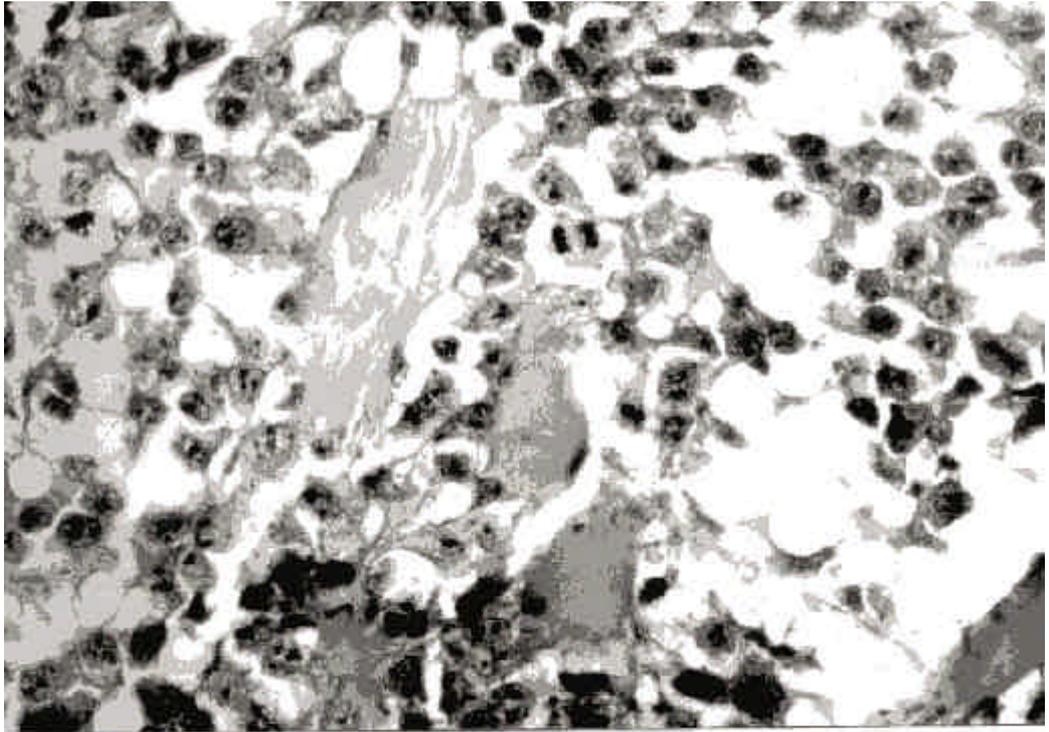


Figura 48

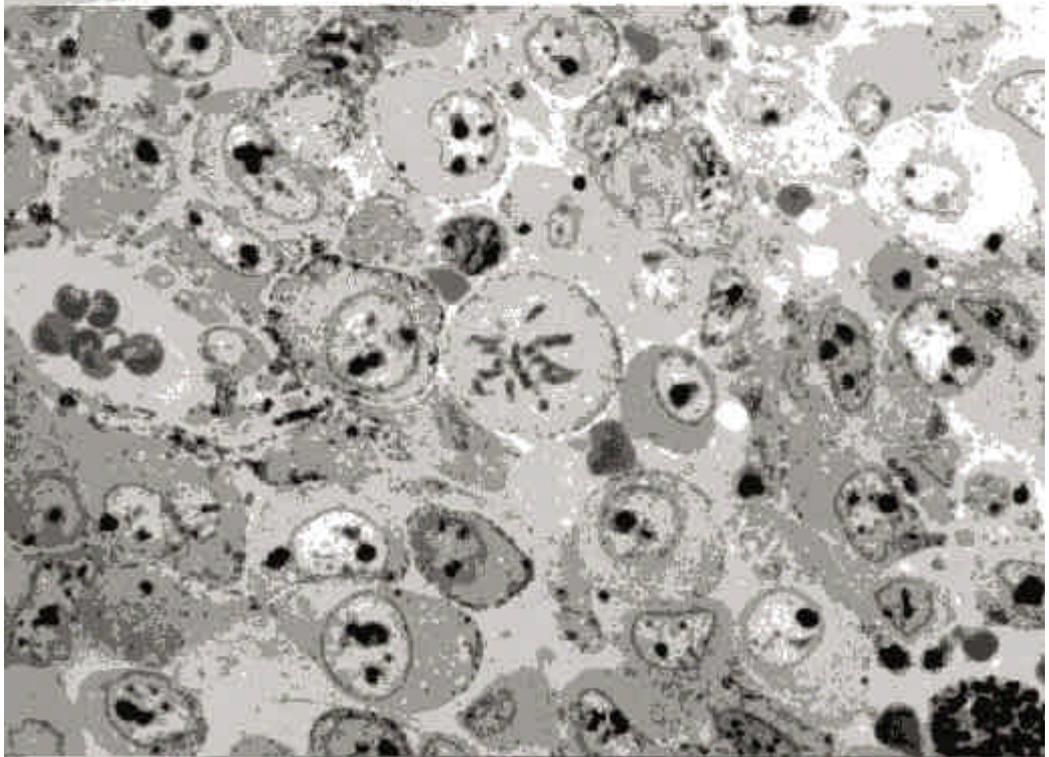


Figura 49

Particular atención hemos prestado a las estructuras vasculares que acompañan a las masas neoplásicas en crecimiento y les sirven de soporte nutritivo. Los vasos aparecen revestidos por fino endotelio con variable número de células perivasculares en su entorno (figuras 50, 51 y 52).

Ocasionalmente observamos vasos trombosados con variable número de plaquetas y hematíes que taponan y ocluyen sus luces (figuras 53 y 54). En las áreas de infiltración entre las células musculares, los vasos aparecen relativamente próximos a estas últimas (figura 55). Ocasionalmente hemos evidenciado focos de calcificación u osificación en las fascias vecinas al componente neoplásico (figura 56).

En lo que respecta a los melanófagos, éstos tienden a disponerse predominantemente en espacios perivasculares, identificándose con nitidez por sus lisosomas secundarios y por poseer núcleos menos voluminosos y más cromáticos que los de las células neoplásicas adyacentes (figura 57).

4.3.2.2. Subgrupos IIA y IIB: Implante de melanoma sólido irradiado en lecho no irradiado. Subgrupo A cuando el intervalo entre irradiación e implante fue inferior a 24 horas. Subgrupo B cuando dicho intervalo fue de siete días.

En estas series en las que se implantó un milímetro cúbico de tumor sólido irradiado sobre lecho no irradiado, se han observado resultados microscópicos similares tanto cuando el intervalo entre irradiación e implante fue inmediato (IIA) como cuando fue de siete días (IIB). Por ello presentaremos los resultados de forma conjunta.

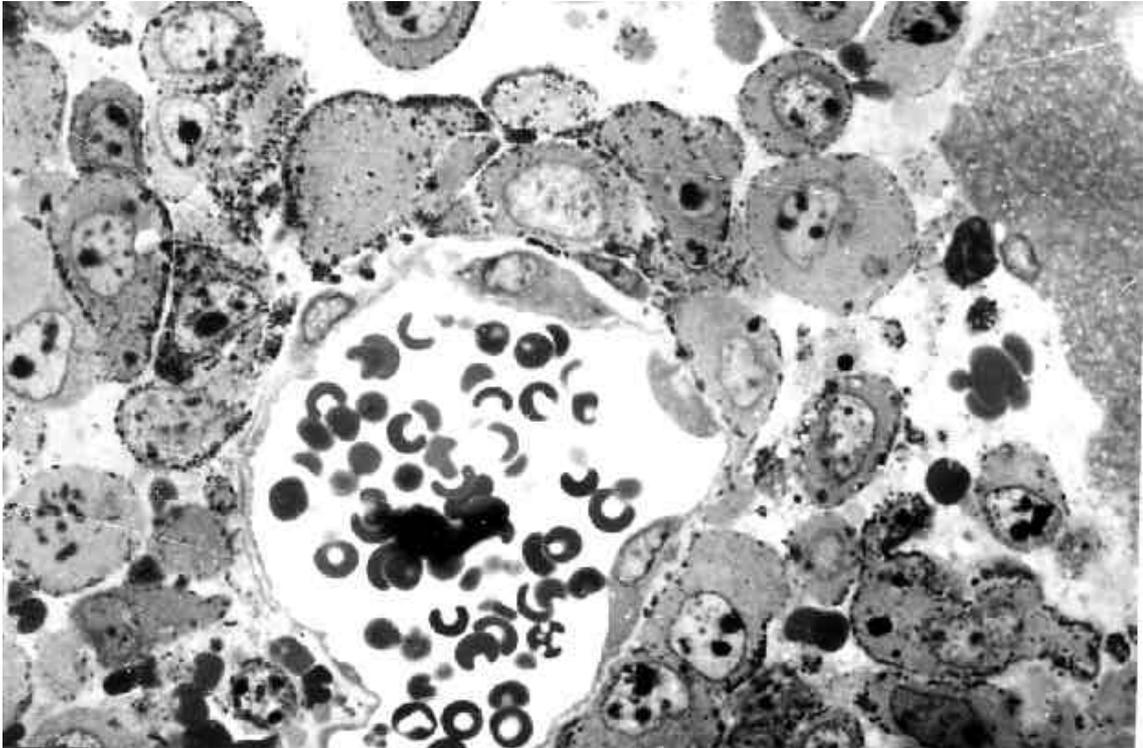


Figura 50

Figuras 50, 51 y 52: Diversas imágenes correspondientes a estructuras vasculares inmersas en el parénquima tumoral. Se aprecia una capa simple de células endoteliales, así como células perivasculares.

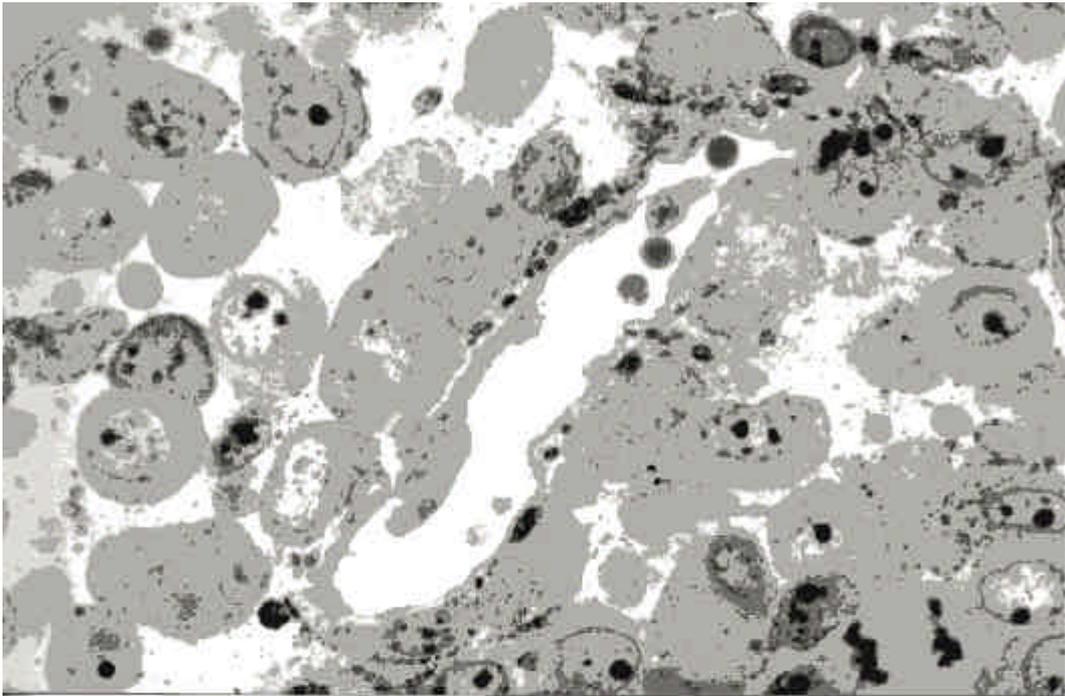


Figura 51

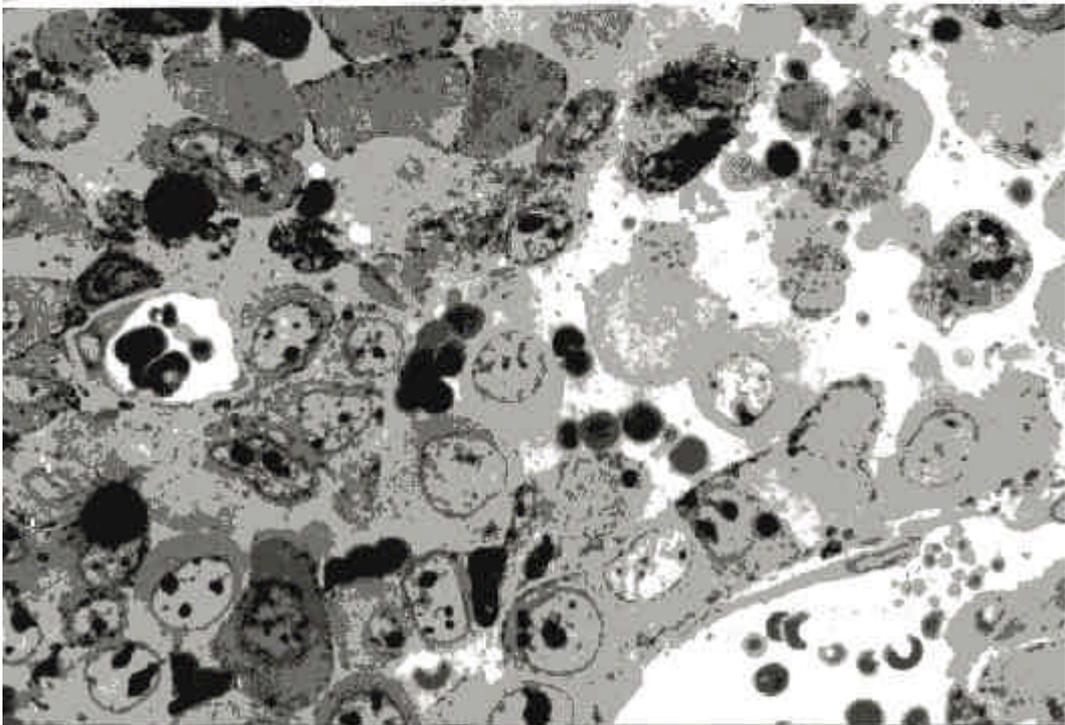


Figura 52

Figuras 53 y 54: estructuras vasculares con gran cantidad de elementos formes en su luz. En la imagen 53 se aprecian tapones plaquetarios, mientras que en la imagen 54 predomina el componente eritrocitario.

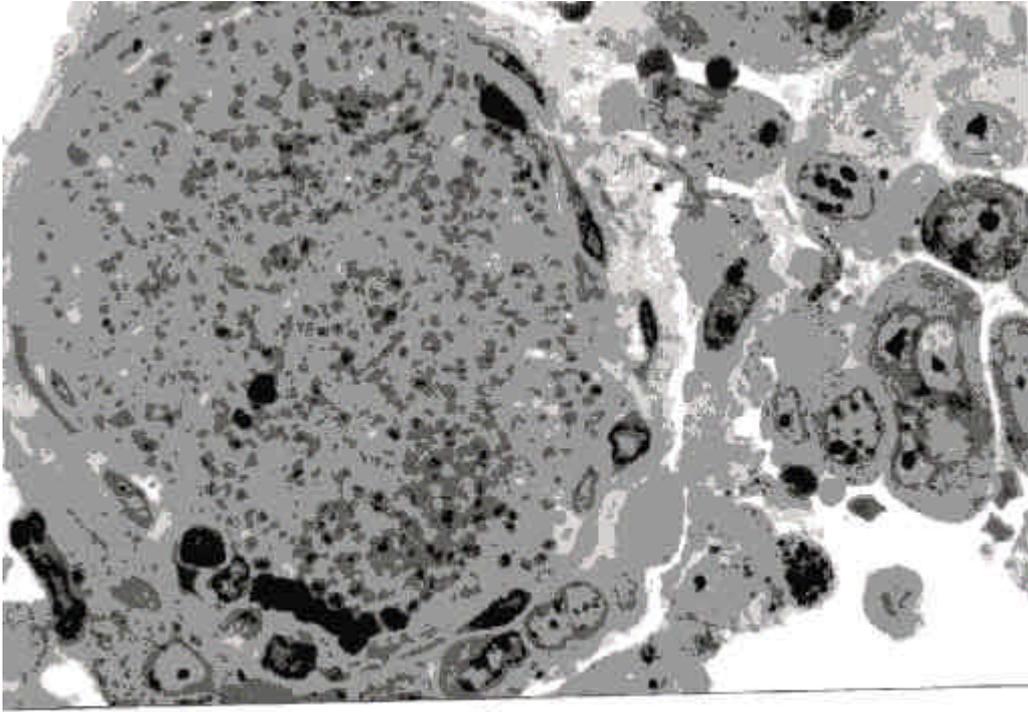


Figura 53

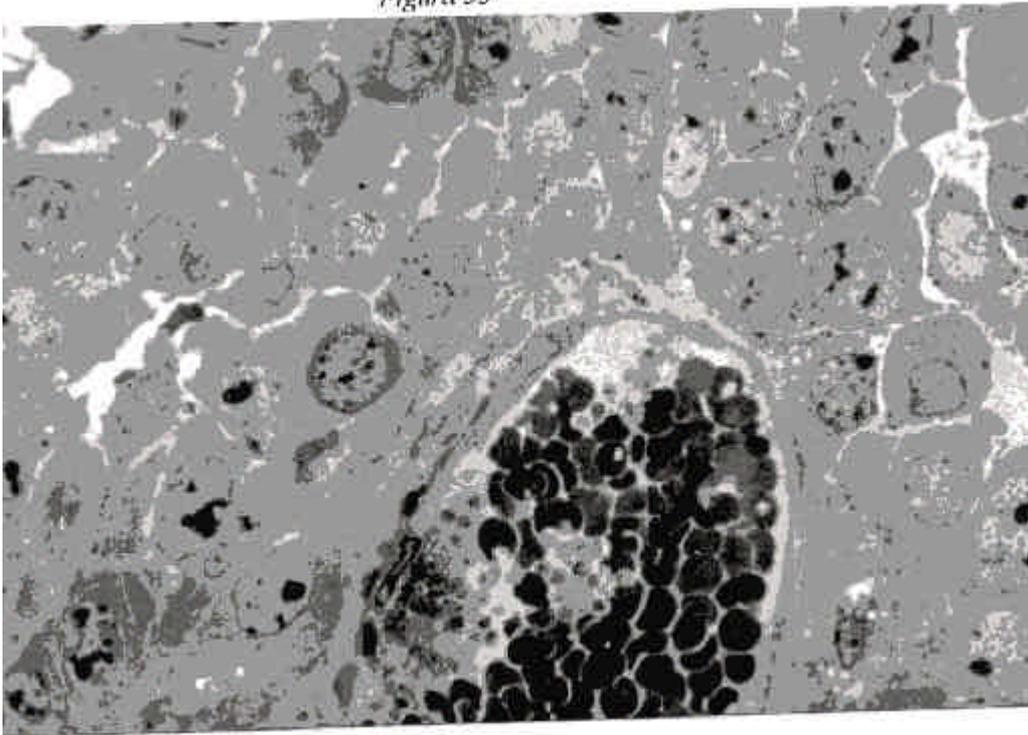


Figura 54

Figura 55: Corte semifino donde es posible apreciar vasos sanguíneos en proximidad a células musculares esqueléticas.

Figura 56: Fenómenos de calcificación en áreas próximas al componente tumoral melánico.

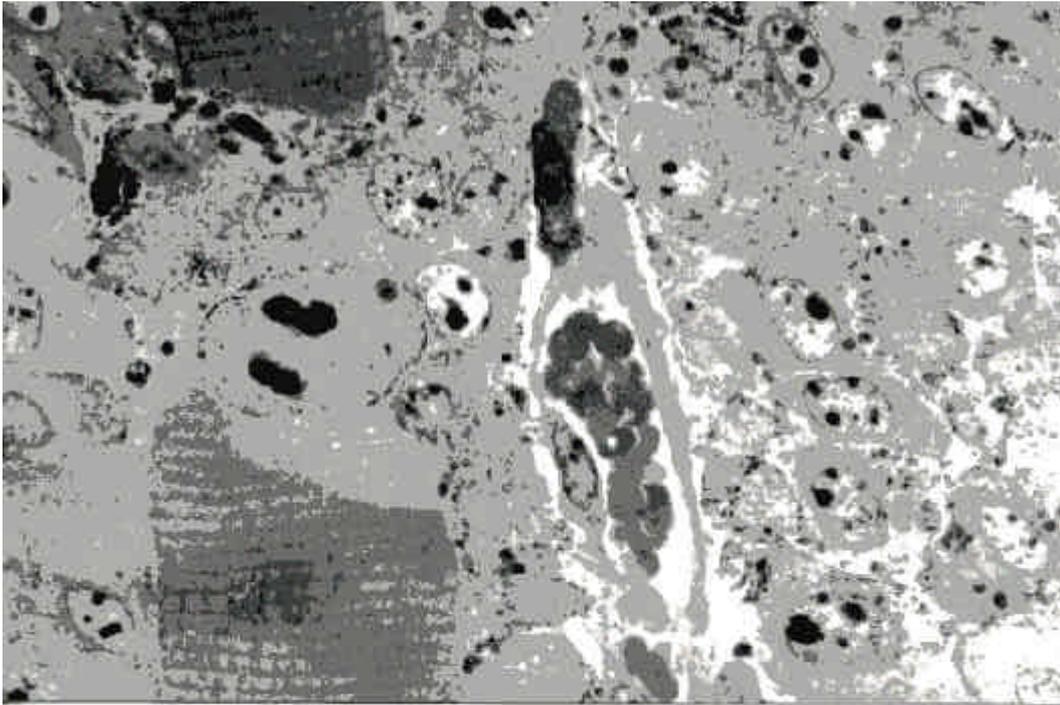


Figura 55

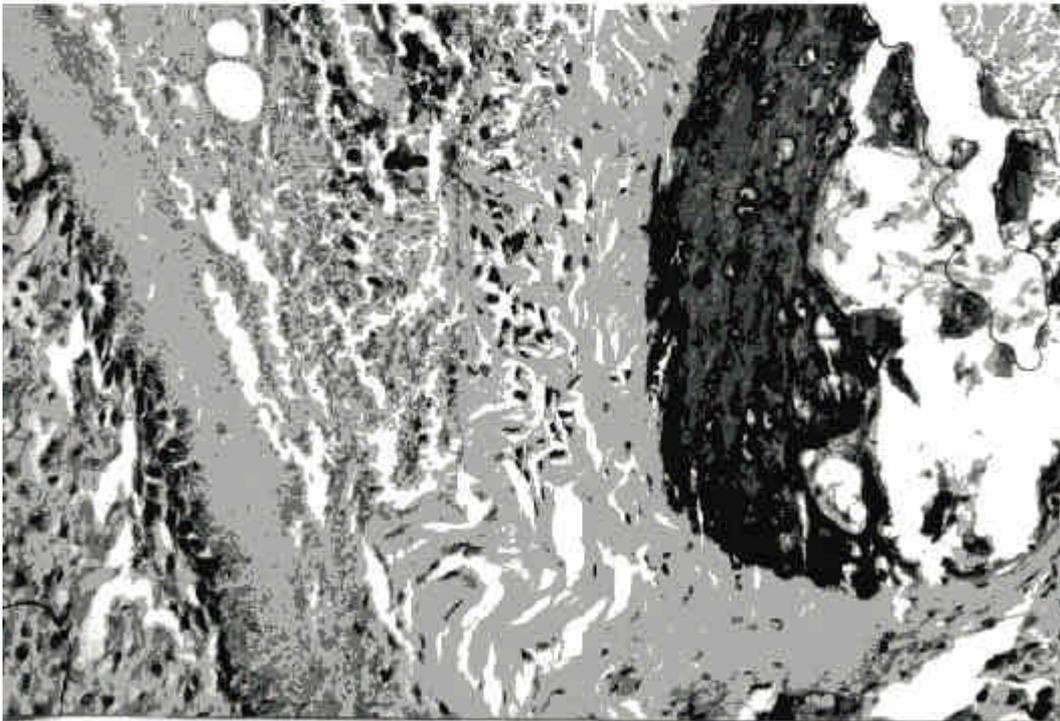


Figura 56

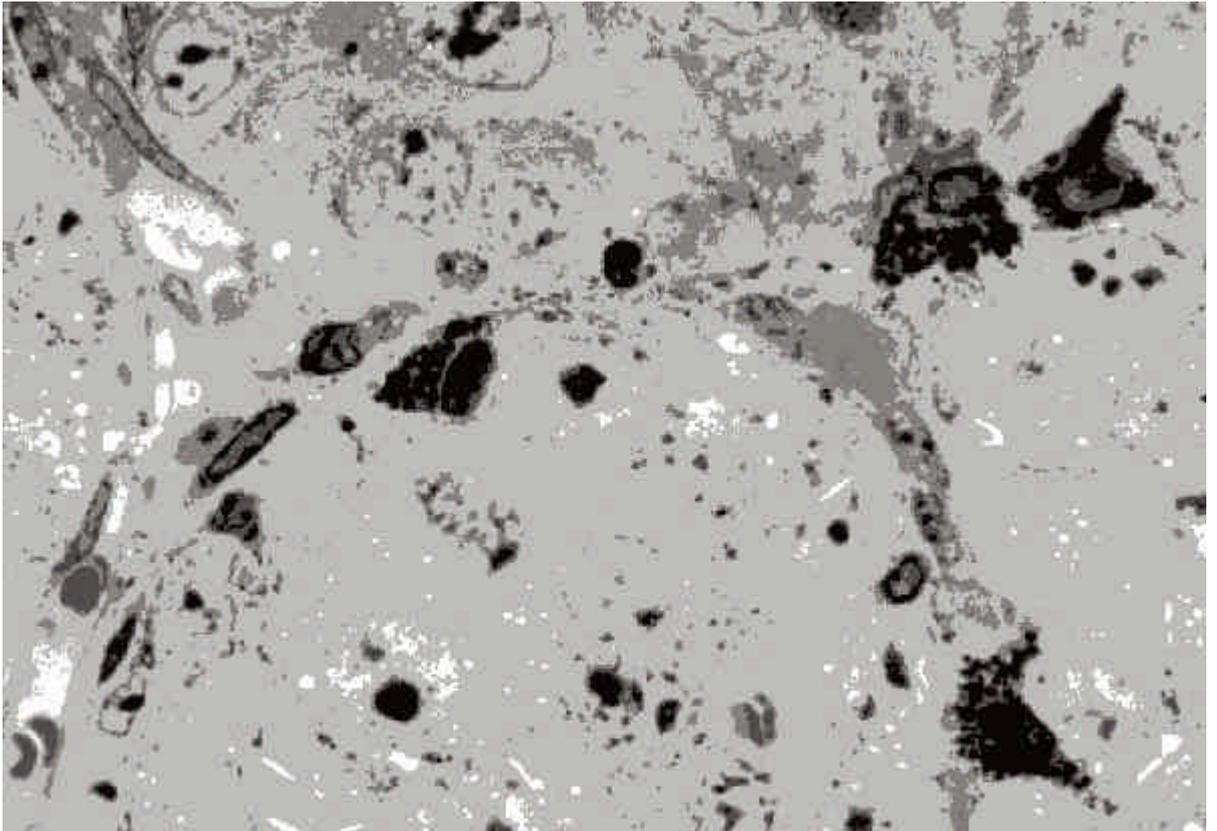


Figura 57: Estructuras vasculares en cuya periferia se disponen melanófagos. Se aprecia como estas células muestran abundantes lisosomas secundarios; adyacentes a las mismas se puede distinguir el componente tumoral.

En la escasa masa tumoral que se obtuvo en estas series, llama la atención la presencia de células neoplásicas con variable pleomorfismo, las cuales se disponen sobre las fascias o en torno a los nervios. Entre estas células podemos apreciar un número elevado de melanófagos. Efectivamente, las células melánicas proliferantes muestran núcleos con diferente morfología, con numerosas escotaduras superficiales (figura 58), llamando la atención la existencia de nucleolos muy prominentes (figura 59), a veces numerosos (figuras 60 y 61). Ocasionalmente, las células muestran núcleos abigarrados (figuras 62 y 63), polilobulados o múltiples (figura 64).

Algunas de las células neoplásicas penetran en las áreas superficiales de músculo estriado (figuras 65 y 66). En los citoplasmas celulares se aprecia variable cantidad de pigmento y, cuando éste aparece, tiende a disponerse en los márgenes de las células.

En el intersticio se observan vasos sanguíneos y un número elevado de melanófagos que supera el de células neoplásicas. En dichos melanófagos se observan abundantes lisosomas con gránulos melánicos englobados. Los núcleos de los macrófagos se diferencian claramente de los elementos neoplásicos, por ser más pequeños, uniformes y de cromatina más condensada (figuras de 58-66).

Un hecho llamativo en la presente serie viene dado por la presencia de áreas con fenómenos de osificación, evidenciándose osteoblastos, zonas de proliferación de aspecto mesenquimal y trabéculas óseas con matriz calcificada y osteocitos (figura 67).

Figuras 58 y 59: Componente tumoral melánico donde se observan escotaduras superficiales (figura 58) y nucleolos prominentes (figura 59)

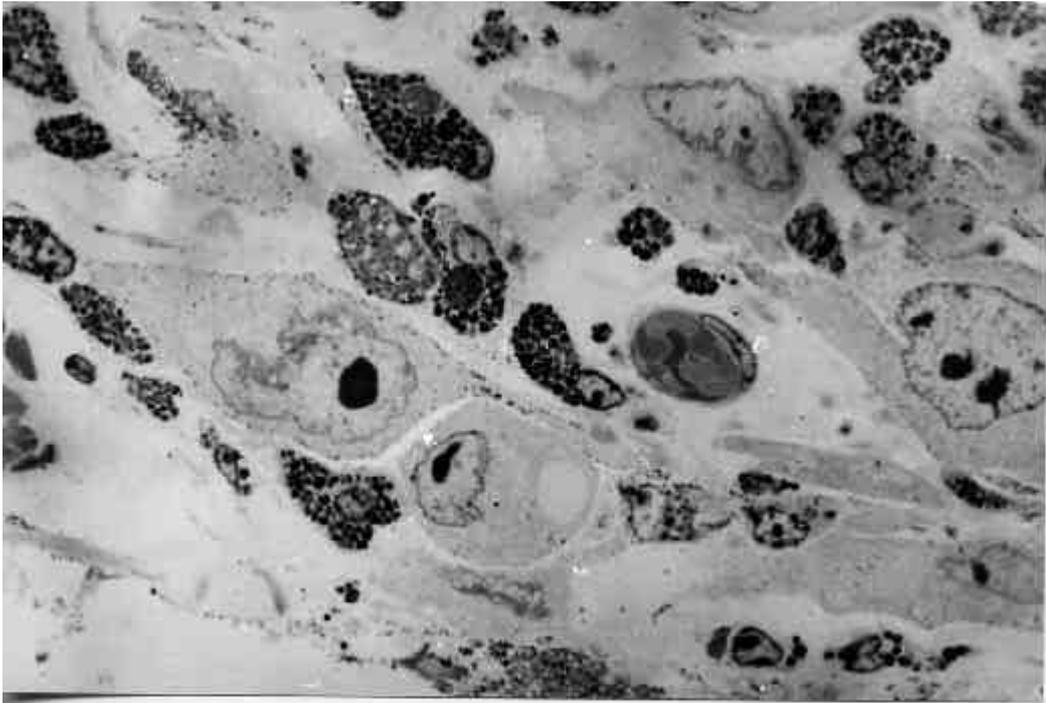


Figura 58

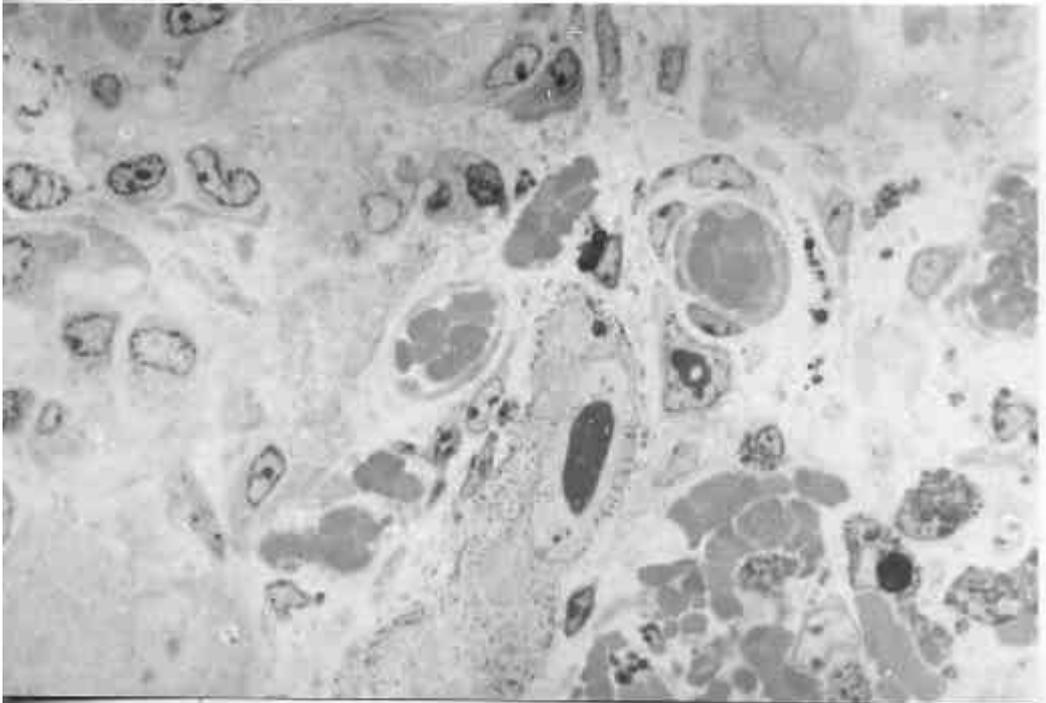


Figura 59

Figuras 60 y 61: Células de melanoma en las que se aprecian la existencia de nucleolos múltiples .

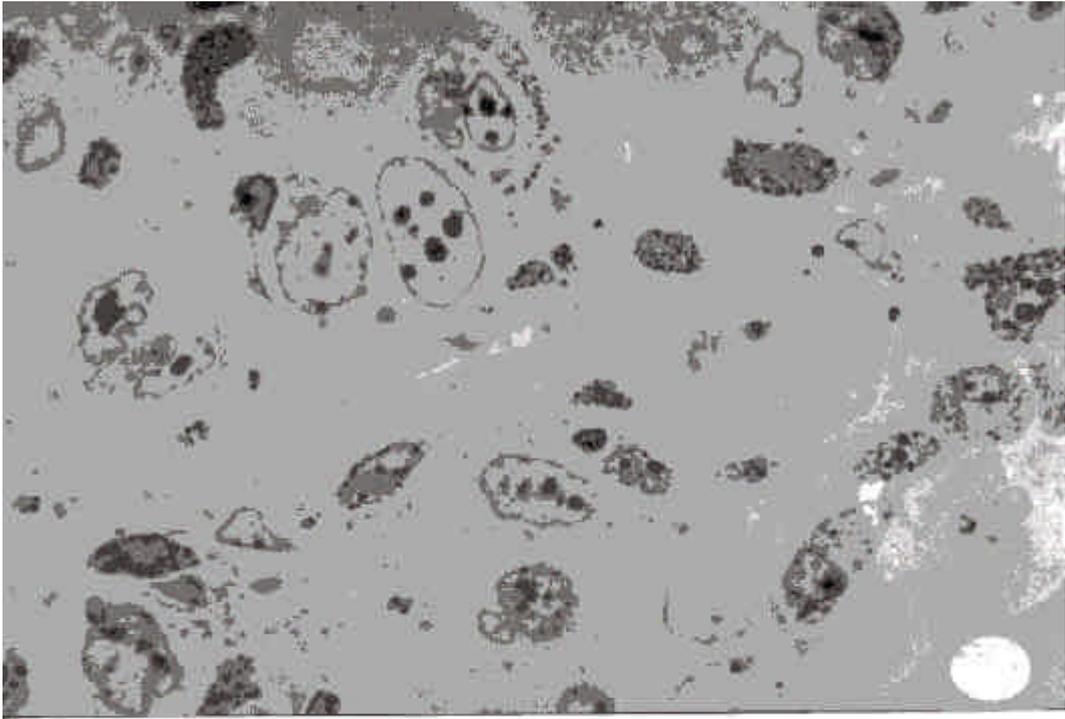


Figura 60

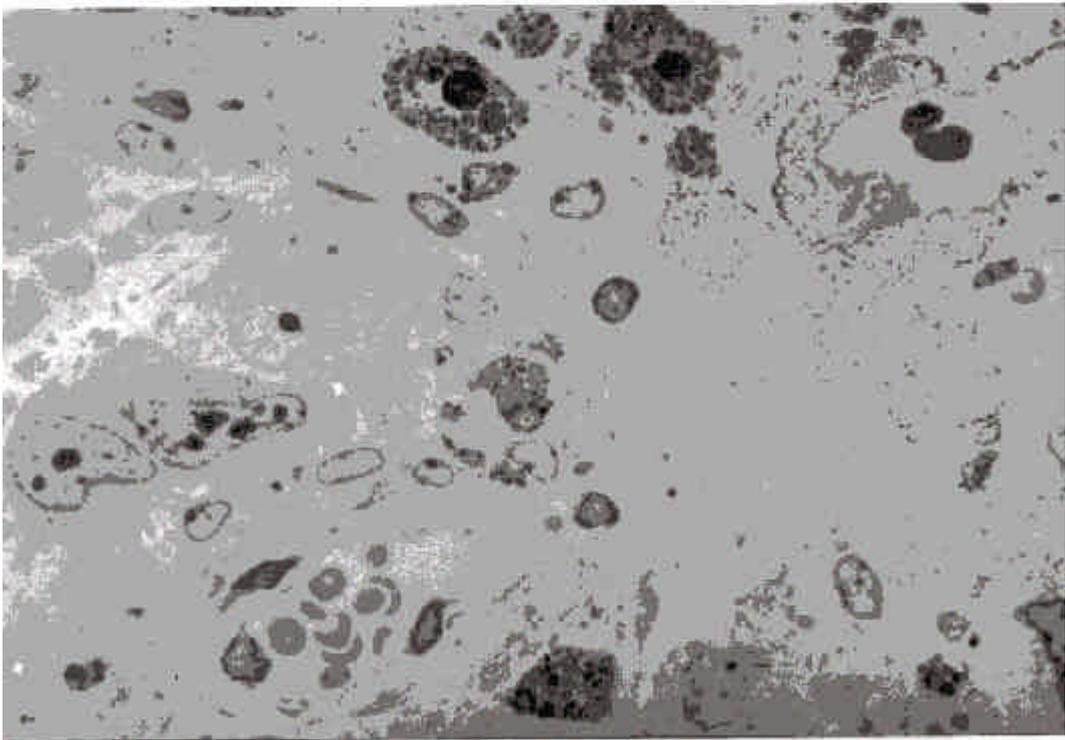


Figura 61

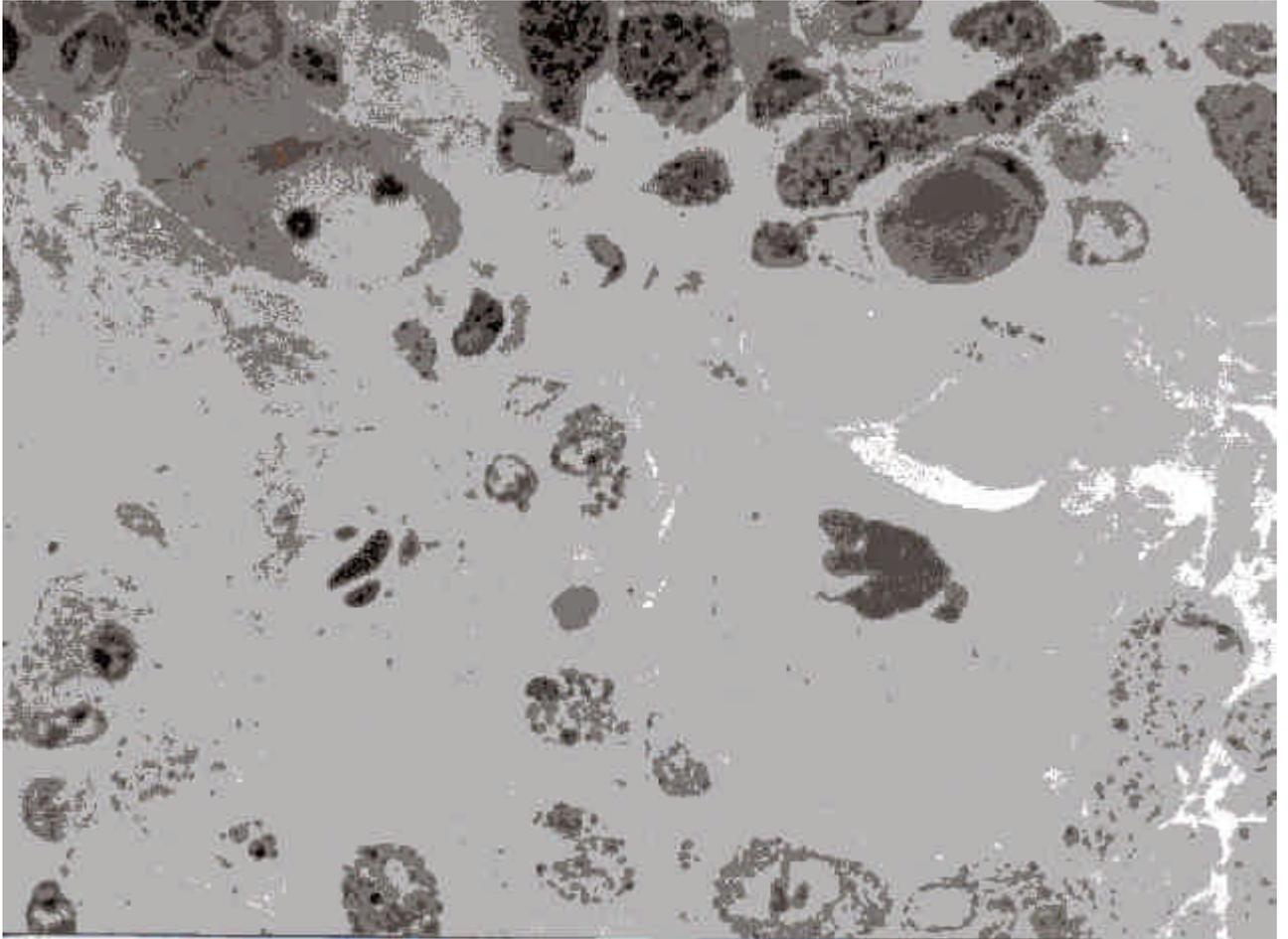


Figura 62

Figuras 62, 63 y 64: El componente tumoral muestra los núcleos celulares en ocasiones abigarrados, múltiples o polilobulados . Es de destacar la coexistencia con numerosos melanófagos.

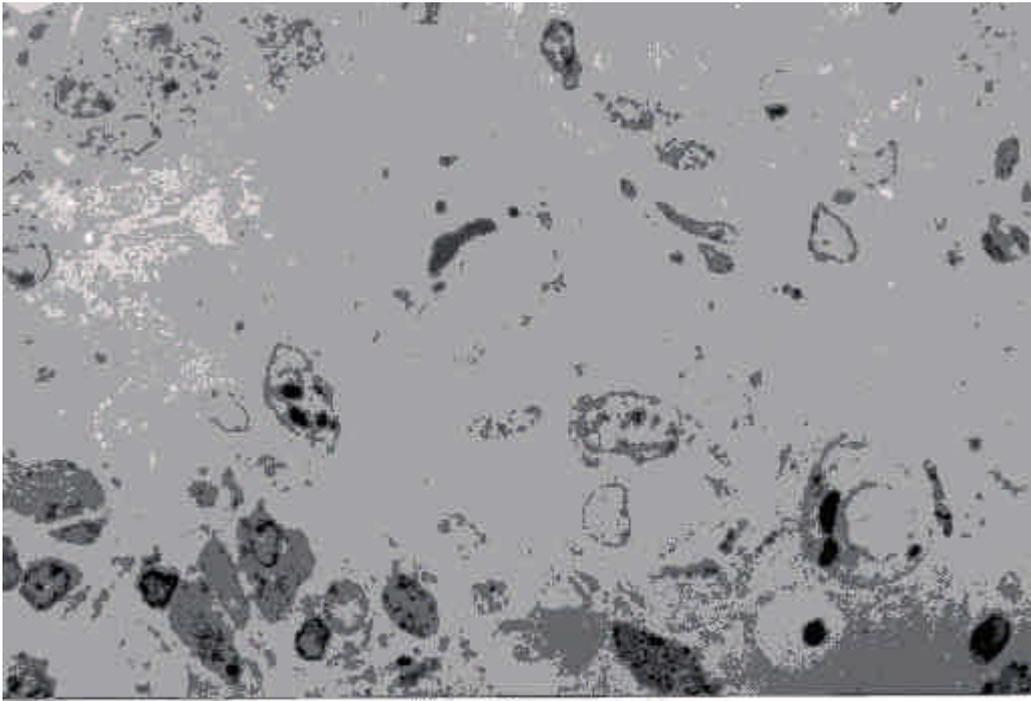


Figura 63

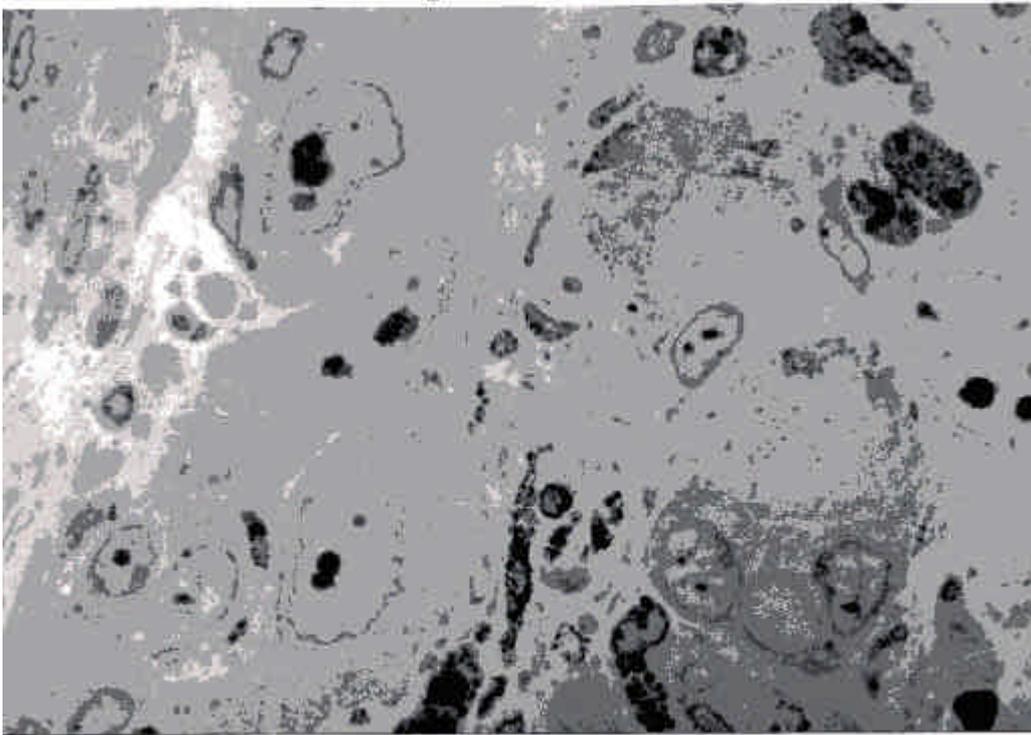


Figura 64

Figuras 65 y 66: Penetración del componente melánico en las zonas superficiales del músculo esquelético. El citoplasma de estas células muestra el pigmento melánico en variable proporción, tendiendo a disponerse en los márgenes celulares.

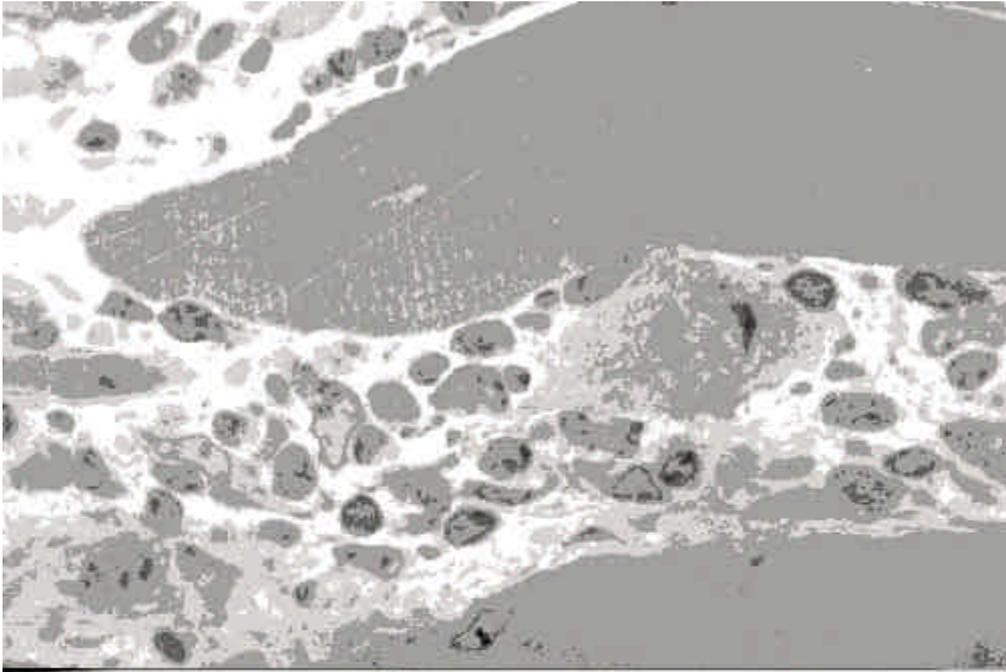


Figura 65

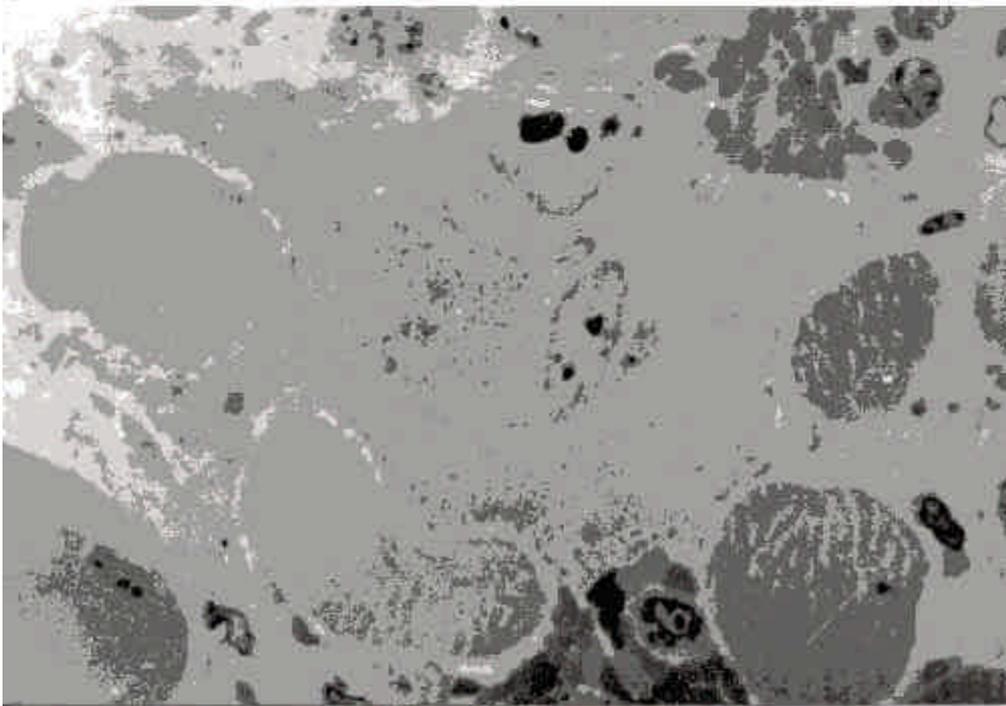


Figura 66

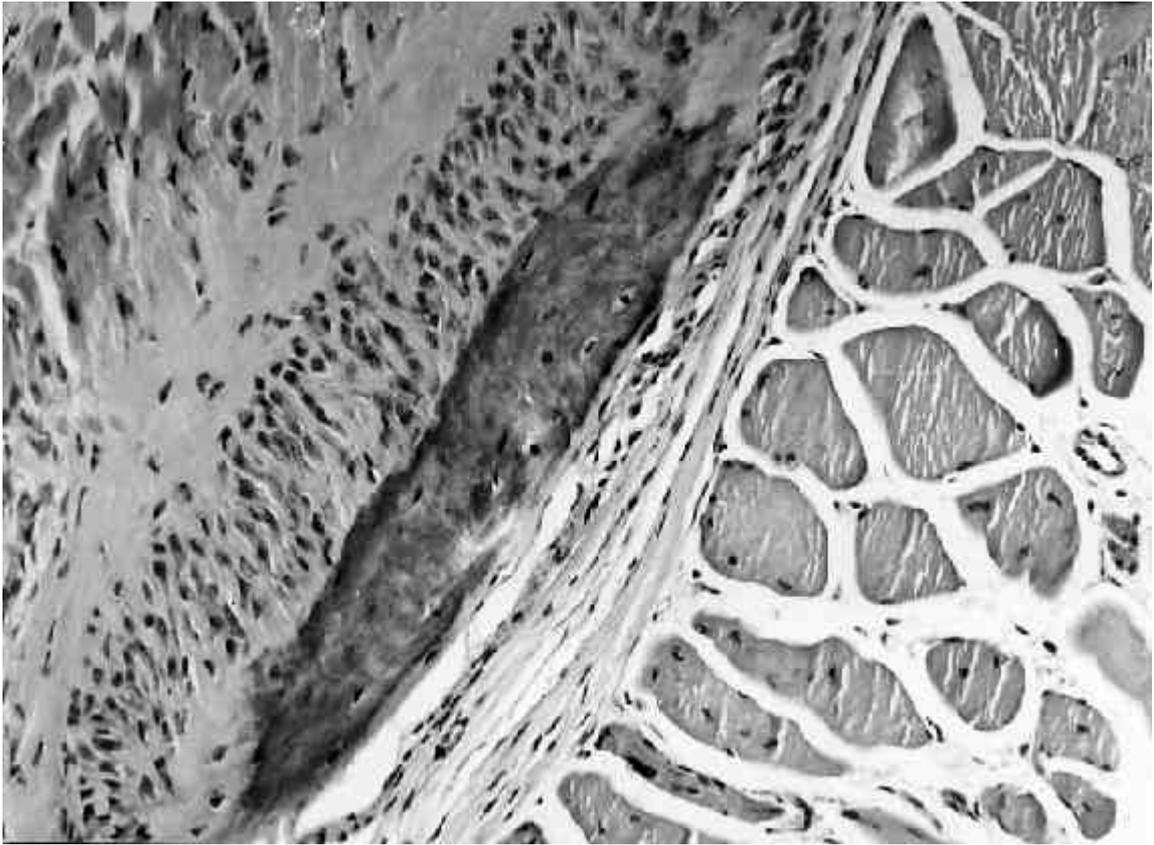


Figura 67: Zona de osificación, con osteoblastos y osteocitos en vecindad a fibras musculares esqueléticas que en esta imagen aparecen cortados transversal y oblicuamente.

4.3.2.3 *Subgrupos IIIA y IIIB: Irradiación tanto del lecho como del melanoma sólido. Subgrupo A cuando el intervalo entre irradiación e implante fue inferior a 24 horas. Subgrupo B cuando dicho intervalo fue de siete días.*

En la mayor parte de los casos de las presentes series solamente se puso de manifiesto un área pigmentada, escasamente prominente en las fascias o áreas perineurales.

Desde el punto de vista microscópico, las zonas previamente mencionadas consisten en melanófagos dispuestos en íntimo contacto con la superficie de las citadas estructuras (figura 68). En ocasiones, los melanófagos forman acúmulos. Entre los macrófagos hemos observado variable número de células neoplásicas, por lo general pleomórficas y con núcleos abigarrados (figuras 68, 69, 70 y 71). Las células neoplásicas poseen citoplasmas amplios y eosinofílicos, con prolongaciones superficiales. Algunos de los vasos preexistentes muestran fenómenos de engrosamiento parietal e infiltración inflamatoria (figura 72). Con frecuencia apreciamos células neoplásicas en íntima vecindad a trayectos nerviosos (figuras 71 y 73).

En cortes semifinos, el pleomorfismo nuclear, los nucleolos prominentes, el variable número de melanosomas y los citoplasmas amplios son muy evidentes (figuras 74 y 75). Al igual que en las series anteriores nos llamó la atención la presencia de focos de osificación, con trabéculas óseas maduras y bien conformadas (figura 76).

Figuras 68, 69, 70 y 71: Imágenes correspondientes a melanófagos en los que se observan su disposición en acúmulos. Interpuestos con estas células se pueden apreciar células tumorales de aspecto pleomórfico.



Figura 68

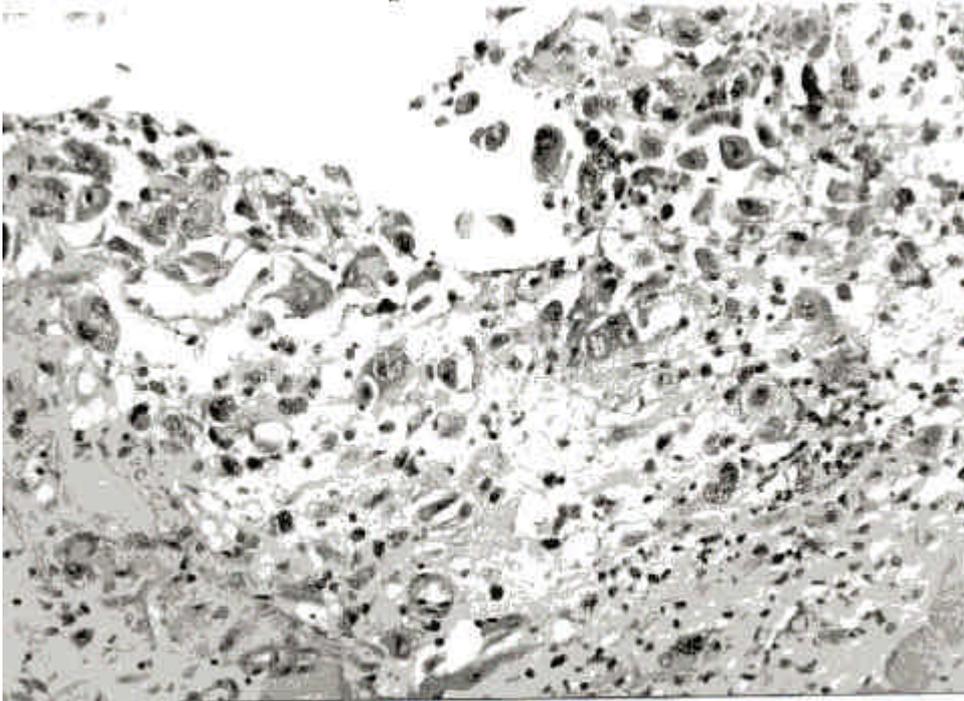


Figura 69

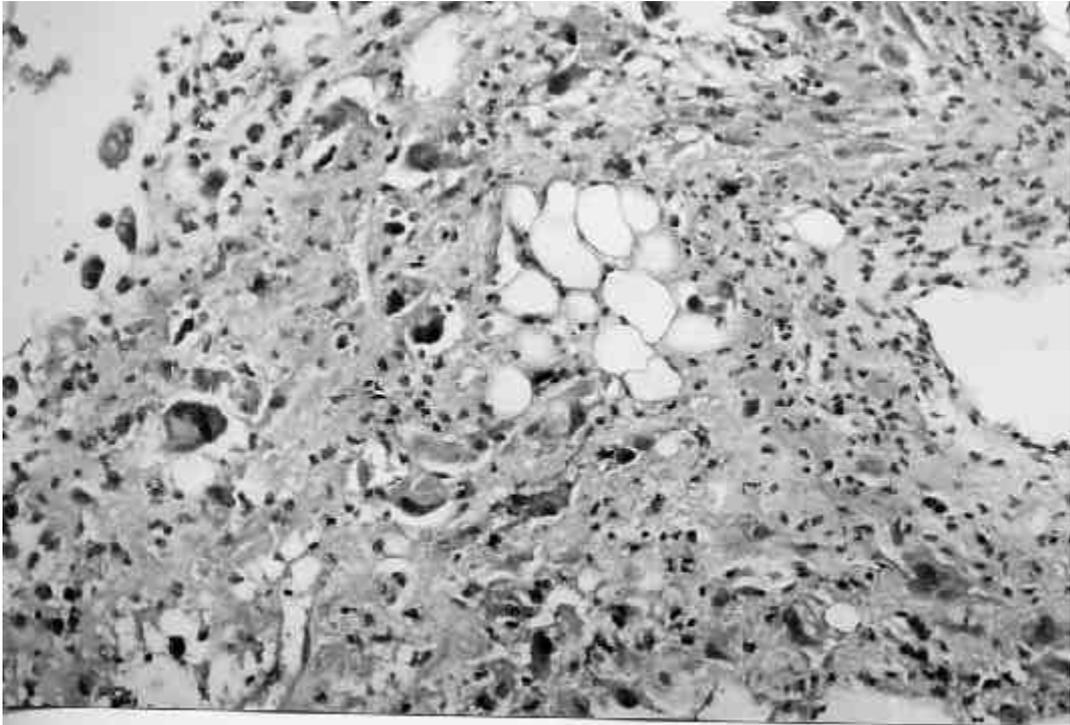


Figura 70

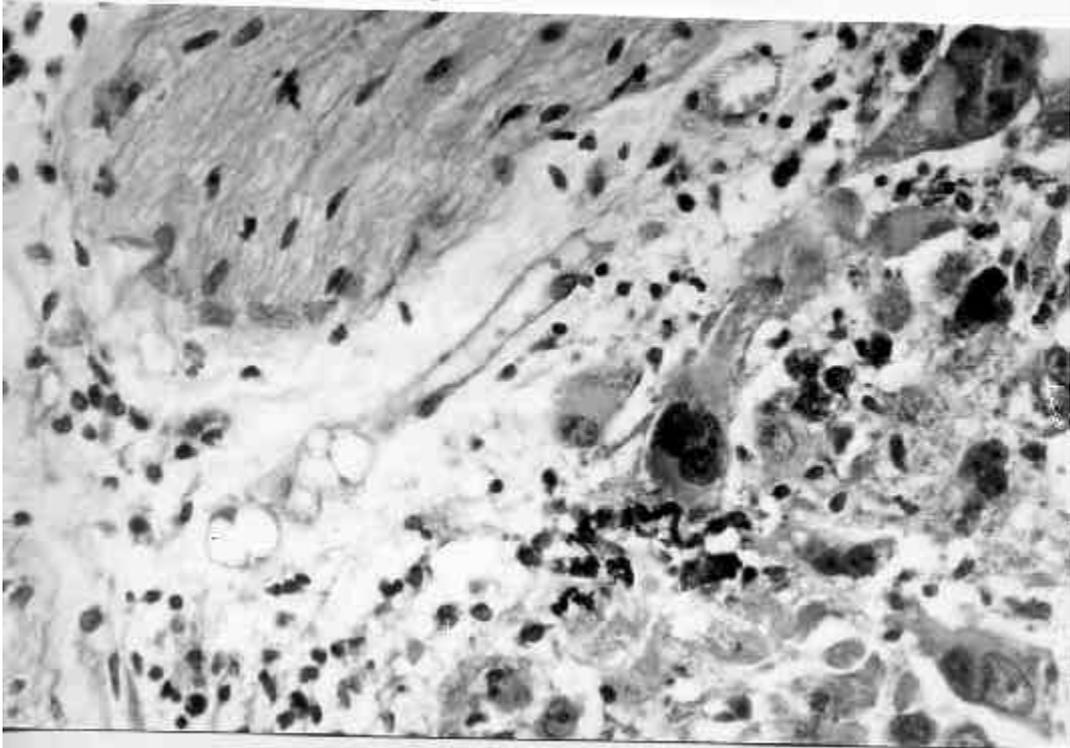


Figura 71

Figuras 72 y 73: Imágenes en las que podemos observar engrosamiento de la pared vascular, así como componente inflamatorio (figura 72) y células neoplásicas en estrecha relación con fibras nerviosas.

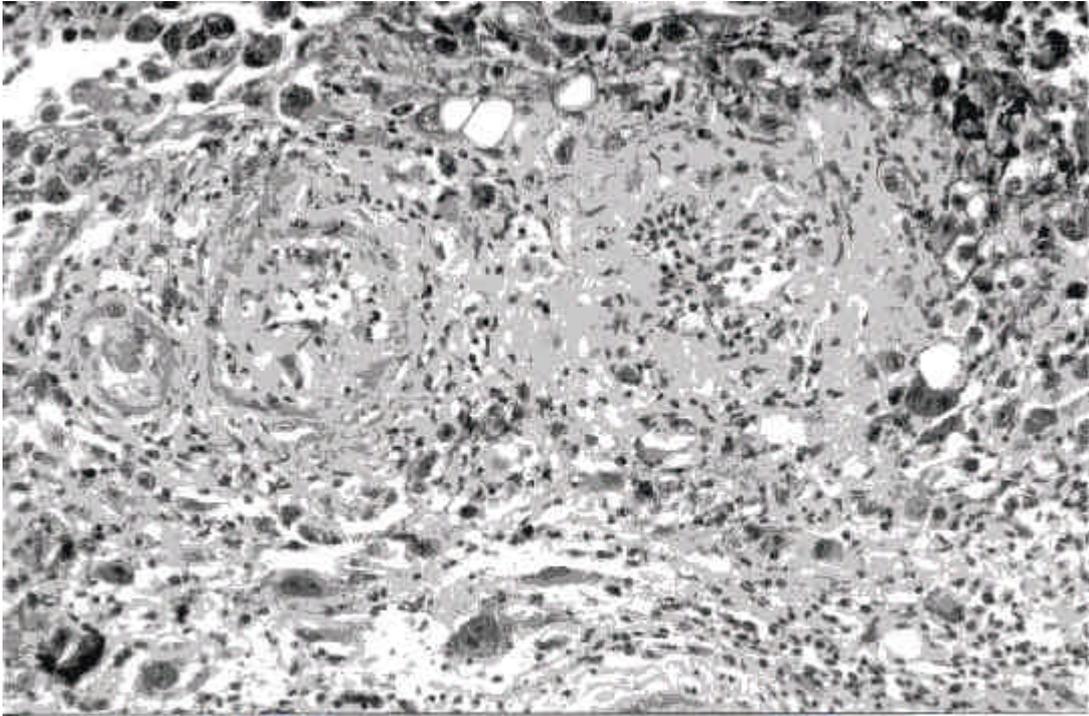


Figura 72

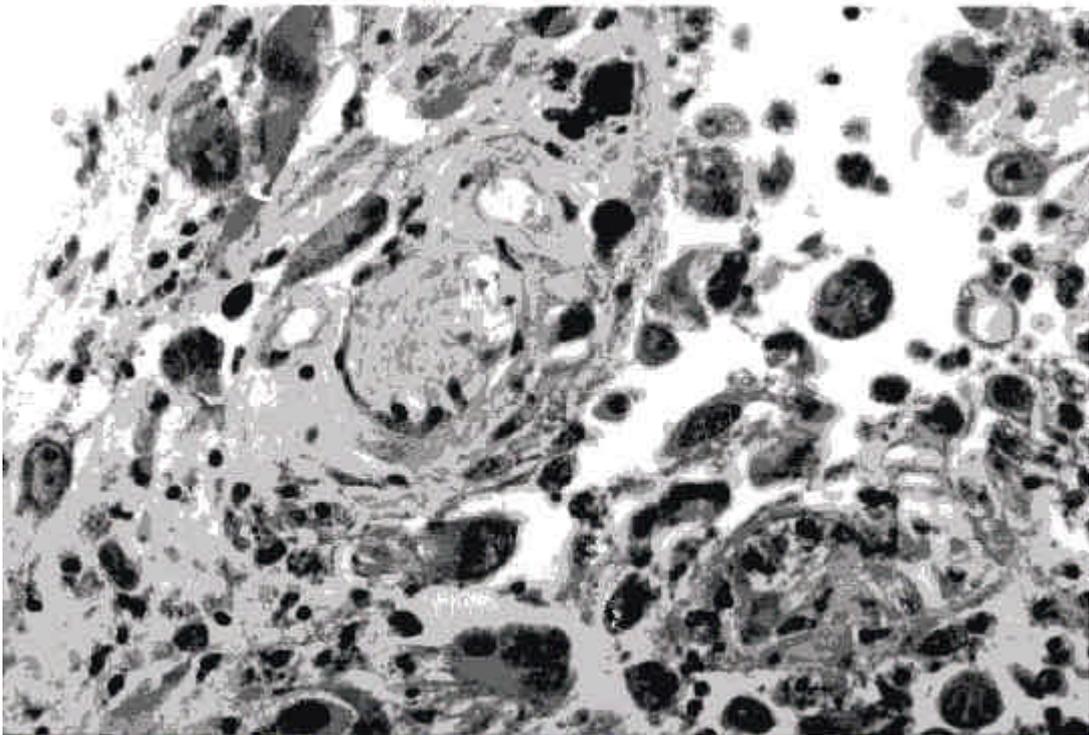


Figura 73

Figuras 74 y 75: Cortes semifinos que muestran características citológicas del componente tumoral: apréciense el pleomorfismo de sus núcleos, desarrollo de los nucleolos, amplios citoplasmas, así como variable proporción de melanosomas.

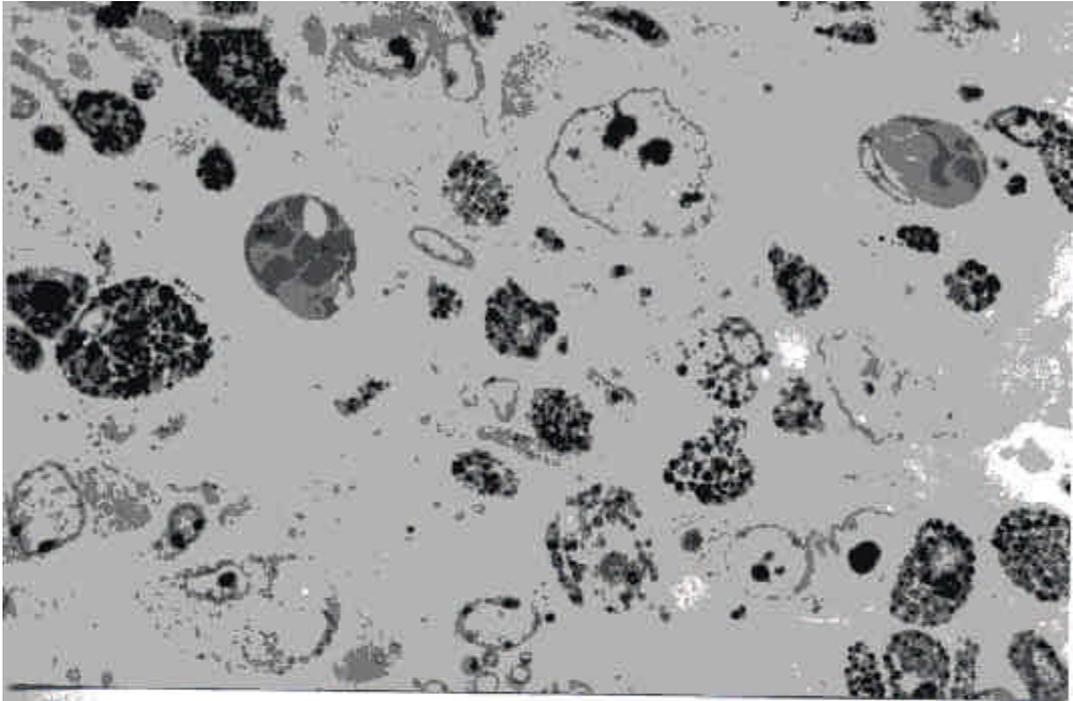


Figura 74

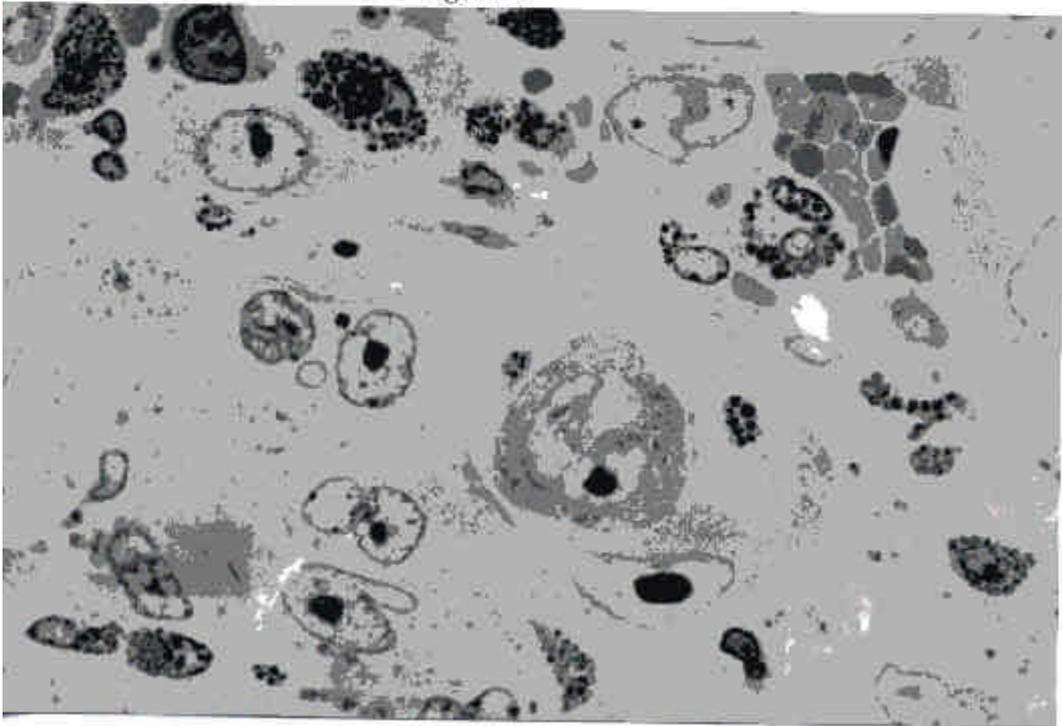


Figura 75

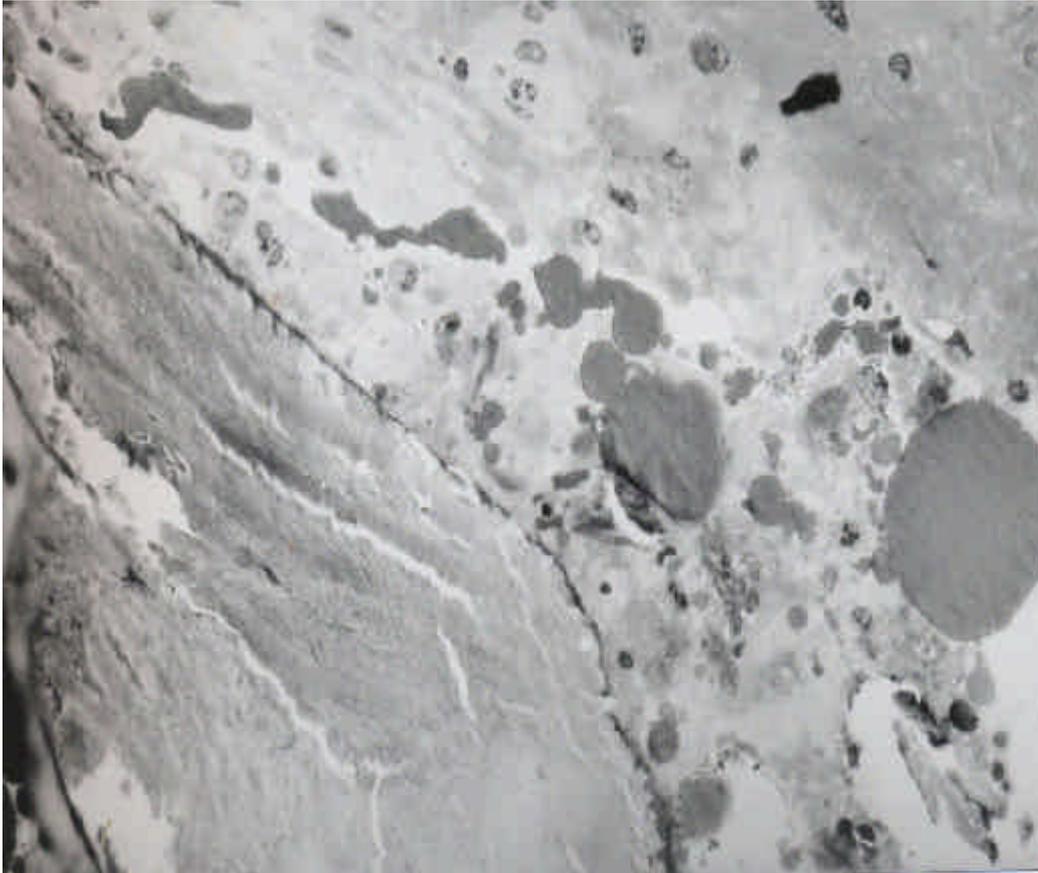


Figura 76: Fenómenos de osificación en los que se destacan una estructura típica con trabéculas óseas maduras.

4.3.2.4 *Subgrupos IVA y IVB: Implante de suspensión celular no irradiada en lecho irradiado. Subgrupo A cuando el intervalo entre irradiación e implante fue inferior a 24 horas. Subgrupo B cuando dicho intervalo fue de siete días.*

Como se ha presentado en las características macroscópicas, con sus correspondientes parámetros, los tumores de esta serie crecieron aproximadamente la mitad respecto a la serie control. En general, se originaron masas claramente detectables, observándose infiltración neoplásica entre el músculo estriado y en torno a las estructuras nerviosas. Al igual que en series precedentes, no encontramos diferencias según que el implante celular se realizara inmediatamente después de irradiar el lecho, como cuando el intervalo fue de siete días.

Microscópicamente se aprecia un crecimiento en forma de masas sólidas con zonas de necrosis (figura 77), llamando la atención que entre las áreas conservadas se observaban fibras musculares estriadas aisladas o en pequeños grupos (figuras 77 y 78), demostrando el crecimiento predominantemente infiltrante de la neoplasia. Como se ha expuesto macroscópicamente, el tumor engloba trayectos nerviosos (figuras 79, 80 y 81).

En cortes semifinos evidenciamos células neoplásicas con variable pleomorfismo, nucleolos prominentes y diferente cantidad de pigmento melánico. Dichas células muestran figuras de mitosis con relativa frecuencia (figura 82). Entre las mismas aparecen fibras musculares estriadas degeneradas (figura 83) y vasos sanguíneos. Estos últimos muestran sangre "fresca" en su interior y endotelios relativamente preservados (figura 84). En ocasiones las plaquetas aparecen adheridas a

Figuras 77 y 78: Crecimiento de las células melánicas que siguen un patrón claramente infiltrante. Se pueden distinguir zonas necróticas, así como restos de fibras musculares estriadas esqueléticas.

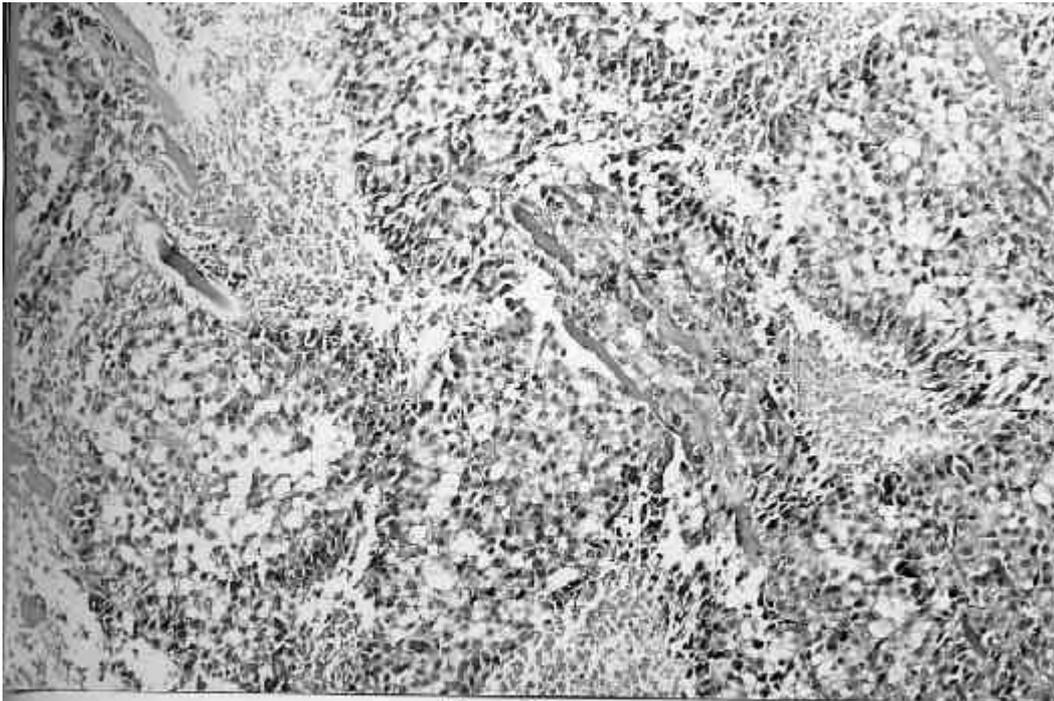


Figura 77

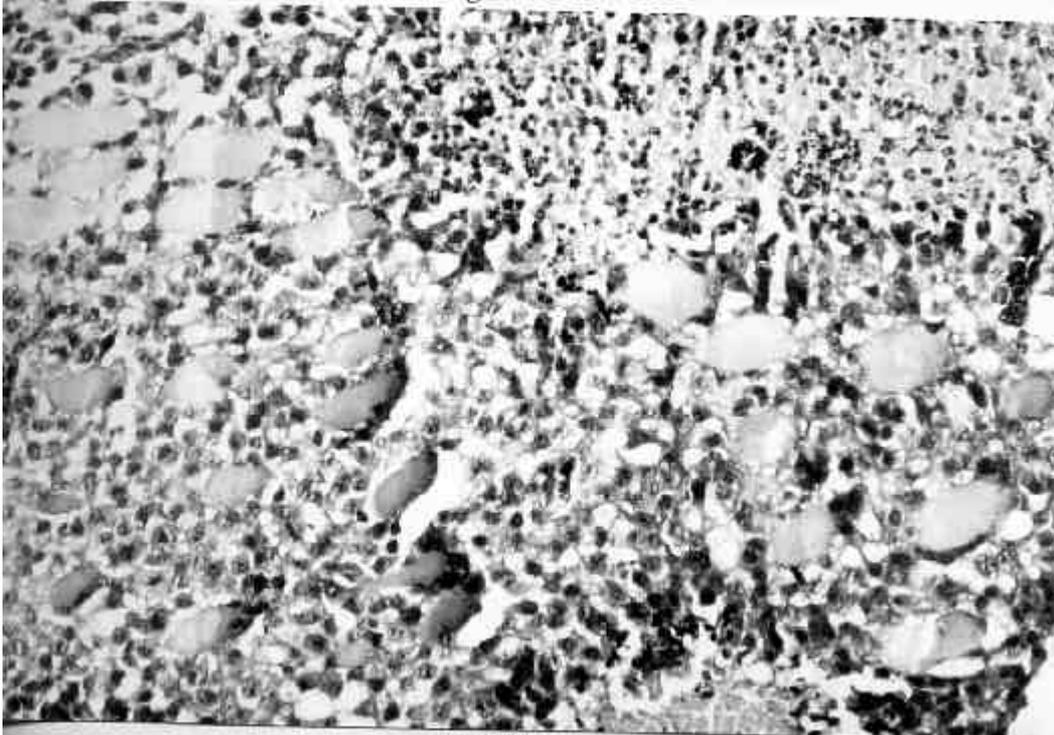


Figura 78



Figura 79

Figuras 79,80 y 81: Diversas imágenes en las que distinguimos el crecimiento del implante de melanoma que rodea completamente a varios trayectos nerviosos.

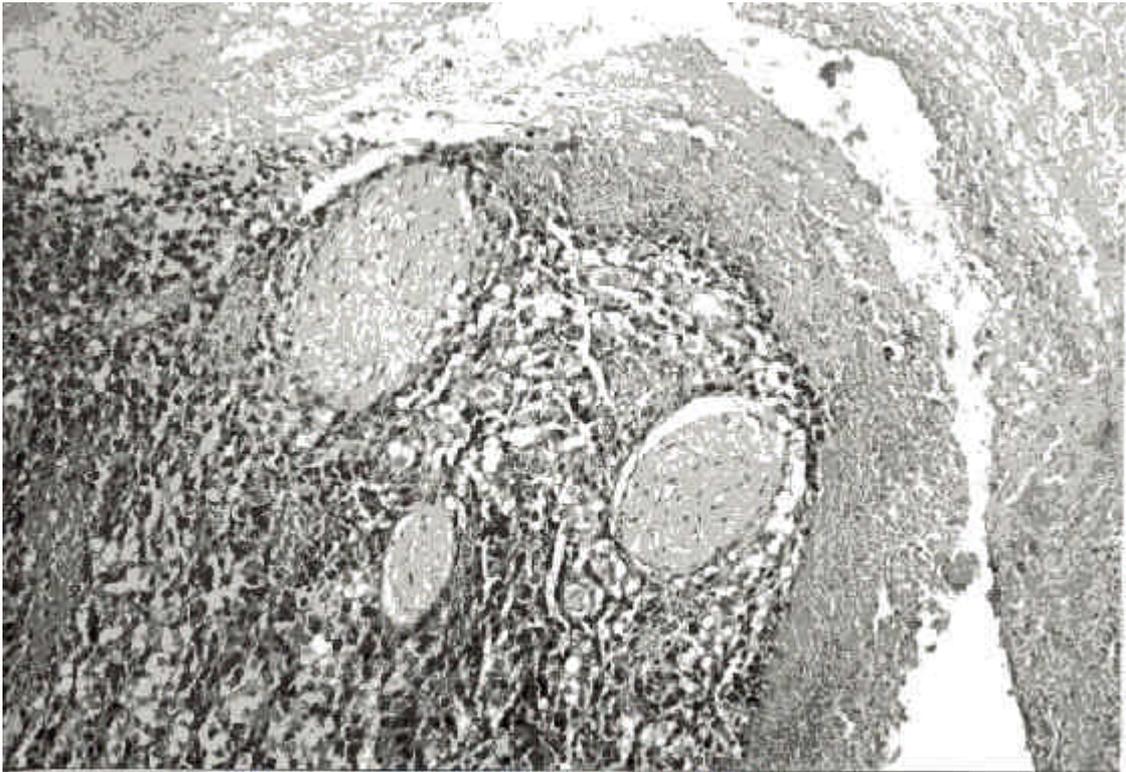


Figura 80

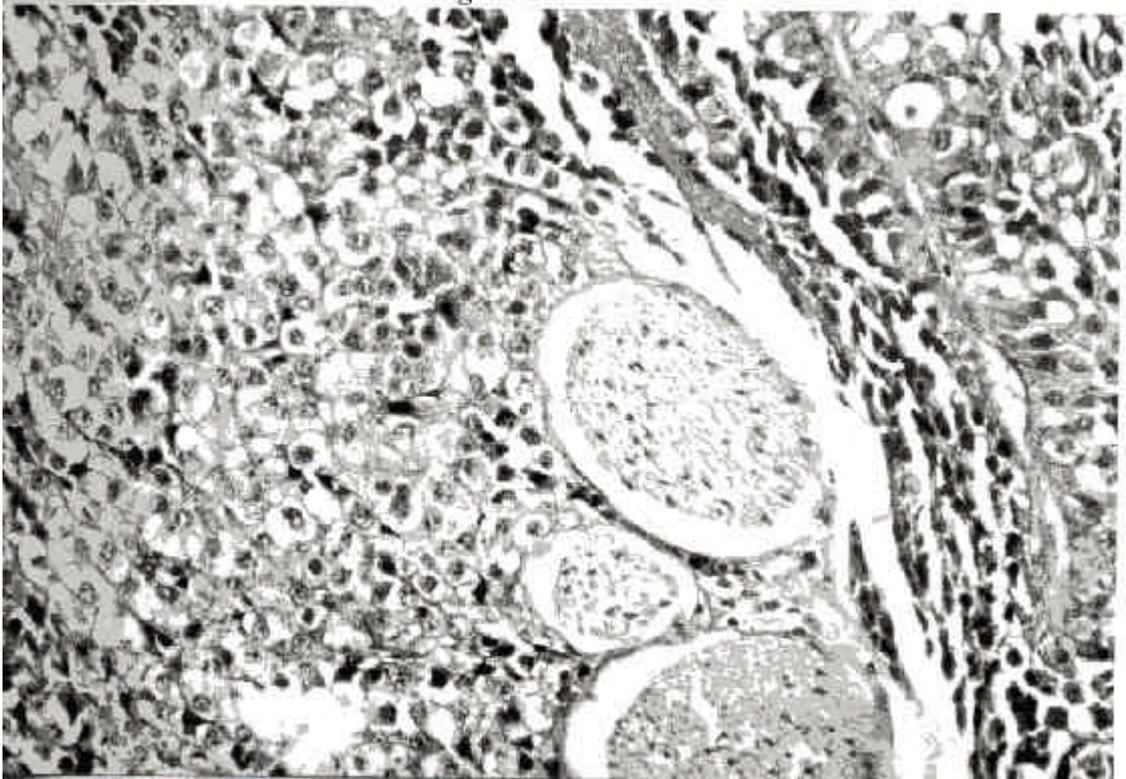


Figura 81

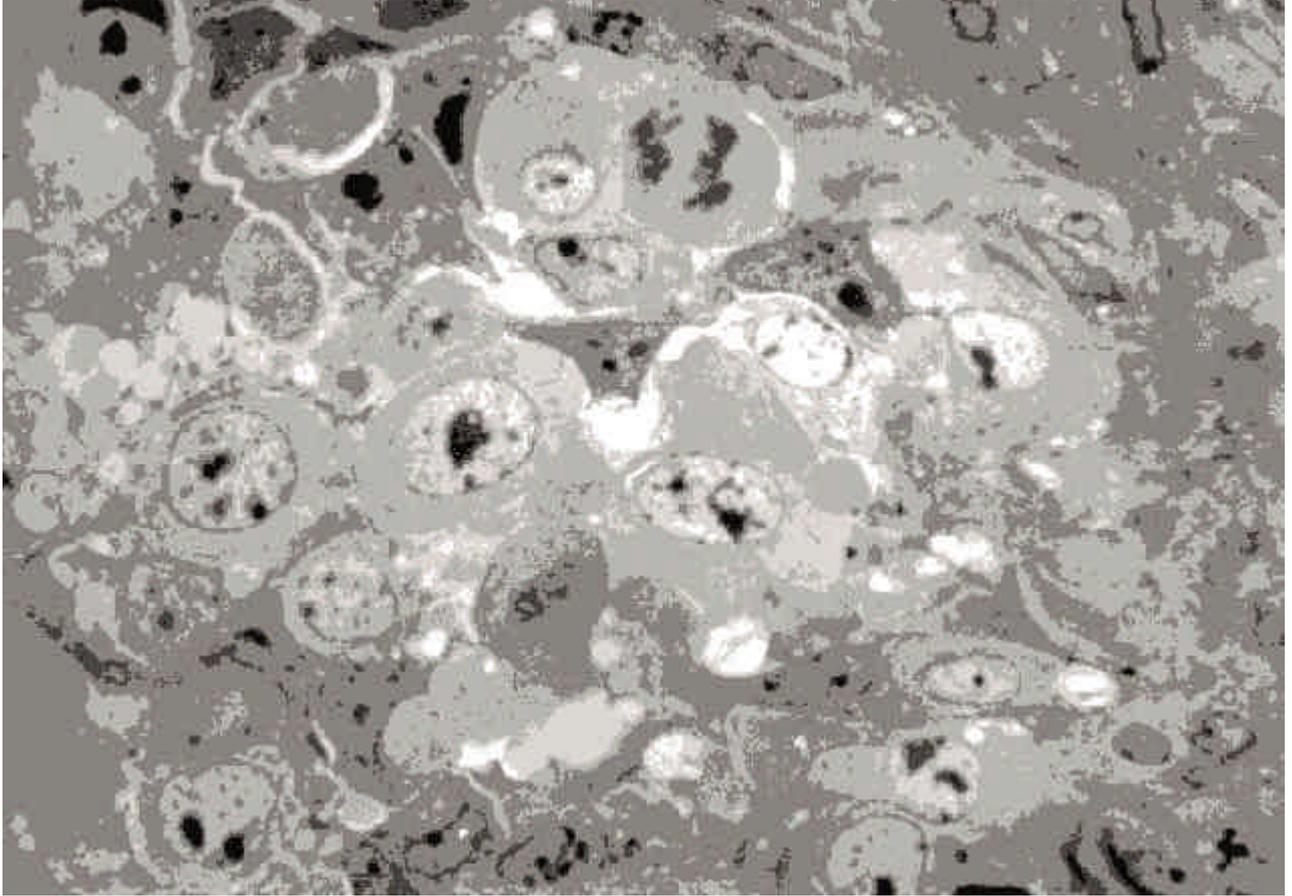


Figura 82

Figuras 82,83 y 84: Diferentes aspectos del crecimiento tumoral en cortes semifinos. Se aprecian células tumorales de gran tamaño, con variable proporción de melanina y en las que es posible observar alguna mitosis (figura 82). El componente del lecho receptor, fibras musculares esqueléticas, muestra signos degenerativos (figura 83). Asimismo es posible encontrar endotelios relativamente conservados (figura 84).

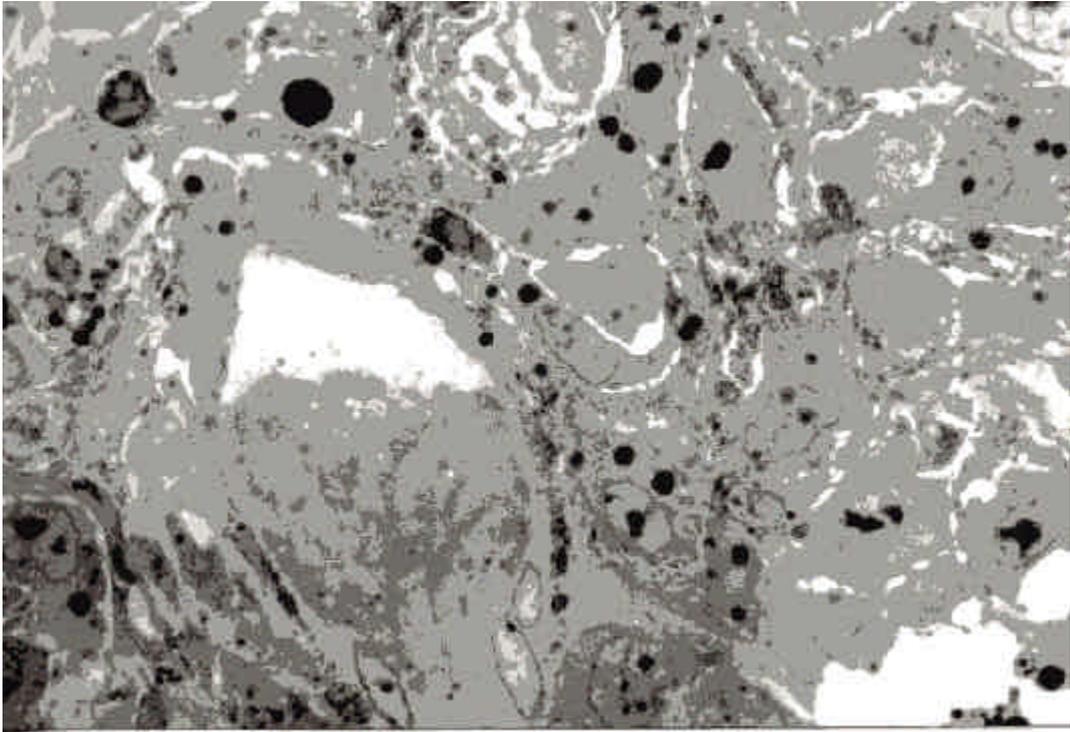


Figura 83

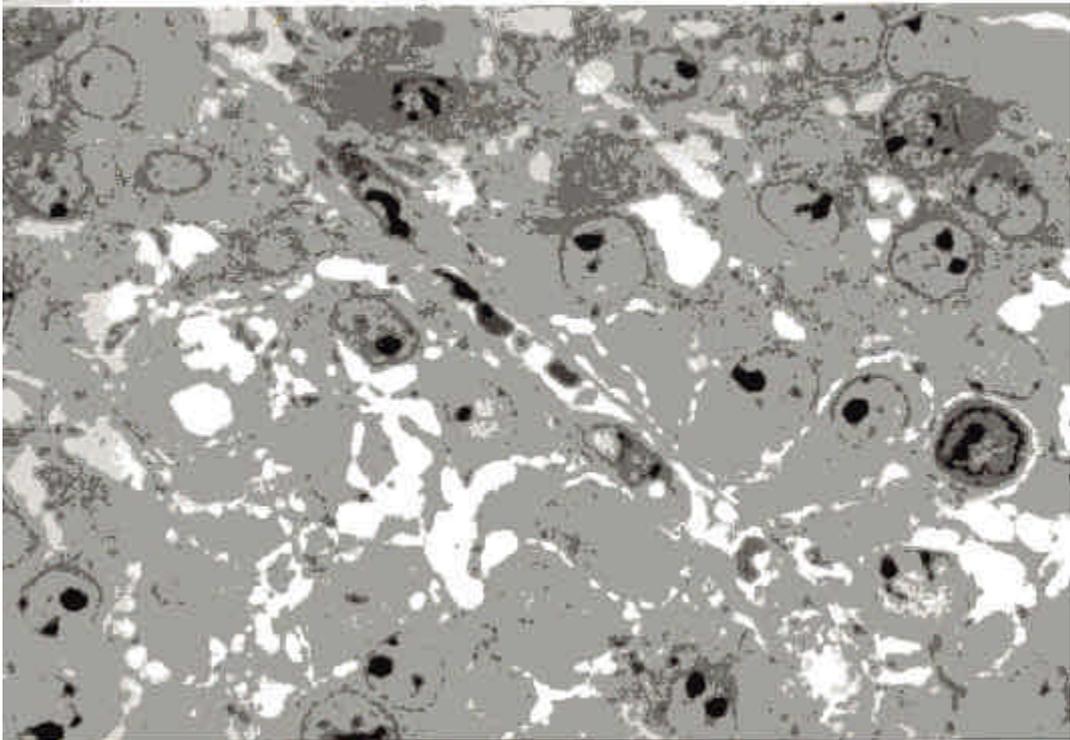


Figura 84

la pared vascular o incrementadas en número (figura 85). Observamos también espacios hemáticos en los que no se reconoce endotelio de revestimiento en algunas áreas, con discretos depósitos de fibrina en su entorno (figura 86).

4.3.2.5 *Subgrupos VA y VB: implante de suspensión celular irradiada en lecho no irradiado. Subgrupo A cuando el intervalo entre irradiación e implante fue inferior a 24 horas. Subgrupo B cuando dicho intervalo fue de siete días.*

En las presentes series se observó un crecimiento discreto, milimétrico, en el área donde se implantaron las células tumorales, poniéndose de manifiesto por una zona algo prominente y pigmentada, los resultados fueron similares tanto cuando el intervalo temporal fue inferior a veinticuatro horas o de una semana, por lo que expondremos los hallazgos de forma conjunta.

Microscópicamente las células neoplásicas originaban la presencia de pequeños acúmulos superficiales (figuras 87 y 88) y, en ocasiones entre el tejido conectivo subyacente (figura 89). En ambos casos pusimos de manifiesto asociación a estructuras nerviosas (figuras 87 y 89). En ocasiones las células neoplásicas invadían espacios perineurales o crecían dentro de los propios trayectos nerviosos (figuras 89, 90 y 91). Entre el componente celular neoplásico se pusieron de manifiesto abundantes melanófagos (figuras 92 y 93).

En cortes semifinos los elementos proliferantes muestran marcadas irregularidades nucleares, con nucleolos prominentes y citoplasmas en los que se

Figuras 85 y 86: Cortes semifinos donde se aprecian aspectos de la microcirculación en lecho irradiado: ocasionalmente se aprecian elementos plaquetarios que se adhieren a la luz vascular (figura 85). Por otro lado, también es posible poner de manifiesto “las sombras ” de vasos preexistentes en las que no se reconocen las células endoteliales (figura 86)

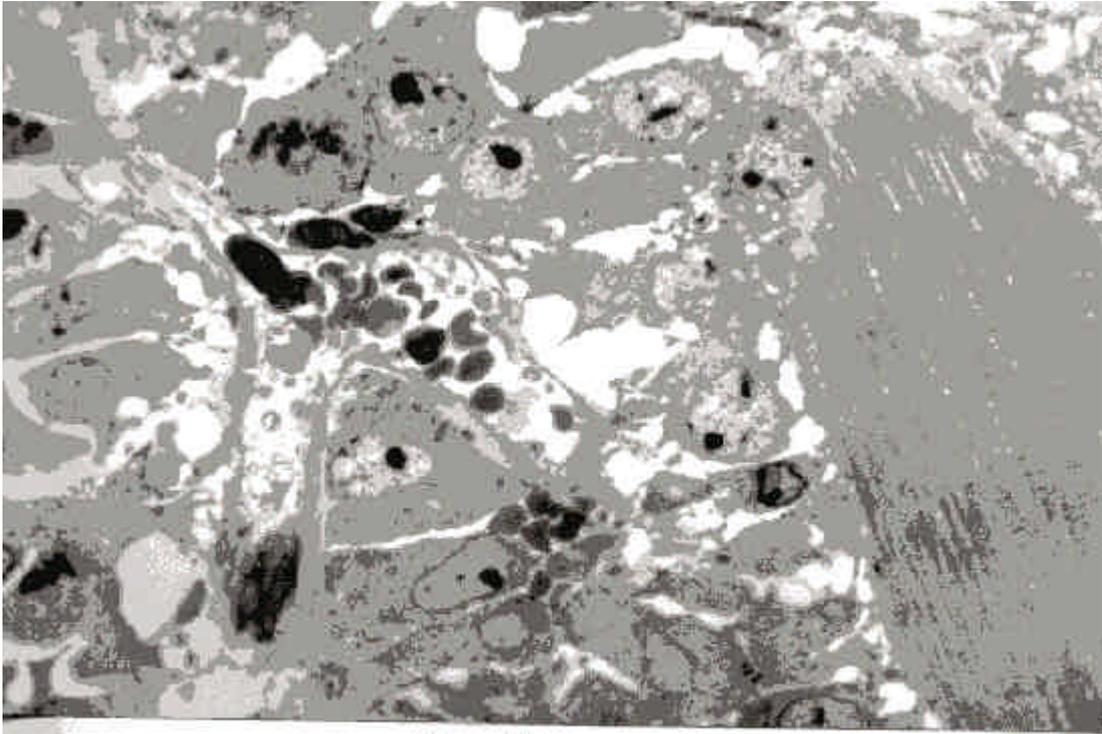


Figura 85

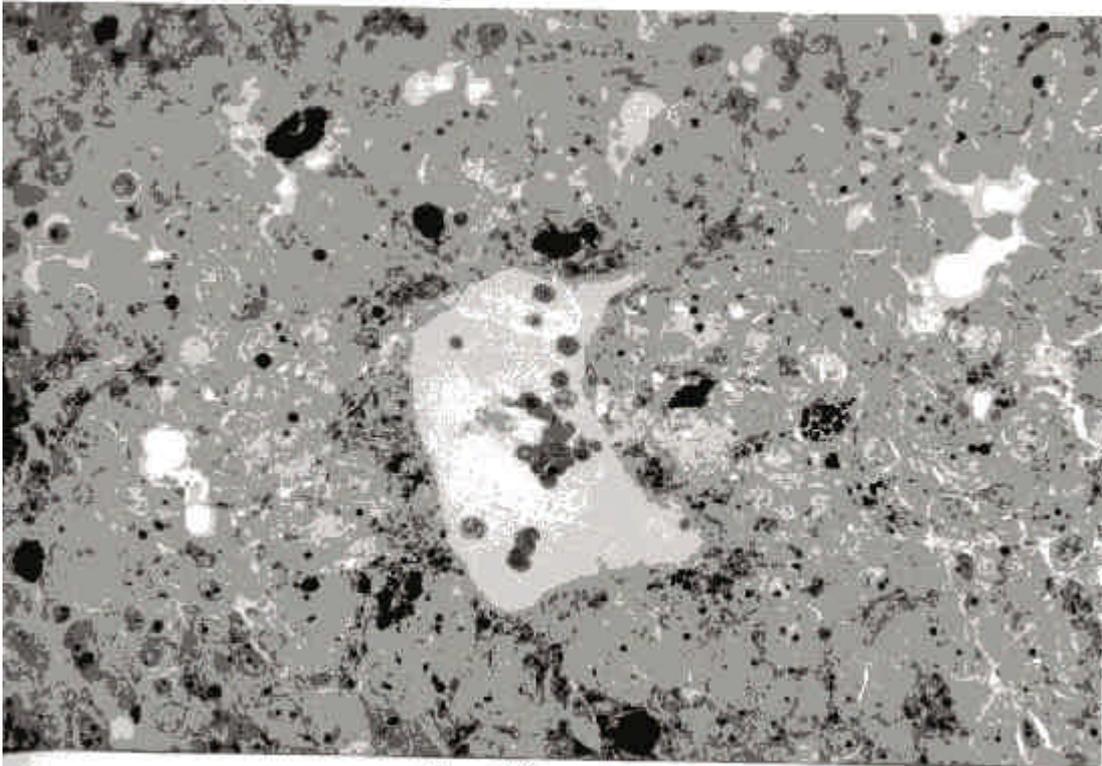


Figura 86

Figuras 87 y 88: Disposición en acúmulos del implante de melanoma tanto en áreas superficiales así como situación próxima a las fibras nerviosas

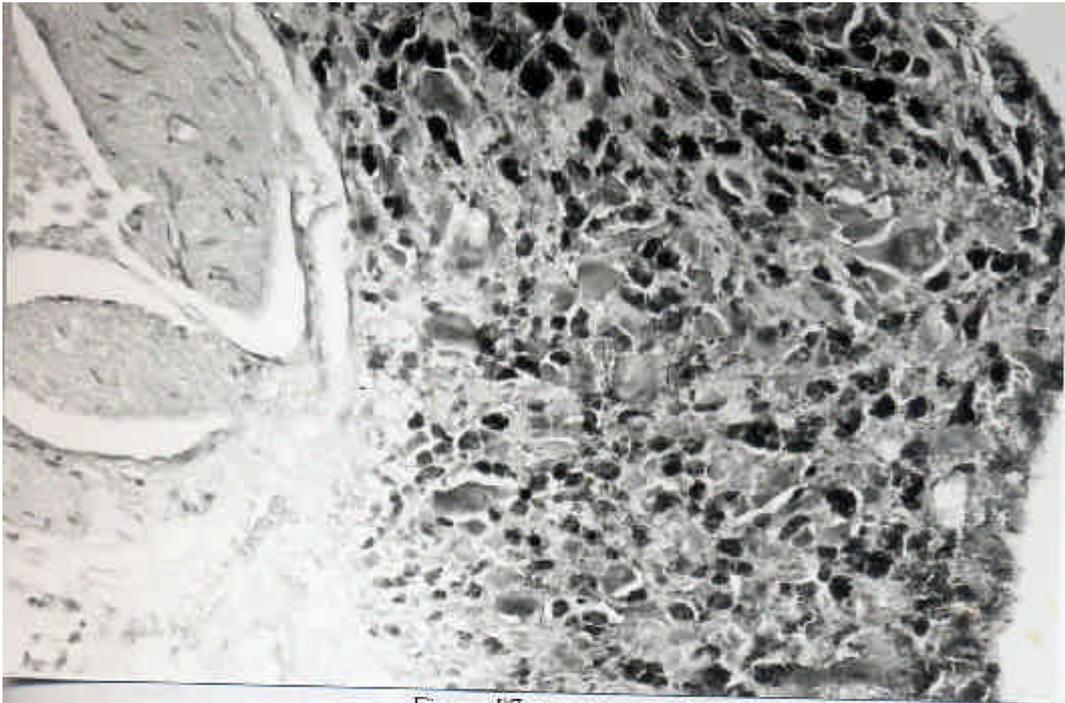


Figura 87

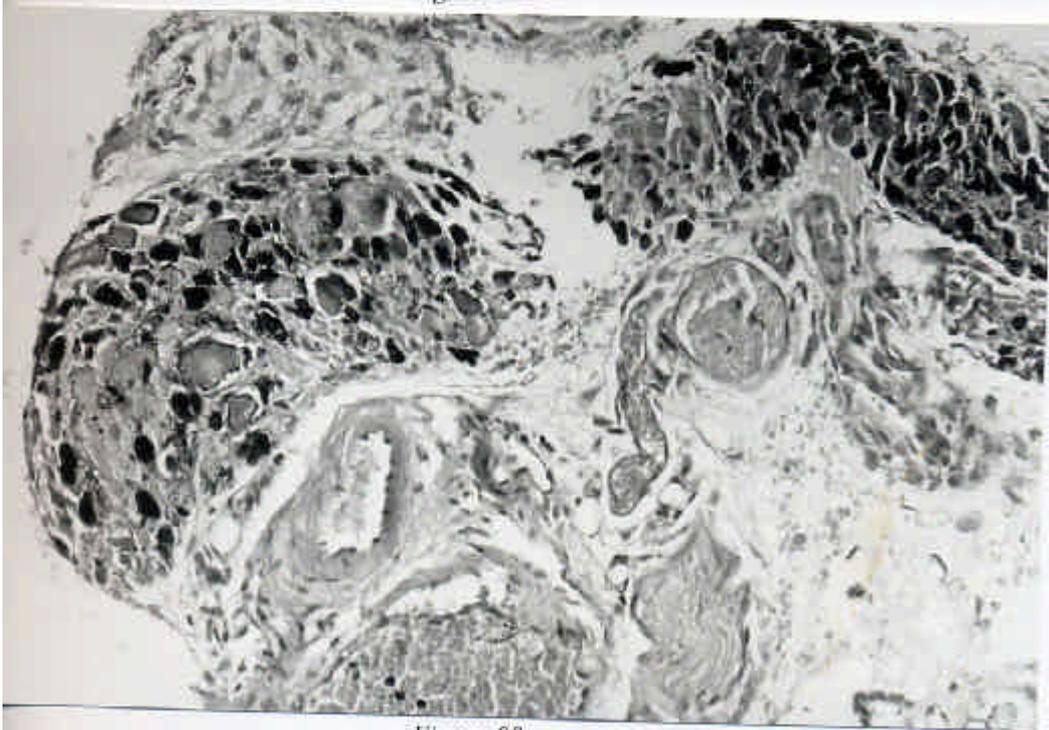


Figura 88



Figura 89

Figuras 89, 90 y 91: Distribución en acúmulos del melanoma en el tejido conectivo subyacente (figura 89). En ocasiones invadían los espacios perineurales y los propios trayectos nerviosos (figuras 88,90 y 91).

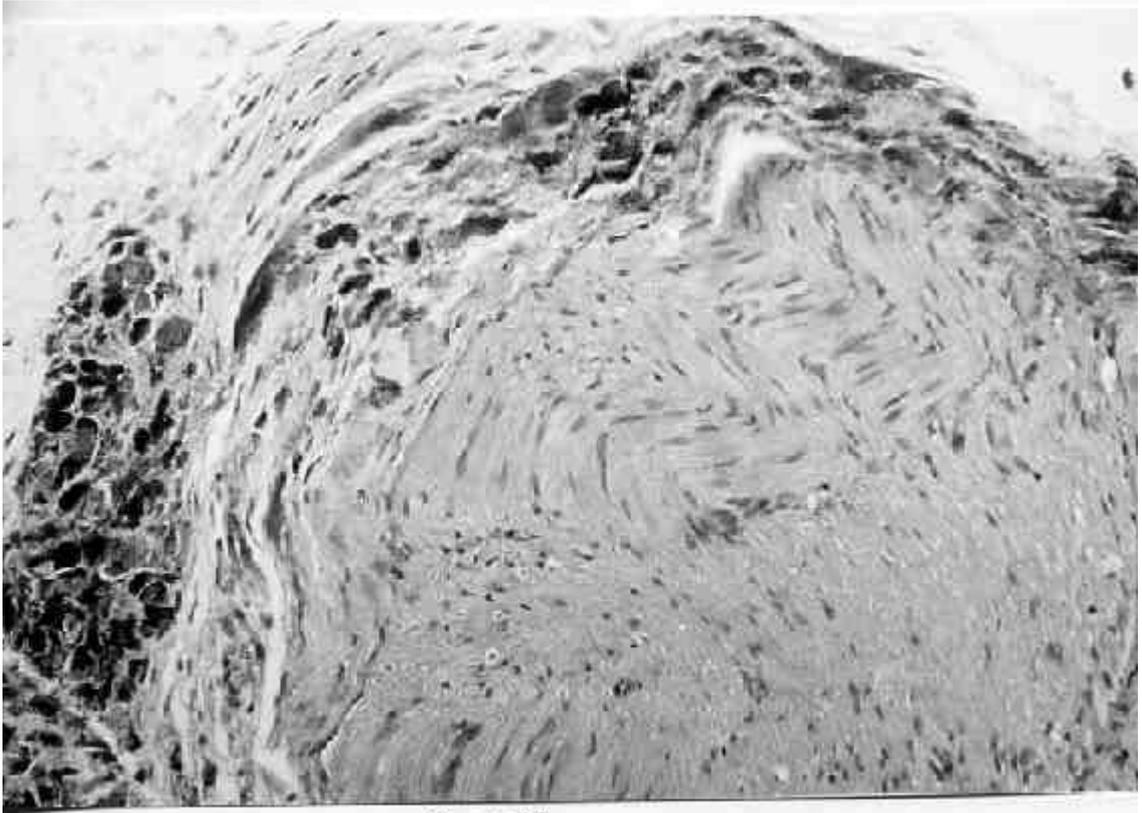


Figura 20



Figura 21

Figuras 92 y 93: Interpuestos con el componente tumoral es posible destacar numerosos melanófagos.

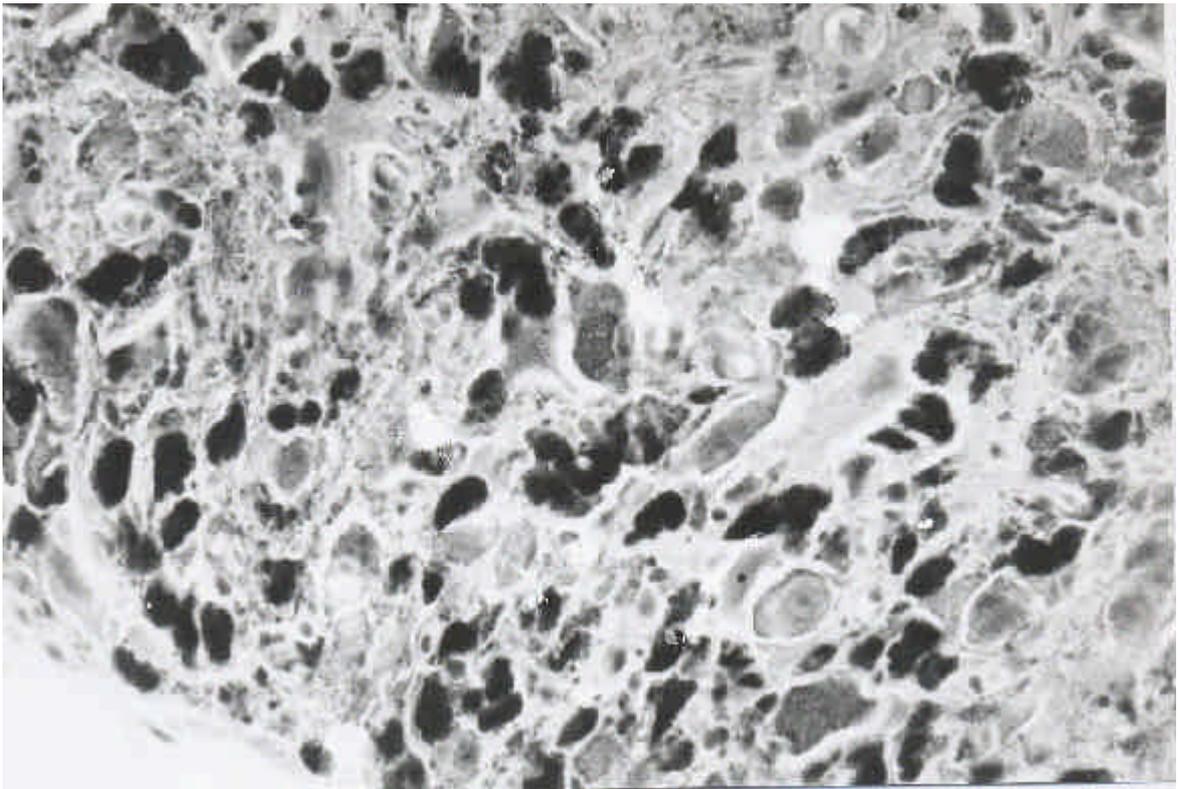


Figura 92

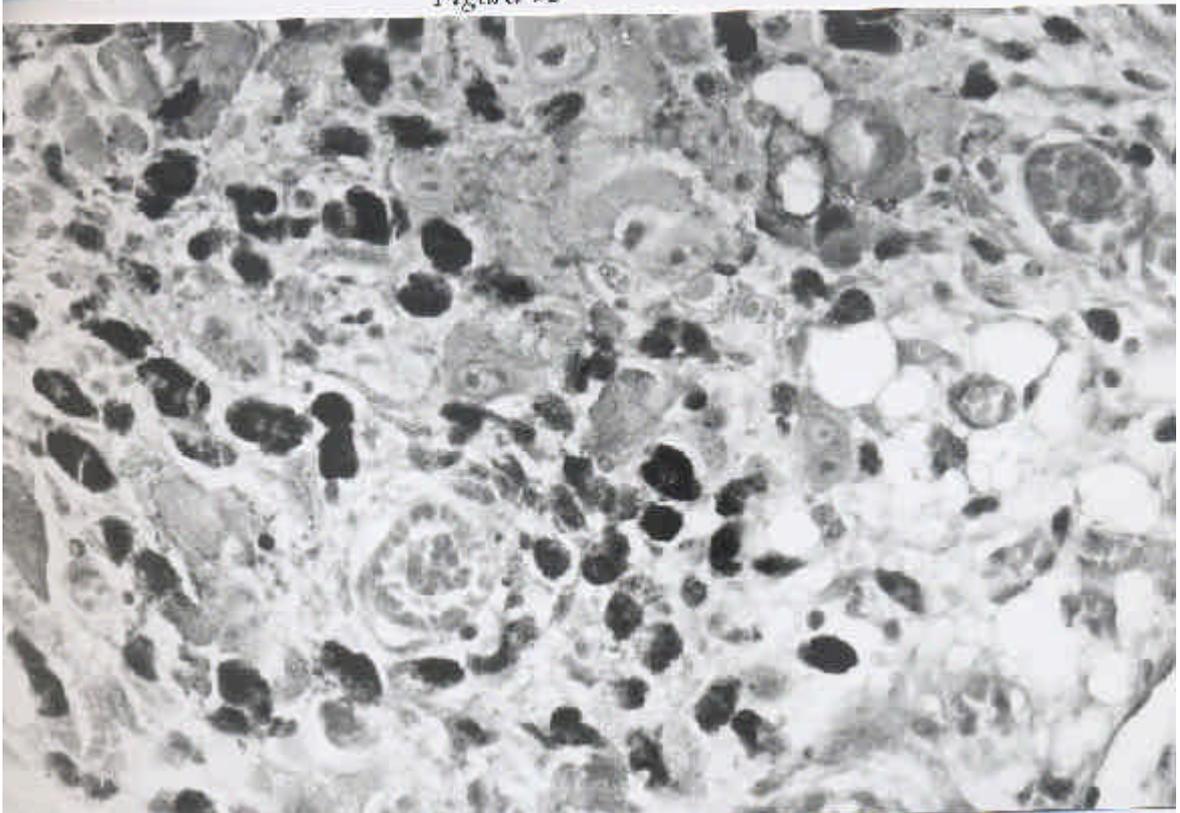


Figura 93

aprecia variable cantidad de pigmento melánico (figuras 94 y 95). Los melanófagos destacan por la existencia de abundantes lisosomas secundarios, ampliamente contrastados en sus citoplasmas. Entre las células neoplásicas se ponen de manifiesto pequeños vasos sanguíneos de endotelios aplanados (figuras 95, 96 y 97).

4.3.2.6 *Subgrupos VIA y VIB: Implante de suspensión celular irradiada sobre lecho irradiado. Subgrupo A cuando el intervalo entre irradiación e implante fue inferior a 24 horas. Subgrupo B cuando dicho intervalo fue de siete días.*

Al igual que en algunas de las series anteriores, son presentadas conjuntamente las dos subseries, ya que se obtuvieron resultados análogos.

Desde el punto de vista macroscópico llama la atención la presencia de un área pigmentada de oscuro, no prominente en el sitio donde se implantaron las células. Dicha área corresponde sobre todo a la superficie de fascias y de tejido nervioso.

El estudio microscópico mostró la presencia de macrófagos cargados de pigmentos (melanófagos). Los macrófagos tienden a disponerse alrededor de vasos sanguíneos o bien en pequeños acúmulos (figuras 98 y 99). Se apreciaron también escasas células melánicas, muy pleomórficas, con núcleos abigarrados y polilobulados (figuras 100 y 101). En general presentan citoplasmas amplios con variable cantidad de pigmento melánico, que tiende a distribuirse en la periferia de las células.

Figuras 94,95: Cortes semifinos donde se aprecian con claridad características citológicas del componente tumoral: núcleos irregulares y destacados nucleolos, así como variable proporción de pigmento melánico. Resulta llamativa la existencia de abundantes melanófagos localizados conjuntamente con el componente tumoral; estas células presentan abundantes lisosomas secundarios.

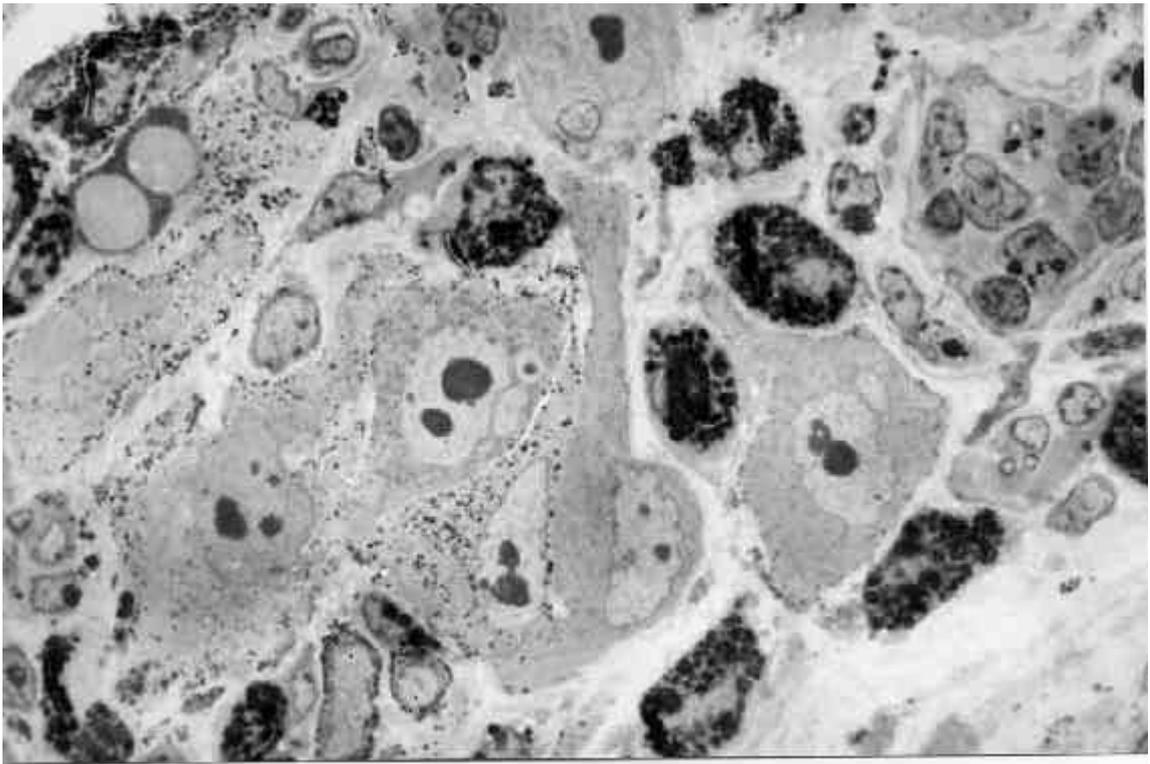


Figura 94

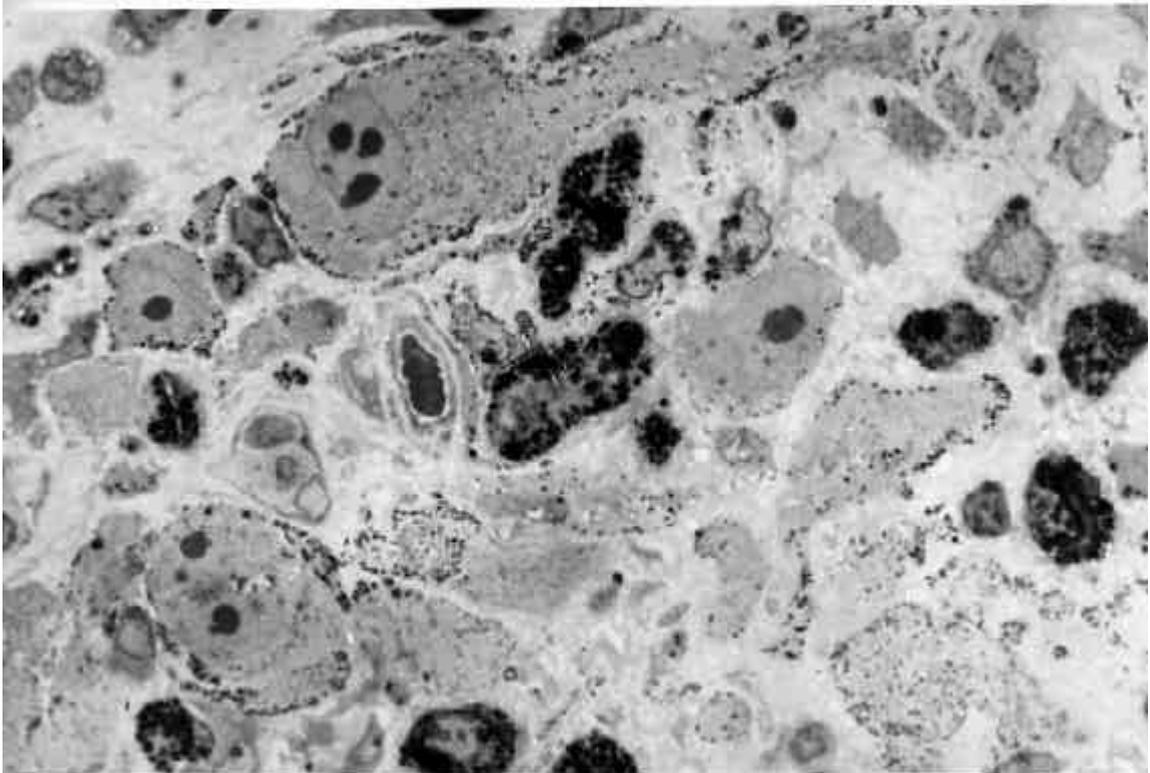


Figura 95

Figuras 96 y 97: Es de destacar la existencia de neovasos en los que se observan células endoteliales aplanadas.

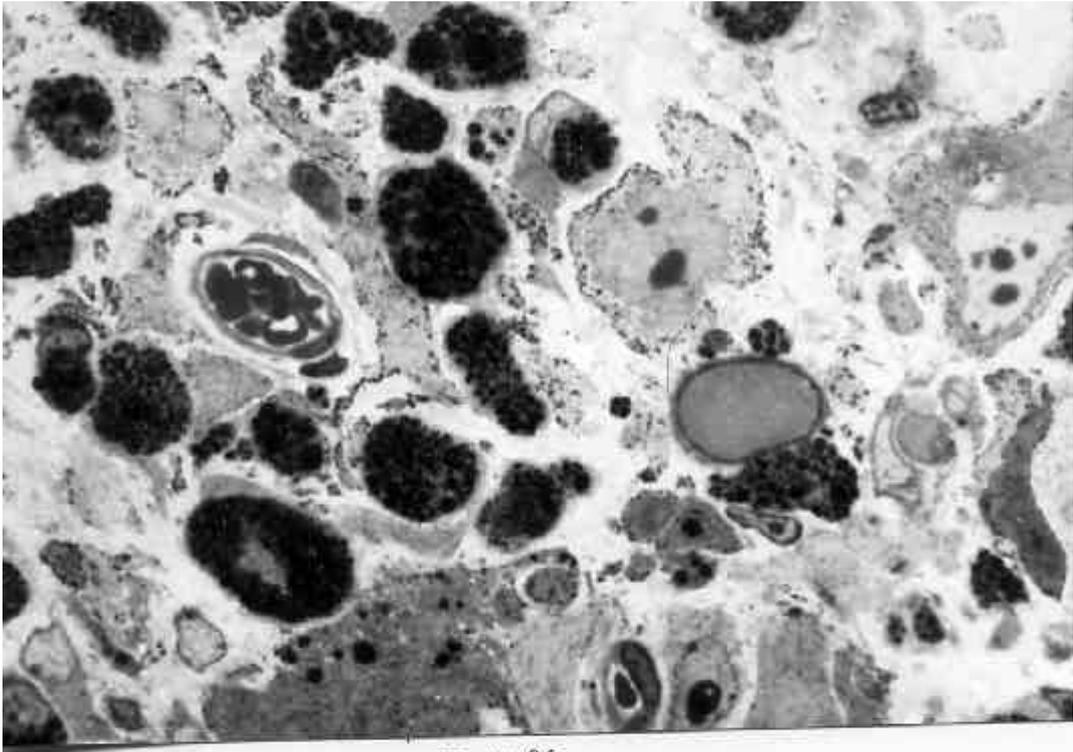


Figura 96

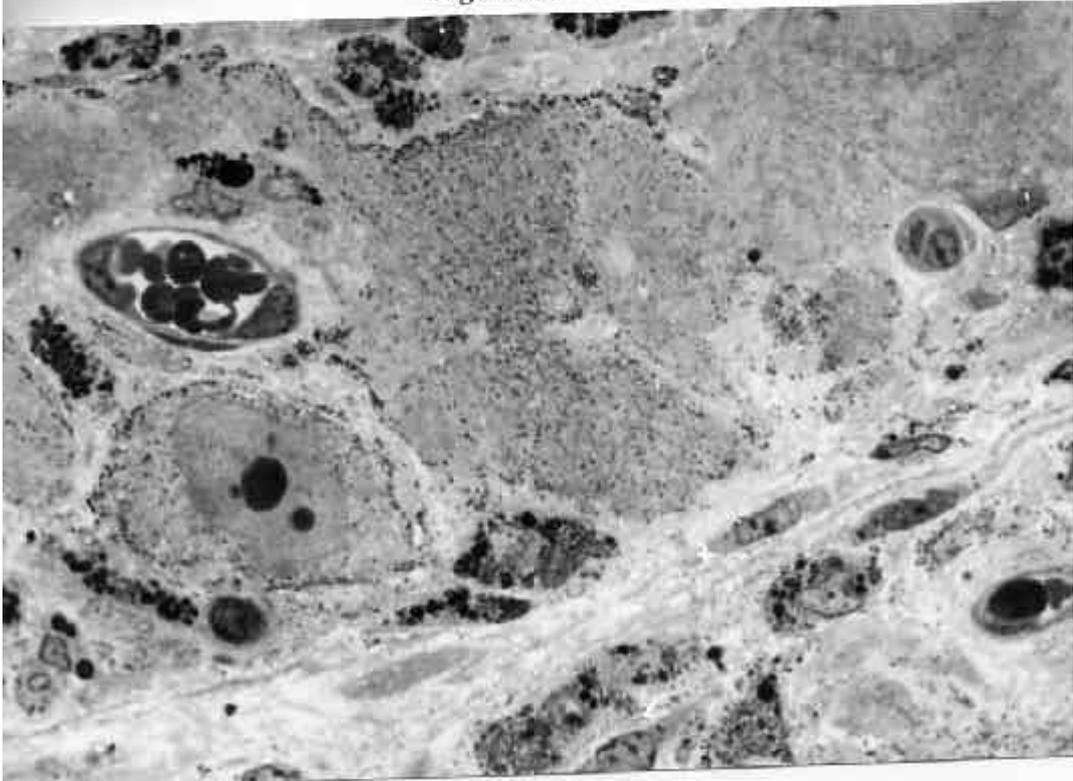


Figura 97

Figuras 98 y 99: Apréciense la disposición en acúmulos de células macrofágicas (melanófagos) próximos a vasos sanguíneos.

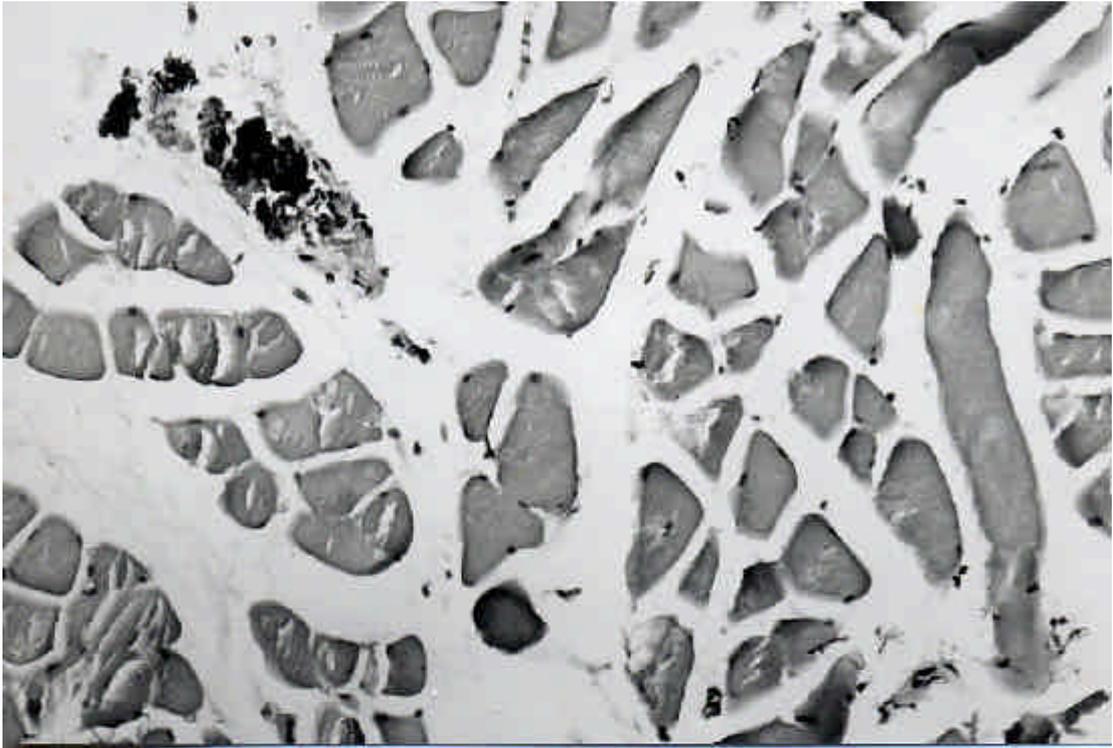


Figura 98

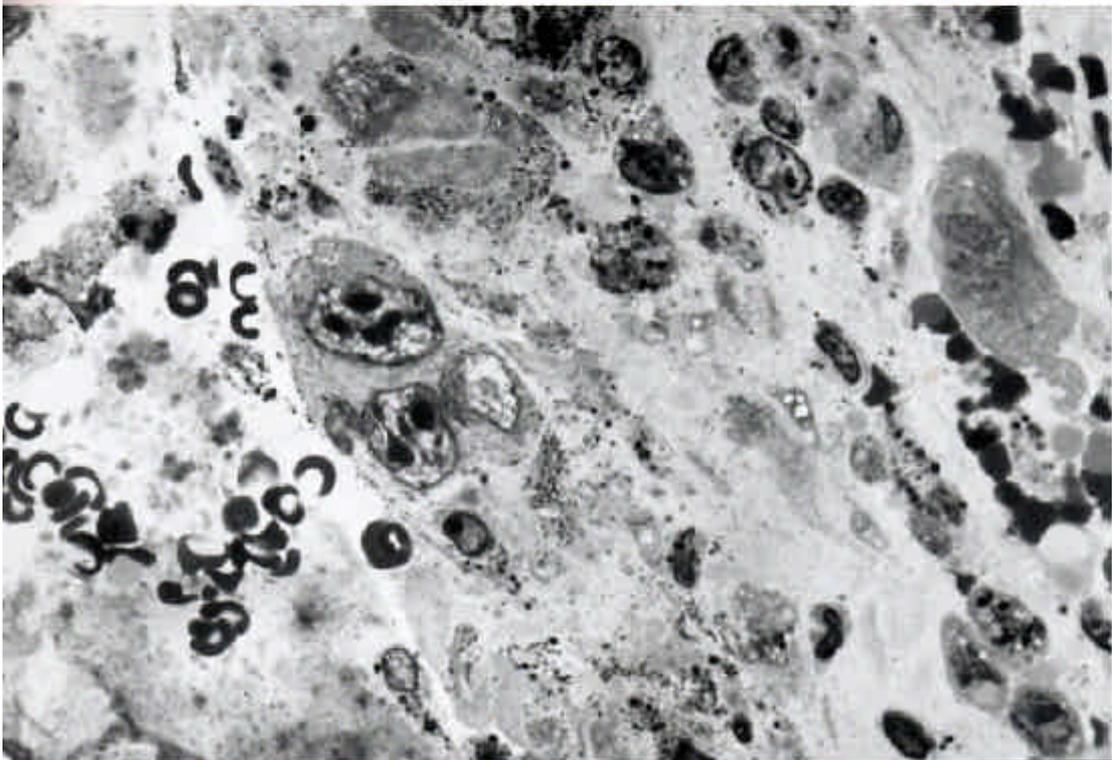


Figura 99

Figuras 100 y 101: Componente tumoral en donde se destacan su pleomorfismo celular, así como núcleos lobulados y disposición periférica del pigmento melánico en su citoplasma.

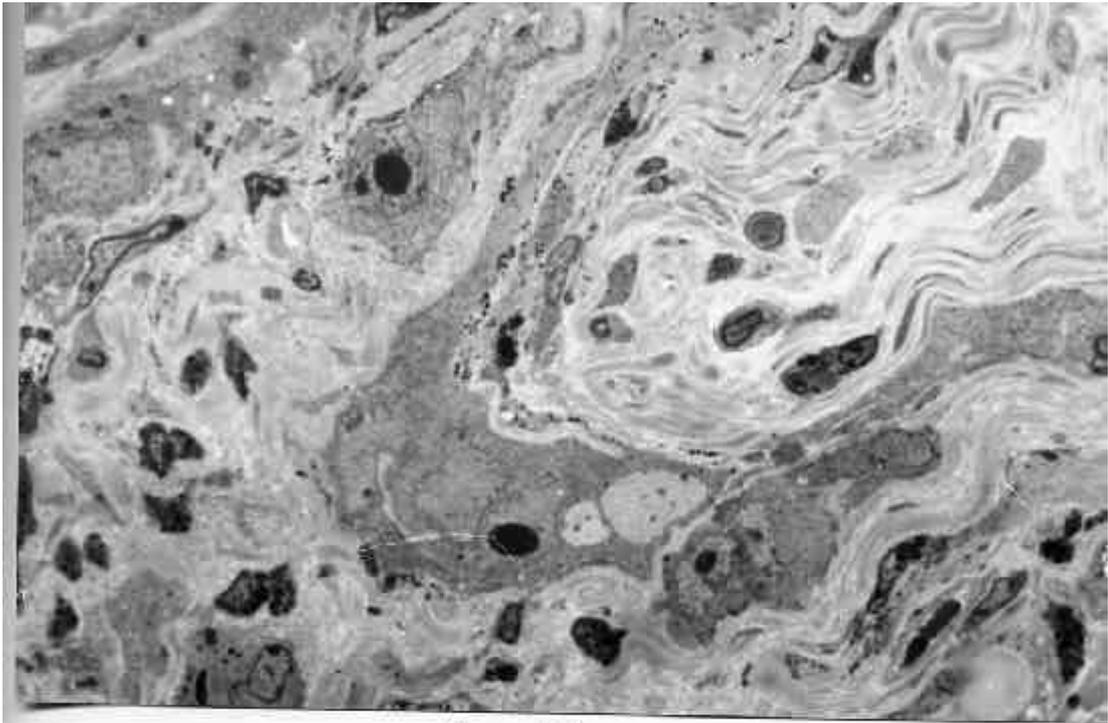


Figura 100

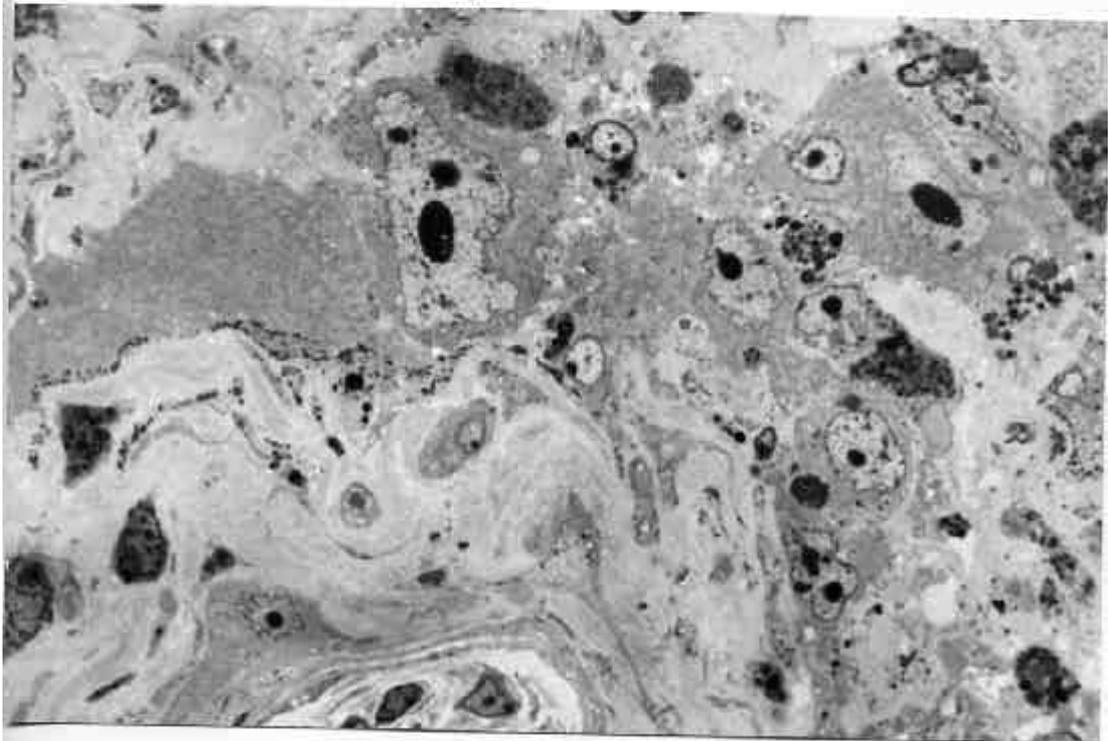


Figura 101

Un hecho que nos ha llamado la atención en estos casos es la presencia de focos de adipogénesis en cuyo entorno se observan macrófagos cargados con pigmentos melánicos. De estas áreas, las células adiposas son multiloculares y de disposición perivascular, observándose también algunos macrófagos cargados con lípidos (figuras 102 y 103).

Figuras 102 y 103: Fenómenos de adipogénesis en el lecho receptor. Obsérvense los adipocitos multiloculares (grasa parda) y su disposición perivascular. También se aprecian algunos macrófagos con material lipídico en su citoplasma.

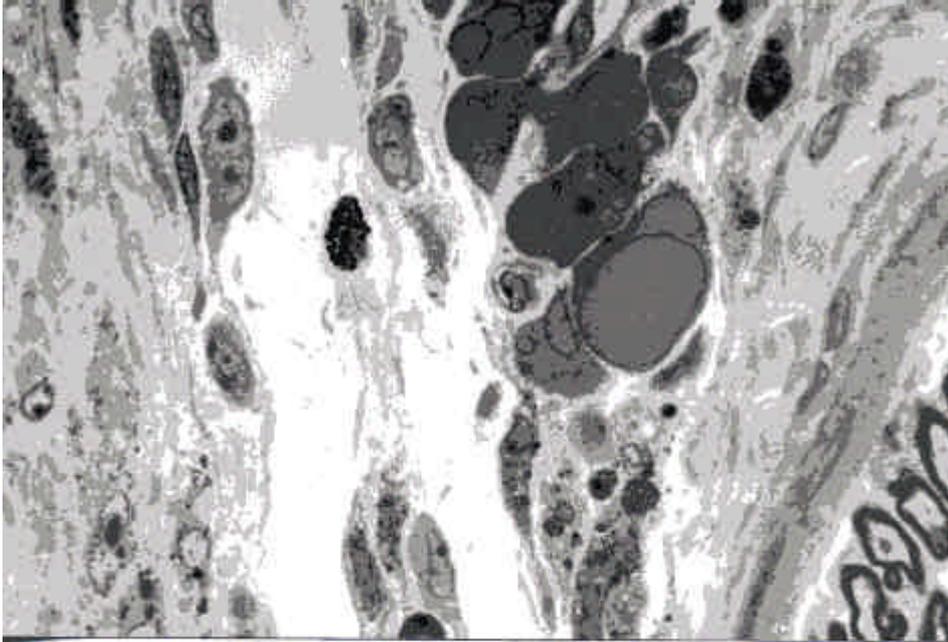


Figura 102

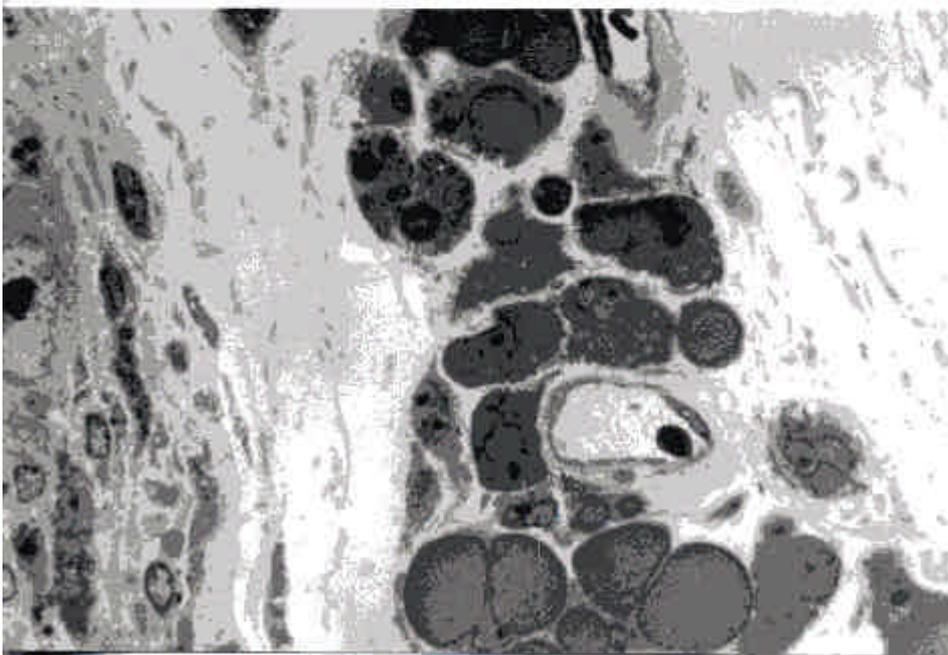


Figura 103

5 DISCUSIÓN

Como expusimos en los planteamientos de la presente Tesis Doctoral, el objetivo fundamental del trabajo se centra en el estudio por un lado de la evolución del implante tumoral tras su ubicación en animales control y la comparación de dicha respuesta cuando sometemos bien el lecho, bien el tumor, a la acción de las radiaciones ionizantes (80 Gy en fracción única); por otro lado pretendimos valorar la respuesta angiogénica al estímulo tumoral, así como su posible variación tras administrar dicha pauta de radiación.

5.1. VOLUMEN TUMORAL:

Los resultados obtenidos tras catorce días del implante de melanoma en los animales control nos indican que el modelo experimental elegido permite apreciar fácilmente la evolución del implante tumoral; su pigmentación de color negro hace que macroscópicamente sea visible y cuantificable. En los animales control el tumor alcanzó un volumen que osciló entre 419 y 1089 milímetros cúbicos, en estas series se pone de manifiesto - tanto desde el punto de vista macroscópico, como microscópico- la existencia de una rica neovascularización íntimamente relacionada con el nódulo tumoral.

Las diferentes variables experimentales analizadas alteraron de forma significativa dicho crecimiento tumoral y la respuesta angiogénica. Pasaremos a analizar cada uno de estos factores:

5.1.1 INFLUENCIA DEL ELEMENTO IRRADIADO

5.1.1.1 Irradiación del lecho (*Efecto lecho tumoral ó Tumor Bed Effect*):

Los resultados obtenidos reflejan que tras la administración al lecho receptor de una dosis de 80 Gy se produce un retraso en el crecimiento tumoral frente al encontrado en las series control (tanto de tumor sólido como de suspensión celular de melanoma), esta variación del crecimiento tumoral hemos comprobado que es estadísticamente significativo con $p=0,001$ (apartado 4.2.1.1). Dicho resultado coincide con los datos ya aportados en la literatura sobre T.B.E. ^{6,135,176,262,334}.

En cuanto a la posible influencia del tipo tumoral T.B.E., experiencias previas ¹⁷² han demostrado un mayor T.B.E para los carcinomas mamarios que los fibrosarcomas, posiblemente relacionado este aspecto con la propia capacidad angiogénica tumoral; dado que no hay datos en la literatura con estudios comparativos del melanoma B16F10 y otros tumores, podemos aportar que el retraso temporal que se produce en nuestro estudio experimental y que experimenta el melanoma implantado en un lecho irradiado a una dosis en fracción única de 80 Gy, hasta alcanzar el mismo tamaño que en los animales control es de 14 días.

5.1.1.2 Irradiación del tumor

La irradiación del tumor (bien tumor sólido, bien suspensión celular) a dosis de 80 Gy, conlleva que tras 14 días de evolución tras su implante en lecho no irradiado el “crecimiento tumoral” sea mínimo, oscilando entre 0,1 y 2,1 milímetros cúbicos. La variación de dicho volumen tumoral alcanzado es estadísticamente significativa frente a las series control y frente a los subgrupos con irradiación del lecho (ver aparta-

do 4.2.1.1. tabla 4). El estudio microscópico nos pone de manifiesto la existencia de abundantes melanosomas y la presencia de algunas células de melanoma (apartados 4.3.2.2 y 4.3.2.5), en ninguna de las muestras histológicas pudimos apreciar tras la irradiación del tumor la existencia de células de melanoma en mitosis que nos indicaran actividad proliferativa; es más que probable que las células tumorales encontradas hayan perdido todo su potencial clonogénico, con lo que podríamos hablar de muerte biológica del melanoma irradiado, reflejando la presencia de células de melanoma en las muestras obtenidas aquellas células aún en trance de intentar dividirse. En este sentido indicar el resultado obtenido en el ratón 97 de la Serie Especial de larga evolución en el que el inóculo celular fue sometido a irradiación previa a su implante y en el que tras ser sacrificado a los 28 días no se apreció crecimiento tumoral, recogiendo en la muestra para su análisis microscópico un fragmento milimétrico; su posterior estudio reflejó la existencia de melanosomas y la persistencia de algunas células tumorales de melanoma, no se apreciaron mitosis ni ningún otro signo de actividad proliferativa. Estudios posteriores de nuestro grupo de trabajo (Tesis Doctoral de Cipriano Manzano) se encontraron con la imposibilidad de realizar citometría de flujo con los fragmentos milimétricos obtenidos en estas series.

5.1.2 INFLUENCIA DEL INTERVALO TEMPORAL ENTRE IRRADIACIÓN E IMPLANTE

5.1.2.1 *Cuando se irradia el lecho:*

El efecto lecho tumoral, como ya se ha señalado, se puede ver comprometido por un intervalo entre la irradiación y el implante tumoral. En nuestro estudio experimental hemos comprobado que el retraso en el crecimiento es estadísticamente significativo frente a las series control, tanto cuando el intervalo entre irradiación del lecho e implante fue inferior a 24 horas, como cuando fue de siete días; no apreciando diferencias significativas cuando comparamos los resultados entre ambos intervalos, dato este que coincide con lo reportado en la literatura ¹⁷⁶

5.1.2.2 *Cuando se irradia el tumor:*

El intervalo entre irradiación e implante no influyó en los resultados obtenidos sobre el volumen tumoral, debido a que la dosis elegida producía la muerte tumoral como ya hemos apuntado.

5.1.3 INFLUENCIA DEL TIPO DE ELEMENTO TUMORAL IMPLANTADO

5.1.3.1 *Sobre el lecho tumoral irradiado:*

Al igual que se han realizado comparaciones entre distintos tipos histológicos, atribuyéndose un mayor papel del TBE sobre algunos tipos tumorales, nos propusimos

analizar el fenómeno TBE y la influencia del entorno tumoral utilizando como modelo el melanoma B16F10.

Al introducir la variable: "tipo de implante tumoral" hemos analizado la posible influencia de que al implantar tumor sólido se implantaran también células endoteliales no irradiadas que podían ser el origen de la angiogénesis que permitía al implante su crecimiento en un lecho irradiado con 80 Gy en fracción única, los resultados obtenidos se compararon con los obtenidos al implantar suspensión celular de melanoma B16F10 en la que no se aportaban células endoteliales y por lo tanto eliminábamos dicha posibilidad angiogénica.

Al respecto hemos de señalar que la matriz tumoral no implica mayor crecimiento tumoral, no obteniéndose diferencias significativas cuando analizamos el volumen alcanzado sobre lecho irradiado tras implante de tumor sólido frente a suspensión celular de melanoma.

5.1.3.2 *Sobre el elemento tumoral irradiado:*

La dosis de 80 Gy resulta tumoricida tanto cuando el elemento irradiado es como tumor sólido como cuando lo es como suspensión celular: Es obvio indicar que tal dosis en fracción única a un volumen tumoral tan pequeño, sin zonas hipóxicas que puedan proteger al tumor, condicionaría desde el punto de vista radiobiológico que la fracción de supervivencia celular fuese de 10^{-28} células, dado que en nuestro estudio experimental se procedía a irradiar 10^6 células, la probabilidad de supervivencia sería 10^{-22} .

5.2 METASTASIS A DISTANCIA

Los resultados encontrados en la literatura de un tumor creciendo en lecho irradiado reflejan que éste da mayor número de metástasis ^{173,176,262}.

En nuestro trabajo experimental obtenemos sin embargo que si utilizamos como parámetro de referencia el intervalo temporal de 14 días desde el implante hasta la necropsia, obtenemos mayor número de metástasis linfáticas -(en ningún animal se objetivaron metástasis hematógenas)- en los animales de las series control que en los animales en los que se implantó tumor en lecho irradiado (series IA; IB; IVA; IVB) con lo que nuestra conclusión sería distinta a lo reportado en la literatura.

Nos intrigó extraordinariamente esta disparidad de resultados, así que dispusimos la realización de una serie especial con un intervalo entre el implante en lecho irradiado y la necropsia superior a los 14 días. En esta serie con un seguimiento que osciló entre los 18 y los 28 días pudimos comprobar que el volumen tumoral alcanzado se equiparaba al obtenido en las series control con una evolución de 14 días. El análisis estadístico en cuanto a volumen nos mostró que no había diferencias significativas entre las series control y la serie especial de larga evolución; la comparación en cuanto a la aparición de metástasis linfáticas y/o hematógenas revela que es mayor a igualdad de volumen alcanzado en los animales de la serie especial de larga evolución, coincidiendo con lo reportado por Milas ^{173,176}, Jirtle ¹³⁶ y Van der Brenk ²⁶².

5.3 ANGIOGENESIS:

En los animales control se objetivó, como ya se ha comentado, un evidente crecimiento neoplásico; así como una marcada neovascularización, puesta de manifiesta tanto en el análisis macroscópico como microscópico. Al someter el lecho receptor a la acción de las radiaciones ionizantes a una dosis tal (80 Gy) que provocaría daños irreversibles al árbol vascular creímos disponer de una forma "definitiva" para imposibilitar la viabilidad y el crecimiento de un implante tumoral, dado que se encuentra establecido en la literatura la marcada dependencia neoplasia-angiogénesis^{4,5,8,93,144} y que el tumor más allá de 0,3-0,5 milímetros de distancia de la fuente vascular no es viable^{102,216}. Sin embargo los resultados obtenidos reflejaban tan sólo un retraso en el crecimiento neoplásico, es decir que el implante de melanoma era no sólo viable en lecho irradiado, sino que además crecía y daba metástasis, con lo que la conclusión inevitable de que se produce respuesta angiogénica en un lecho que ha recibido 80 Gy en fracción única.

Ya han sido analizados los cambios morfológicos y funcionales en la microcirculación demostrándose una dosis dependencia de la lesión endotelial^{66,99,123,219,260}, sin embargo, no disponemos en la literatura de una descripción de lo ocurrido tras fracción única de 80 Gy al lecho receptor.

Así en las series IA y IB, en las que el lecho receptor recibió 80 Gy previos al implante tumoral, vemos que tras la necropsia a los catorce días post-implante se aprecia una evidente neovascularización que acompaña al nódulo tumoral extraído; el análisis microscópico revela la existencia de vasos revestidos por fino endotelio, encontrándose variable número de células perivasculares, frecuentemente se observan vasos

trombosados con variable número de plaquetas y hematíes que ocluyen y taponan la luz (figuras BH y BI), estos cambios coinciden con los hallazgos morfológicos descritos en la literatura (apartado 1.2.1). El crecimiento tumoral encontrado en las series con irradiación del lecho previo al implante pone de manifiesto por lo tanto que el estímulo angiogénico producido por el trauma quirúrgico y especialmente la demanda nutricional tumoral, encuentra una respuesta adecuada en el estroma radiolesionado: Cuatro hipótesis solas o combinadas pueden explicar dicho proceso:

1) La dosis de 80 Gy en fracción única es insuficiente para afectar la proliferación endotelial, y ante estímulos liberados desde el implante pueden originar yemas vasculares que conectan con las del tumor o bien simplemente penetran en él.

2) Al implantar tumor sólido con su propio estroma aportamos en la matriz tumoral sus propios vasos, que no han sufrido la acción de las radiaciones y pueden tener la capacidad de dar yemas vasculares que podrían contactar y aprovechar una estructura vascular lesionada por la dosis de radiación administrada, y a partir de ella crecer y dar una respuesta angiogénica adecuada a las exigencias neoplásicas, permitiendo su crecimiento.

3) La respuesta angiogénica se produce por migración sin proliferación endotelial

4) El aprovechamiento de la arquitectura vascular del lecho irradiado, por elementos que vienen desde más allá del mismo, bien por flujo intersticial o por migración endovascular.

5) Cualquier combinación de las anteriores

A continuación pasaremos a discutir las posibilidades expuestas previamente:

5.3.1 ORIGEN A PARTIR DE LA MICROCIRCULACIÓN DEL LECHO IRRADIADO:

Un hecho aceptado unánimemente es que aquellos territorios tisulares que experimentan el efecto de las radiaciones sufren una pérdida de la capacidad proliferativa. La existencia de crecimiento tumoral en lecho irradiado (en nuestro estudio experimental series IA, IB, IVA, IVB), que condiciona la existencia de neovascularización, nos obliga a valorar la posibilidad de que las células endoteliales del lecho soporten una dosis de 80 Gy en fracción única.

Estudios experimentales ha mostrado que tras recibir dosis que oscilaron ente 7.5 Gy y 20 Gy en fracción única, la inhibición del crecimiento ha sido completa ^{71,131}; bajo estos datos podemos asumir que si la lesión es dosis dependiente y que en estudios previos con dosis de 20 Gy la inhibición del crecimiento endotelial fue completa, con dosis de 80 Gy la conclusión debe ser la misma; basándonos en estos datos descartamos como posible que las células endoteliales del lecho receptor irradiado sean capaces de proliferar en respuesta a la demanda angiogénica que supone el estímulo tumoral.

5.3.2 ORIGEN A PARTIR DE LA MICROCIRCULACIÓN DEL IMPLANTE TUMORAL

La posibilidad de que se produzcan yemas vasculares a partir de las preexistentes en los implantes tumorales requiere en primer lugar que en dicho territorio existan vasos, y en segundo lugar, caso de existir, que tengan capacidad de proliferar.

Teniendo en cuenta que en nuestro estudio se permitía el crecimiento del melanoma sólido y posteriormente su extracción y troceado en fragmentos milimétricos para el implante, es lógico pensar que llevaran consigo vasos sanguíneos, suposición confirmada al realizar estudios microscópicos de los fragmentos tumorales.

Realizamos la irradiación de los fragmentos de melanoma sólido a la misma dosis que el lecho receptor (80 Gy en fracción única) con la intención de someter a los vasos del implante a la misma situación que los vasos del lecho receptor; ya hemos señalado en el apartado anterior que dicha dosis implicaría una inhibición proliferativa del 100 % de las células endoteliales del implante.

Pudimos comprobar que en las series IIA, IIB (se irradiaba el implante) no se producía crecimiento neoplásico, encontrando explicación en este aspecto no en una completa inhibición angiogénica (el lecho receptor no era irradiado y el análisis microscópico pone de manifiesto la existencia de vasos), sino en que la dosis aplicada al melanoma resultó ser tumoricida (apartado 5.1.3.2).

Con el objetivo marcado de valorar en que modo el implante tumoral podía influir en el crecimiento angiogénico observado, dispusimos la realización de distintas series experimentales, incluyendo unas en las que el elemento implantado no pudiese aportar matriz tumoral, ni células endoteliales, ni otro elemento que no fuesen células de neoplásicas, mediante el cultivo de melanoma de la línea parental y su posterior inoculación previo control microscópico (apartados 3.6.2 y 4.3.1.2). Los resultados obtenidos nos muestran en las series IVA y IVB un crecimiento tumoral en lecho irradiado y una respuesta angiogénica evidente con vasos sanguíneos con endotelios relativamente preservados en algunos casos y ausentes en otros, asimismo es notoria la presencia de un

elevado número de elementos plaquetarios en numerosos vasos. Estos hallazgos son similares a los obtenidos en aquellas series experimentales tras implante de tumor sólido (con sus propios vasos) en lecho irradiado (series IA y IB). Dicho resultado confirma el escaso papel atribuible al componente estromal tumoral en la respuesta angiogénica observada tras el implante tumoral en lecho irradiado.

5.3.3 LA RESPUESTA ANGIOGÉNICA SE PRODUCIRÍA POR MIGRACIÓN SIN PROLIFERACIÓN ENDOTELIAL:

Para analizar este punto nos remitiremos a las propias características biológicas y radiobiológicas de las células endoteliales. Estos elementos celulares tienen una frecuencia de recambio inferior al 1% y además una alta capacidad migratoria, acentuada cuando discurren en un medio adecuado, aspectos estos ya analizados por Sholley ²⁴⁰ quien utilizando corneas radiadas, comprobó que los vasos sanguíneos y por lo tanto las células endoteliales, tenían la capacidad de migrar en ausencia de proliferación. Este mismo autor ya indicó que dicha migración alcanzaría escasos milímetros. La vehiculización de las células endoteliales radiadas hacia el implante tumoral estaría marcada por factores ya expuestos en la introducción como los factores angiogénicos tumorales, factores de crecimiento ⁷² - de naturaleza polipeptídica -, liberados en el lecho irradiado tras el implante tumoral.

Dado que el crecimiento tumoral alcanzado en las series de irradiación del lecho alcanzó un máximo de 1,1 cms, parece poco probable atribuir únicamente a este mecanismo la evidente neovascularización encontrada en lecho irradiado; en este sentido indicar que en la serie especial de larga evolución en la que el melanoma crece sobre

lecho irradiado, el tumor llega en algunos casos a alcanzar un tamaño de dos centímetros.

5.3.4 ORIGEN A PARTIR DEL TERRITORIO NO IRRADIADO

Una cuarta opción sería que el origen de esta neovascularización pudiese estar en la llegada al lecho de elementos sanguíneos, plasmáticos y celulares desde zonas no afectadas por la radiación y pudiesen aprovechar la estructura vascular del lecho, dañada por la radiación, originando ante el estímulo angiogénico tumoral yemas vasculares que permitieran un crecimiento tumoral.

5.3.5 CUALQUIER COMBINACIÓN DE LAS ANTERIORES.

6. CONCLUSIONES

- 1) El melanoma B16-F10 implantado en la pata de ratón, como fragmento tumoral o como suspensión celular, produce una intensa respuesta angiogénica.
- 2) La irradiación previa del lecho condiciona un retraso en el crecimiento del implante tumoral.
- 3) No existen diferencias significativas en cuanto a crecimiento tumoral si se compara un intervalo de 24 horas frente a siete días entre la irradiación del lecho y la inoculación del implante.
- 4) Un lecho sometido a una dosis de 80 Gy en fracción única es capaz de aportar neovasos ante el estímulo del melanoma implantado.
- 5) La inoculación de un fragmento de melanoma o de una suspensión celular de melanoma equivalente en carga tumoral no condiciona diferencias en cuanto al posterior crecimiento del tumor ni a su capacidad de inducir angiogénesis.
- 6) El estroma tumoral no constituye el origen de la neovascularización de un implante.
- 7) Una dosis de 80 Gy administrada en fracción única sobre fragmentos o cultivos de melanoma B16-F10 trae consigo la pérdida total de su capacidad clonogénica.

- 8) No se consigue demostrar angiogénesis tras el implante de melanoma irradiado a dosis supraletal.

- 9) El crecimiento tumoral sobre un lecho irradiado condiciona una dilación en la aparición de metástasis paralela al retraso de dicho crecimiento.

7. BIBLIOGRAFIA

- 1 Adamson, I.Y.R.; Bowden, D.H.: Endothelial injury and repair in radiation-induced pulmonary fibrosis. *Am. J. Pathol*; 112:224-230 (1983)
- 2 Alfthan O.S. A comparative study of the growth of skin and human skin tumors on the chorioallantoic membrane of the embryonated chicken eggs. *Ann. Med. Exp. Biol. Fenn.* 9.(Suppl 34) 1-78 (1956)
- 3 Allen, J.B.; Sagerman R.H.; Stuart, M.J.; Irradiation decreases vascular prostacyclin formation with no concomitant effect on platelet thromboxane production. *Lancet*; II: 1193-1196 (1981)
- 4 Ambrus J.L.; Ambrus C.M.; Forgach P.; Stadler S.; Halpern.; Sayyid S.; Niswander; Tombis C.; Studies on tumor induced angiogenesis. *EXS* 61:436-444 (1992)
- 5 Ambrus J.L.; Ambrus C.M.; Tombis C.A.; Forgach. P.; Karakousis C P Niswander P; Lane W.; Studies on tumor induced angiogenesis. *J. Med*: 22(6) 355-269 (1991)
- 6 Ando K; Koike S. The relationship between lung colony and in situ assays. *Int. J. Radiation Oncology Biol Phys* 11:1495-1502 (1985)

- 7 Auerbach R. Angiogenesis-inducing factors: a review. In: Lymphokines. Vol IV. Pick E. (ed) Academic Press. New York. Pp 69-88 (1981)
- 8 Auerbach R., Auerbach W. and Polakowski assays for angiogenesis, a review. Pharmacol. Ther.51, 1-11 (1991)
- 9 Ausprunk D.H. and Folkman J. Migration and proliferation of endothelial cells in preformed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis. Microvasc. res. 14, 53-65 (1977)
- 10 Ausprunk D.H. Synthesis of glycoproteins by endothelial cells in embryonic blood vessels. Dev. Biol. 90, 79-90. (1982)
- 11 Banerjee SD, Toole BP. Hyaluronan binding protein in endothelial cell morphogenesis. J. Cell Biol: 119: 643-652 (1993)
- 12 Barendsz-Janson AF, Griffioen AW, Muller AD, Van Dam-Mieras MC, Hillen HF. In vitro tumor angiogenesis assays: Plasminogen lysine binding site 1 inhibits in vitro tumor-induced angiogenesis, Journal of Vascular Research, 35 (2):109-114 (1998)

- 13 Barnhill RL, Levy MA. Regressing thin cutaneous malignant melanoma (<1.0 mm) are associated with angiogenesis. *Am J. Pathol* 143: 528-537 (1993)
- 14 Bauman M; Wurrshmidt F; Twardy A; Beck-Bornhold HP. Impact of tumor stroma on expression of the tumor bed effect in R1H rat rhabdomyosarcoma. *Radiation Research* 140: 432-436 (1994)
- 15 Begg, A. C. And Terry, N.H.A. Modification of stromal radiosensitivity by misonidazole and WR-2721. *Br. J. Radiol.* 50:565-570, (1983)
- 16 Biller HF, Ogura JH. Planned preoperative irradiation for laryngopharyngeal carcinoma. In: Vaeth JM, ed. *Frontiers of Radiation Therapy and Oncology* 5. Baltimore: University Park Press. 100:105 (1970)
- 17 Bishop D.K. Jutila M.A. Sedmark D.D. Beatle M.S. and Orosz C.G. . Lymphocyte entry into inflammatory tissues in vivo. Qualitative differences of high endothelial venule-like vessels in sponge matrix allografts vs isograft. *J. Immunol.* 142,4219-4224. (1989)
- 18 Bishop D.K., Sedmark D.D. Leppink D.M. And Orosz C.G. vascular endothelial differentiation in sponge matrix allograft. *Hum Immunol.* 28,128-133 (1990)

- 19 Bowersox JC; Ritchers A; Sorgente N. Altered characteristics of B16 melanoma cells induced by chemically crosslinking fibronectin to cell surfaces. *Journal of Surgical Oncology* 29:11-14 (1985)
- 20 Brem H. And Folkman J.H. Inhibition of tumor anigenesis mediated by cartilage. *J. Exp. Med.* 141, 427-438 (1975)
- 21 Brem S.S, Gullino P.M. Angiogenesis: a marker for neoplastic transformation of mammary papillary hyperplasia. *Science* 195,880-882, (1977)
- 22 Brem S., Jensen HM, Gullino PM. Angiogenesis as a marker of preneoplastic lesions of the human breast. *Cancer* 41, 239-244 (1978)
- 23 Breslow A, Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *Ann Surg* 172: 902-908 (1970)
- 24 Brooks PC, Clark RAF, Cheresch DA. Requirement of vascular integrins for angiogenesis. *Science* 264:569-572 (1994)
- 25 Brown JM. Consequences of the tumor bed effect for regrowth delay studies (In) Kallman RF, *Rodent Tumor Models in Experimental Cancer Therapy*:174-178.Pergamon Press, New York (1987).

- 26 Burger P.C.; Chandler D.B. and klinworth G.K. Corneal neovascularization as studied by scanning electronic microscopy of vascular casts. *Lab. Invest.* 48, 169-180 (1983)
- 27 Burri PH. Intussusceptive microvascular growth, a new mechanism of capillary network expansion. In . *Angiogenesis: Int Symp. St Gallen Abstract 88* (1991).
- 28 Camplehon R.S. and Miranda Penhaligon. The tumor bed effect: a cell kinetic and histological investigation of tumours growing in irradiated mouse skin. *The British Journal of Radiology* 58: 443-451 (1985)
- 29 Cao Y, O'Reilly MS, Marsahll B, Flynn E, Ji RW, Folkman J. Expression of angiostatin cDNA in a murine fibrosarcoma suppresses primary tumro growth and produces long-term dormancy of metastases. *Journal of Clinical Investiga-tion* 101 (5):1055-1063 (1998).
- 30 Cavallo T.,Sade R., Folkman J. And Coran R.S. Tumor angiogenesis . Rapid induction of endothelial mitoses demonstrated by autoradiography. *J. Cell. Biol.* 54,408-420 (1973)
- 31 Chu F.C.H. ; Lucas.J.C. Jr; Farrow. J.H. and Nickson J.J.: Does prophylactic radiation therapy given for cancer of the breast predispose to metastases? *Am. J. Roentgen.* 99:987-994 (1967)

- 32 Claeson-Welsh L, Welhs M, Ito N, Anand-Apte B, Soker S, Zetter B, O'Reilly M, Folkman J. Angiostatin induces endothelial cell apoptosis and activation of focal adhesion kinase independently of the integrin-binding motif RGD. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 95 (10):5579-5583 (1998)
- 33 Clark E.R. and Clark E.L. Microscopic observations on changes in blood vascular endothelium in the living animal. Am:J.Anat.64,251-301(1935)
- 34 Clifton,K.H. and Jirtle R.1975. Mammary carcinoma cell population growth in preirradiated and unirradiated transplant sites. Radiology 117,459-465. ()
- 35 Clark W. Tumor progression and the nature of cancer. Br. J. Cancer 64:631-644 (1991)
- 36 Clark W.H, Elder D.E, Guerry D. et al. Model predicting survival in stage I melanoma based on tumor progression. J. Natl Cancer INST. 81: 1893-1904 (1989)
- 37 Consejo de las Comunidades Europeas. Líneas directrices relativas al alojamiento y a los cuidados de los animales. Anexo II al artículo % de la Directiva del Consejo de 24 de Noviembre de 1986 respecto a la protección de los anima-

les utilizados para experimentación y otros fines científicos (86/609/CEE). Diario Oficial de las Comunidades Europeas 18.12.86. N° L358/1 a N° 358/28

- 38 Cornil I, Theodorescu D., Man S. Et al. Fibroblast cell interactions with human melanoma cells affect tumor cell growth as a function of tumor progression. Proc Natl Acad Sci Usa 88: 6028-6032 (1991)
- 39 Culton M. Chandler D.B. Proia A. D. And Klinworth G.K. The effect of oxigen on corneal vascularization. Invest. Ophtalmol. Vis. Sci. 31. 1277-1281 (1990)
- 40 D'Amore PA, Brauhnunt SJ. Stimulatory and inhibitory factors in vascular growth control. Endothelial Cells II. 13-60 (1988)
- 41 D'Amore P.A. and Thompson R.W. Mechanism of angiogenesis. Annu.Rev.Phisiol.49,453-464.(1987)
- 42 Dao TL.; Hsia TW. Postoperative radiotherapy in the treatment of breast cancer . In: Vaeth JM, ed. Frontiers of Radiation Therapy and Oncology 5. Baltimore: University Park Press 206-230 (1970)
- 43 Dao T.L.; Kovaric,J.: Incidence of pulmonary and skin metastases in women with breast cancer who received postoperative irradiation . Surgery 52: 203-212 (1962)

- 44 Dao T.L.; Yogo H.: Enhancement of pulmonary metastases by x-irradiation in rats bearing mammary cancer. *Cancer* 20: 2020-2025 (1967)
- 45 Davis M.D. Diabetic retinopathy: a clinical overview. *Diabetes Metabol.Rev.*4,291-322. (1988)
- 46 DeGowin, R.L.; Lewis, L.J.;Mason, R.E., Y col: Radiation-induced inhibition of human endothelial cells replicating in culture. *Radiat.Res;* 68:244-250 (1976)
- 47 Denekamp J. Endothelial cell proliferation as a novel approach to targeting tumour therapy. *Br. J. Cancer* 45, 136-139 (1982)
- 48 Denekamp and Hobson B. Endothelial cell proliferation in experimental tumours .*Br. J.Cancer* 46: 711-720 (1982)
- 49 Diaz-Flores L. And Dominguez C. Relation between arterial intimal thickening and the vasa-vasorum. *Virchows Arch. (A)* 406,165-177 (1985)
- 50 Diaz-Flores L.; Gutierrez R. Valladares F.Varela H. And perzM.Intense vascular sprouting from rat femoral vein induced by prostaglandins E1 and E2. *Anat. Rec.* 238:68-76 (1994)

- 51 Diaz Flores L.; Gutierrez R. Varela H.; Rancel N. and Valladares F. Microvascular pericytes: a review of their morphological and functional characteristics. *Histol. Histopath.* 6, 269-286 (1991b)
- 52 Diaz Flores L. Martin A.I., Garcia Montelongo R. and Gutierrez R. Role of pericytes and endothelial cells in tissue repair and related pathological processes. *J. Cutan. Pathol.* 17, 191-192 (1990b)
- 53 Diaz Flores L. Valladares F., Gutierrez R. and Varela H. The role of the pericytes of the adventitial microcirculation in the arterial intimal thickening. *Histol. Histopath.* 5, 145-153 (1990a)
- 54 DiPietro LA, Polverini PJ. Angiogenic macrophages produce the angiogenic inhibitor trombospondin 1. *Am J. Pathol* 143: 678 (1993)
- 55 Dvorak H.F. Dvorak A. M. Manseau E.J. Wiberger L. And Churchill W.H. Fibrin gel investment associated with line 1 and line 10 solid tumor growth, angiogenesis, and fibroplasia in guinea pigs: role of cellular immunity, myofibroblasts, microvascular damage, and infarction in line 1 tumor regression. *JNCI* 62, 1459-1372. (1979)

- 56 Dvorak H.F. Harvey V.S. Estrella P. Brown L.F. McDonach J. And Dvorak A.M. Fibrin containing gels induce angiogenesis. Implications for tumor stroma generation and wound healing. *Lab. Invest.* 57, 673-686 (1987)
- 57 Dvorak H.F. Nagy J.A. and Dvorak A.M. Structure of solid tumours and their vasculature: implications for therapy with monoclonal antibodies. *Cancer Cells*; 3:77-85 (1991)
- 58 Dvorak H.F. Nagy J.A. Dvorak J.T. and Dvorak A.M. identification and characterization of the blood vessels of solid tumors that are leaky to circulating macromolecules. *Am J. Pathol.*133,95-109 (1988)
- 59 Dvorak H.F. Orenstein N.S. and Carvalho A.C. Induction of a fibrin-gel investment: an early event in line 10 hepatocarcinoma growth mediated by tumor secreted products. *J. Immunol.* 122:166-174 (1979^a)
- 60 Dyce M; Sharif SF; Whalen GF. Search for anti-metastatic therapy effects of phenitoin on B16 melanoma metastasis. *Journal of Surgical Oncology* 49: 107-112 (1992)
- 61 Easa, E. H. M.; Casarett, G.W.: Effect of epsilon- amino-n-aproic.acid on radiation-induced increase in capillary permeability. *Radiology* ;106:679-688 (1973)

- 62 El-Sabban ME; Pauli BU. Adhesion-mediated gap junctional communication between lung-metastatic cancer cells and endothelium. *Invasion Metastasis* 14: 164-176 (1995)
- 63 Evans, M.L.; Graham, M.M.; Mahler, P.A., et al. Changes in vascular permeability following thorax irradiation in the rat. *Radiat. Res*; 107:262-271 (1986)
- 64 Fajardo L.F. *Pathology of Radiation Injury*. New York, Masson, 1982.
- 65 Fajardo LF. The unique physiology of endothelial cells and its implications in radiobiology. (In) Vaeth JM; Meyer JL, *Radiation Tolerance of Normal Tissues*. *Front Radiat Ther Oncol* 23: 96-112, Basel, Karger (1989).
- 66 Fajardo L.F.; Stewart, J.R. Pathogenesis of radiation-induced myocardial fibrosis. *Lab. Invest*; 29:244-257 (1973)
- 67 Fajardo L.F. Kowalski J. Kwan H.H. Prionas S. D. And Allison A.C. The disc angiogenesis system. *Lab. Invest*. 58, 718-724 (1988)
- 68 Feder J. Marasa J.C. and Olander J.V. The formation of capillary-like tubes by calf aortic endothelial cells grown in vitro. *J. Cell Physiol*, 116:1-6 (1983)

- 69 Fidler IJ. Selection of successive tumour lines for metastasis. *Nature (new Biol)* 242:148-149 (1973)
- 70 Fidler IJ. The evolution of biological heterogeneity in metastatic neoplasms (In Nicolson GL, Milas L, *Cancer Invasion and Metastasis: Biologic and Therapeutic Aspects*. Raven Press, NY (1984)
- 71 Fischer-Dzoga, K.; Dimitrievich, G.S.; Griem, M.L.: Radiosensitivity of vascular tissue. II. Differential radiosensitivity of aortic cells in vitro. *Radiat. Res.* 99:536-546 (1984)
- 72 Fleming, W.H.; Szakacs, J.E.; King, E.R.: The effect of gamma irradiation on the fibrinolytic system of dog lung and its modification by certain drugs: Relationship to radiation pneumonitis and hyaline membrane formation in lung. *J. Nucl. Med.*; 3:341-351 (1962)
- 73 Folkman J. Tumor angiogenesis. Therapeutic implications. *New Engl. J. Med.* 285,1182-1186 (1971).
- 74 Folkman J. Tumor angiogenesis. *Adv. Cancer. Res.* 43, 175-203 (1985b)
- 75 Folkman J. Angiogenesis: Initiation and control. *Ann N.Y. Acad. Sci.* 401. 212-227 (1982)
- 76 Folkman J. Angiogenesis and breast cancer. *J Clin. Oncol.* 12, 441-443 (1994)

- 77 Folkman J. Toward an understanding of angiogenesis search and discovery. *Pers. Biol. Med.*29. 10-36 (1985 a)
- 78 Folkman J. Angiogenesis and its inhibitors. In. *Important advances in Oncology*. De Vita V.T. Jr, Hellman S.A. and Rosenberg S.A. (eds.) Lippincott. Philadelphia. pp 42-62 (1985c)
- 79 Folkman J. Successful treatment of an angiogenic disease. *N.England J. Med.*320.1211-1212 (1989)
- 80 Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis-dependent? *J. Natl Cancer Inst.* 82, 4-6 (1990) (commentary)
- 81 Folkman J. What is the role of angiogenesis in metastasis from cutaneous melanoma? *Eur.J. Cancer Clin Oncol.* 23: 361-363 (1987)
- 82 Folkman J. And Cotran R. Relation of vascularization to tumor growth . *Int. Rev. Exp. Pathol.* 16, 207-248 (1976)
- 83 Folkman J., Haudenschild C.C. and Zetter B.R. Long term culture of capillary endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 76, 5217-5221. (1979)

- 84 Folkman J., Haudenschild C.C. angiogenesis in viro. *Nature* 288,551-556 (1980)
- 85 Folkman J., Klagsbrun M. Angiogenic factors. *Science* 235:442-447 (1987)
- 86 Folkman J., Klagsbrun M. Sasse J. Wadzinski M.G. Inger D. And Vlodavsky I.
A heparin-binding angiogenic protein-basic fibroblast growth factor is stored
within basement membrane. *Am.J.Pathol.* 130,393-400 (1988)
- 87 Folkman J, Watson K, Ingber D, Hanahan D. Induction of angiogenesis during
the transition from hyperplasia to neoplasia. *Nature* 339, 58-61, (1989a)
- 88 Folkman J., Weisz P.B., Joullie M.M. Li. W.M. and Ewing W.R. Control of an-
giogenesis with synthetic heparin substitutes. *Science* 243: 1490-1493 (1989b)
- 89 Fournier G.A. Luttj G.A. Watt. S. Fenselau A. And Patz A. A corneal micro-
pocket assay for angiogenesis in the rat eye. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci* 21.
351-354 (1981)
- 90 Forsman A.D. and McCormack J.T. Microcorrosion casts of hamster luteal and
follicular vasculature throughout the estrous cycle. *Anat. Rec.* 233,515-520. (1992)
- 91 Fotsis T. Zhang Y. Pepper MS et al. The endogenous oestrogen metabolite 2-
methoxyoestradiol inhibits angiogenesis and suppresses tumour growth. *Nature*
368:237-255 (1994).

- 92 Fregene TA, kellog CM, pienta KJ. Microvessel quantification as a measure of angiogenic activity in benign breast tissues lesions: a marker for precancerous disease? *Int J. Oncol.* 4 1199-1202 (1994)
- 93 Freitas I., Baronzio-GF; Barni S; Bertone V: Tumor angiogenesis evidence of new blood channels from plasma infiltrations: *EXS.*; 61:81-84 (1992)
- 94 Furcht L.T. Critical factors controlling angiogenesis. Cell products, cell matrix and growth factors. *Lab. Invest.* 55, 505-509 (1986)
- 95 Gasparini G. Quantification of intratumoral vascularisation predicts metastasis in human invasive solid tumours. *Oncol rep* 1, 7-12 (1994) review
- 96 Gasparini G, Barbareschi M, Borachi P et al. Tumor angiogenesis predicts clinical outcome of node positive breast cancer patients treated either with adjuvant hormone therapy or chemotherapy. *The Cancer J. Sci. Am* (1995)
- 97 Gately S, Twardowski P, Stack MS et al. Human prostate carcinoma cells express enzymatic activity that converts human plasminogen to the angiogenesis inhibitor, angistatin. *Cancer Res.* (56): 4487-90 (1996)

- 98 Gately S, Twardowski PK, Stack MS et al. The mechanism of cancer mediated conversion of plasminogen to the angiogenesis inhibitor angiostatin. *Proc Natl Acad Sci USA* (94): 10868-72 (1997)
- 99 Gillette, E.L.; Maurer, G.D.; Severin, G.A.; Endothelial repair of radiation damage following Beta irradiation. *Radiology*; 116:175-177 (1975)
- 100 Gimbrone M.A. Jr, Cotran R.S, and Folkman J. Endothelial regeneration: studies with human endothelial cells in culture. *Ser. Haematol.* 6, 453-455 (1973)
- 101 Gimbrone M.A. Jr., Cotran R.S., Leapman S.B. and Folkman J. Tumor growth and neovascularization: An experimental model using the rabbit cornea. *J. Natl Cancer Inst.* 52, 413-427 (1974)
- 102 Gómez-Navarro J; Gonzalez-Barón M. *Biología de la célula neoplásica(V): el fenómeno de la metástasis. Bases moleculares* (En) Gonzalez Barón M, *Oncología Clínica*. McGraw-Hill-Interamericana, Madrid (1992)
- 103 Goto F. Goto K. Weindel K. And Folkman J. Synergistic effects of vascular endothelial growth factor and basic growth factor on the proliferation and cord formation of bovine capillary endothelial cells with collagen gel. *Lab. Invest.* 69, 491-493 (1993)

- 104 Graham CH, Rivers J, Kerbel RS et al. Extent of vascularization as an independent prognostic indicator in thin (0.76mm) malignant melanomas. *Am J. Pathol.* (1994)
- 105 Gray L.H.; Cogger A.D.; Ebert M et al: The concentration of oxygen dissolved in tissues at the time of irradiation as a factor in radiotherapy. *Br. J. Radiol* 26:638-648 (1953)
- 106 Greenberg G. And Hunt T.K. The proliferative response in vitro of vascular endothelial and smooth muscle cells exposed to wound fluids and macrophages. *J.Cell. Physiol.* 97; 353-360 (1978)
- 107 Gross, N.J.:Experimental radiation pneumonitis.IV. Leakage of circulatory proteins onto the alveolar surface. *J. Lab. Clin. Med.*; 95: 19-31 (1980)
- 108 Grunt T.W. Lametschwandter A., Karrer K. And Staindl O. The angioarchitecture of the Lewis lung carcinoma in laboratory mice. *Scanning Electron. Microsc.* II 557-573 (1986)
- 109 Guinebretiere JM, LeMonique G, Gavoille A et al. Angiogenesis and risk of breast cancer in women with fibrocystic disease. *J. Natl Cancer Inst.* 86, 635-636 (1994)

- 110 Haynes W.L. Proia A.D. and Klinworth . Effect of inhibitors of arachidonic acid metabolism on corneal neovascularization in the rat. *Invest. Ophtalmol. Vis. Sci.* 30. 1588-1593 (1989).
- 111 Hamlet,R.; Rezvani,M.; Hopewell,J.W.: Ultrasound measurement of atrophy in pig skin following X or Beta irradiation. *Bioeng.Skin* 3: 49-57 (1986)
- 112 Handbook on genetically standardized Jax mice (3^a Ed). Hans-Jorg Herniger and John J Dorey, Ny (1980).
- 113 Heimark R.L. And Schwartz S.M. The role of cell-cell interaction in the regulation of endothelial cell growth. In: the molecular and cellular biology and wound repair.Clark R.A.F. and Henson P.H. (eds) Plenum. New York p.359 (1988)
- 114 Henderson,B.W.; Bitcher,H.I; Johson, R.J.: Loss of vascular fibrinolytic activity following irradiation of the liver. An aspect of late radiation damage. *Radiat. Res.*; 95: 646-652 (1983)
- 115 Herlyn M. Human melanom: development and progression. *Cancer metastasis Rev* 9:101-112 (1990)
- 116 Heuser L.S. and Miller F.N. Differential macromolecular leakage from the vasculature of tumors. *Cancer* 57, 461-464 (1986)

- 117 Hewitt H.B. and Blake, E.R. The growth of transplant murine tumors in pre-irradiated sites. *British Journal of Cancer*,22,808-824 (1968)
- 118 Hirst,D.G. Denekamp,J.; Hobson,B;Proliferation studies of the endothelial and smooth muscle cells of ythe mouse mesentery after irradiation. *Cell Tiss. Kinet*.13:91-104 (1980)
- 119 Hirst D.G.; Denekamp, J.; travisE.L.: The response of mesenteric blood vessels to irradiation. *Radiat. Res.* 77: 259-275 (1979)
- 120 Hopewell, J.W.: Late radiation damage to the central nervous system. A radio-biological interpretation. *Neuropath. Appl.Neurobiol.* 5: 329-343 (1979)
- 121 Hopewell, J.W.: Radiation effects on vascular tissue; in Potten, Hendry, Cytotoxic insult to tissue: effects on cell lineage, pp 228-257 (Churchill Livingstone, Edinburgh) (1983)
- 122 Hopewell, J.W.: Mechanism of action of radiation on skin and under lying tissues. *Br. J. Radiol. Suppl* 19, pp 39-47 (1986)
- 123 Hopewell, J.W.; Campling,D.; Calvo, W y col.: Vascular irradiation damage:its cellular basis and likely consequences. *Br.J.Cancer*;53 (suppl VII):181-191 (1986)

- 124 Hopewell JW; Calvo W; Campling D; Reinhold HS; Rezvani M; Yeung TK. Effects of radiation on microvasculature. (In) Vaeth JM; Meyer JI, Radiation Tolerance of Normal Tissues. Front Radiat. Ther. Oncol 23: 85-95, Basel, Karger (1989).
- 125 Holmgren L, O'reilly MS, Folkman J. Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. Nature Medicine 1, 149-153 (1995)
- 126 Host H.; Brennhovd, IO: Combined surgery and radiation therapy versus surgery alone.I. The effect of orthovoltage radiation. Acta Radiol. 14: 25-32 (1975)
- 127 Huygen K. Bonne productrice d'interferon apres sensibilisation au BCG et recevant du PPD. (1984)
- 128 IFFA CREDO. Souris C57BL/6. Folleto informativo: 92-96. Paris (1989)
- 129 Ingher DE, Folkman J. How does extracellular matrix control capillary morphogenesis. Cell, 58: 803-805 (1989)

- 130 Ito H; Barkley,T.Jr. Peters L. And Milas L. Modification of tumor response to cyclophosphamide and irradiation by preirradiation of the tumor bed: prolonged growth delay but reduced curability. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys* 11:547-553 (1985)
- 131 Jaffe E.A. Nachman R.L. Becker C.G. and Minick C.R. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins: identification by morphologic and immunologic criteria. *J. Clin. Invest.* 51,46 a (1972)
- 132 Jain RK. Determinants of tumor blood flow. A review. *Cancer Res.* 48: 2641-2658 (1985)
- 133 Jain RK. Barriers to drug delivery in solid tumours. *Sci. Am.*58-65 (1994)
- 134 Jain RK. Vascular and interstitial barriers to delivery of therapeutic agents in tumours,. *Cancer metastases Rev.*): 253-266 (1990)
- 135 Jirtle R.,Rankin,J.H.G., and Clifton,K.H. Effect of X-irradiation of tumor bed on tumour blood flow and vascular response to drugs. *Br. J.Cancer*,37:1033-1038 (1978).
- 136 Jirtle R.; Kelly H. Clifton. Effect of preirradiation of the tumor bed on the relative vascular space of Mouse Gastric Adenocarcinoma 328 and Mammary Adenocarcinoma CA755. *Cancer Research* 33: 764-768. April (1973)

- 137 Johnson,L; Longenecker, J.P.; Fajardo, L.F:Diferential radiation response of cultured endothelial cells and smooth myocytes. *Anal.Quant:Cytol.*4:188-198(1982)
- 138 Juhash I, albelda SM, Elder DE et al . Growth and invasion of human melanomas in human skin grafted to immunodeficient mice. *Am. J. Pathol* 143:528-537 (1993)
- 139 J.W.Albright. Tres resristance a l'infection par *Tripanosoma musuli* et a l'infection en general (1981).
- 140 Kallman RF. Commentary on part 7. (In) Kallman RF, *Rodent Tumor Models in Experimental Cancer Therapy*: 167-168. Pergamon Press, New York (1987).
- 141 Kaminski M., Majewski S. Jablonska S.and Pawinski,M. Lowered angiogenic capability of peripheral blood Lymphocytes in progressive sistemic sclerosis (scleroderma). *J. Invest. Derm* 82,239-243 (1984)
- 142 Kamdel J. Bossy-Wetzel E., Radvani F. Et al, Neovascualrization is associated with a switch to the export of bFGF in the multistep development of fibrosarcoma. *Cell* 66: 1095-1104 (1991)

- 143 Kerbel RS. Expression on multi-cytokine resistance and multi-growth factor independence in advanced stage metastatic cancer: malignant melanoma as a paradigm. *Am J. Pathol.* 141: 519-524 (1992).
- 144 Khon E.C.; Invasion and metastasis: Biology and clinical potential. *Phar-Ther.* Nov.52 (2): 235-244 (1991)
- 145 Killion JJ; Fidler IJ. The biology of tumor metastasis. *Seminars in Oncology* 16:106-115 (1989)
- 146 Koike A.; Nakazato H.; Moore G.E.; The fate of Erlich cells injected into the portal system. *Cancer* 16: 716-720 (1963)
- 147 Krebs,C.; The effect of roentgen irradiation on the interrelation between malignant tumours and their hosts. *Acta Radiol. Suppl VIII.* (1929)
- 148 Krishnan EC; Krishnan L; Schweiger GD; Jewell WR. Quantitative assay for the radiosensitivity of malignant melanomas. *Melanoma Research* 4: 151-155 (1994).
- 149 Kubota Y. Kleinman H.K. Martín G.R. and Lawley T.J. Role of basement membrane in the morphological differentiation of human endothelial cells into capillary-like structures. *J. cell. Biol.* 107 1589-1598 (1988)

- 150 Kwock,L.; Davenport, W.C.; Clark,R.L. y col.: The effects of ionizing radiation on the pulmonary vasculature of intact rats and isolated pulmonary endothelium. *Radiat. Res.*; 111:276-291(1987)
- 151 Langer R. and Folkman J.Polymers for the sustained release of proteins and other macromolecules. *Nature* 263,797-800 (1976)
- 152 Lannutti BJ, Gately ST, Quevedo ME, Soft GA, Paller AS. Human angiostatin inhibits murine hemangioendothelioma tumor growth in vivo. *Cancer Res* 1997; 57:5277-80.
- 153 Law, M.P.; Thomlinson, R.H.: Vascular permeability in the ears of the rats after X-irradiation. *Br. J. Radiol*; 51. 895-904.(1978)
- 154 Leavesley D.I.; Schwartz M.A., Rosenfeld M. And Cheresh D.A. Integrin beta 1 and beta3 mediated endothelial cell migration is triggered trough distinct signaling mechanisms. *J. Cell. Biol.* 121. 163-170 (1993)
- 155 Leith. John T; Lynn E. Faulkner, Sarah F. Bliven And Seth Michelson. Tumor Bed Expression in Xenografted Artificial HeterogenousColonTumors. *Int. Journal Radiation Oncology,Biology and Physics*; July 1988, Volume 15, Number 1.

- 156 Lijnen HR, Ugwu F, Bini A, Collen D. Generation of an angiostatin-like fragment from plasminogen by stromelysin-1 (MMP_3). *Biochemistry* 37(14):4699-4702 (1998)
- 157 Lu C, Rak JW, Kobayashi H, et al. Increased resistance to oncostatin M induced growth inhibition of human melanoma cell lines derived from advanced-stage lesions. *Cancer Res.* 53: 2708-2711 (1993)
- 158 Lu C, Vickers MF, Kerbel RS. Interleukin-6: a fibroblast-derived growth inhibitor of human melanoma cells from early but not advanced stages of tumor progression. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 89: 9215-9219 (1992)
- 159 Luo J, Lin J, Paranya G, Bischoff J. Angiostatin upregulates E-selectin in proliferating endothelial cells. *Biochemical Biophysical Research Communications* 245 (3):906-911 (1998)
- 160 Maciag T, Kadish J, Wilkins L, Stermerman M.B. And Weinstein R. Organizational behavior of human umbilical vein endothelial cells. *J. Cell. Biol.* 94,511-520 (1982)
- 161 MacDougall J, Kerbel RS. Responsiveness of normal/dysplastic melanocytes and melanoma cells from different lesional stages of disease progression to the growth inhibitory effects of TGF- β . *Mol Cell Different* 1: 21-40 (1993)

- 162 Madri J.A. and Pratt B.M. Angiogenesis. In: The molecular and cellular biology of wound repair. Clark R.A.F. and Henson P.M.(eds.) plenum. New York.p 337 (1988).
- 163 Madri J.A. and Stern K.S. Aortic endothelial cell migration. I. Matrix requirements and composition. Am.J. Pathol.106,180-186 (1982)
- 164 Madri J.A. and Stenn K.S. Aortic endothelial cell migration. I. Matrix requirements and composition. Am. J. Pathol. 106, 180-186 (1982)
- 165 Maisin, J.R.: The influence of radiation on blood vessels and circulation. III. Ultrastructure of the vessel wall. Curr. Top. Radiat. Res.;10:29-57.(1974)
- 166 Matei S. Colombo MP Melani C. Et al. Expression on cytokine/growth factors and their receptors in human melanoma and melanocytes. Int J. Cancer 56: 853-857 (1994)
- 167 Majewski S. Tiganolowa M.,Jablonska S. Polakowski I. And Janczura E. Serum samples from patients with active psoriasis enhance lymphocyte-induced angiogenesis and modulate endothelial cell proliferation.Arch. Dermatol.123,221-225.(1987)

- 168 Mattei S. Colombo MP Melani C. Et al. Expression of cytokine/growth factors and their receptors in human melanoma and melanocytes. *Int. J. Cancer* 56: 853-857 (1994)
- 169 Martin, D.F.; Fischer,J.J.: Radiation sensitivity of cultured rabbit aortic endothelial cells. *Int. J. Radiat.Oncol.Biol.Phys*; 10:1903-1906 (1984)
- 170 McBride G. Tumor angiogenesis: the growth of a concept. *Helix* 4 (2) 27-33 (1995)
- 171 Mc Craken J.S.,Burger P.C. and Klintworth G.K.Morphology observations on experimental corneal vascularization in the rat.*Lab. Invest.*41,519-530.(1979)
- 172 Milas L. Tumor Bed effect: dependency on tumor type and influence on tumor therapy.(in) Kallman RF,Rodent Tmor Models in Experimental Cancer Therapy:174-178. Pergamon Press, New York (1987).
- 173 Milas,L.;Hirata,H.;Hunter,N.;Peters,L.J.Effect of radiation-induced injury of tumor bed stroma on metastatic spread of murine sarcomas and carcinomas. *Cancer Res.*48:2116-2120 (1988).

- 174 Milas L.; Hisao Ito.; Hungter N.; Jones S. And Lester J. Peters. Retardation of Tumor Growth in Mice Caused by radiation-induced injury of tumor bed stroma: dependency on tumor type. *Cancer Research* 46: 723-727 February (1986)
- 175 Milas, L., Hunter,H. Ito,H., and Peters,L.J. Effect of tumor type,size,and end-point on tumor protecction by WR-2721. *Int.J. Radiation Oncol.Biol.Phys.*,10:41-48 (1984)
- 176 Milas,L.; Hunter,N.;Peters,L.J. The tumor bed effect: dependence of tumor take,growth rate, and metastasis on the time interval between irradiation and tumor cell transplantation. *Int.J.Radiat. Oncol.Biol.Phys.* 13:379-383 (1987).
- 177 Millan Nuñez Cortés J. Angiogenesis: a crucial element in tumor development: *An-Med-Interna* 8;369-371 (1991)
- 178 Montesano R. and Orci tumor-promoting phorbol esters indduce angiogenesis “in vitro” . *Cell* 42,469-477 (1985)
- 179 Montesano R., Orci L. And Vasalli P.In vitro rapid organization of endothelial cells into capillary-like networks is promoted by collagen matrices. *J. Cell. Biol.* 97, 1648-1652 (1983)

- 180 Montesano R. Vasalli J.D. Baird A. Guillermin R. and Orci. L. Basic fibroblast growth factor induces angiogenesis in vitro. Proc. Natl Acad. Sci. USA 83, 7297-7301 (1986)
- 181 Mount, D.; Bruce, W.R.: Local plasma volume and vascular permeability of rabbit skin after irradiation. Radiat. Res.; 23:430-445 (1964)
- 182 Motran J.C.: Factors of importance in radiosensitivity of tumors. Br. J. Radiol 9: 606-614 (1936)
- 183 Murphy, J.B. Hussey, R.G. Nakahara, W and Sturm, E.; Studies on X-ray effects. J. Exp. Med. 33:299-313 (1921)
- 184 Murray J.B. Brown L., Langer R. and Klagsbrun M. A microsustained release system for epidermal growth factor. In Vitro 19, 743-748 (1983)
- 185 Murray R. Spiegel. Manual de fórmulas y tablas matemáticas. Mc Graw Hill. Pag 10 (1982)
- 186 Muthukkaruppan V. And Auerbach R. Angiogenesis in the mouse cornea. Science 205, 1416-1418 (1972)

- 187 Nehls V. Denzer K. And Drenckhahn D. pericyte involvement in capillary sprouting during angiogenesis in situ. *Cell Tissue Res.* 270, 469-474 (1992)
- 188 Nguyen M. Strubel NA, Bischoff J. A role for sialyl Lewis-X/A. Glycoconjugates in capillary morphogenesis. *Nature* 365:267-269 (1993)
- 189 Nicholson GL; *Metástasis cancerosas (En) El Cáncer Cap.14. Libros de Investigación y Ciencia. Grafesa, Barcelona (1985)*
- 190 Nicholson GL; Brunson KW; Fidler IJ. Specificity of arrest, survival, and growth of selected variant cell lines. *Cancer Research* 38:4105-4111 (1978)
- 191 Nicosia R.F. and Olinette A. Growth of microvessels in serum-free matrix culture of rat aorta. A quantitative assay of angiogenesis in vitro. *Lab. Invest.* 63, 115-122 (1990)
- 192 Norrby K. Jakobsson A. And Sorbo J. Mast cell mediated angiogenesis: a novel experimental model using the rat mesentery. *Virchows Arch.(B)* 52, 195-206 (1986)
- 193 Norrby K. Jakobsson A. And Sorbo J. Quantitative angiogenesis in spreads of intact rat mesenteric windows. *Microvasc. Res.* 39, 341-348 (1990a)

- 194 Norrby K. Jakobsson A. And Sorbo J. On mast cell mediated angiogenesis in the rat mesenteric window assay. *Agents Actions* 30, 231-233 (1990b)
- 195 Obeso J.L. and Auerbach R. A new microtechnique for quanting cell movement in vitro using polystyrene bead monolayers. *J. Immunol: Mewth* 70,141-152 (1984).
- 196 Olivo. Bhardwai R. Schulze-Osthoff K., Sorg C., Jacob H.J. and Flamme I. A comparative study on the effects of tumor necrosis factor alpha (TNF-Alpha), human angiogenic factor (h-AF) and basic fibroblast growth (bFGF) on the chorioallantoic membrane of the chick embryo. *Anat Rec.* 234,105-115.
- 197 O'Reilly MS, Holmgren I, Shing Y et al. A novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by Lewis lung carcinoma. *Cell* 79, 315-328, 1994
- 198 Orlidge A. And D'Amore P.A. Inhibition of capillary endothelial cell growth by pericytes and smooth muscle cells. *J. Cell. Biol.* 105, 1455-1462 (1987)
- 199 O'Reilly, M. S. And col. Angiostatin. A novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell* 79:315-328 (1994)

- 200 O'Reilly, M.S., Holmgren, Chen C.C. and Folkman J. Angiostatin induces and sustain dormancy of human primary tumors in mice. *Med. Genet.* 2: 689-692 (1996)
- 201 O'Reilly, M.S. and col. Endostatin an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* 88.277-285 (1997)
- 202 Otón Sanchez L.F. Metástasis Hematógenas en Pulmón irradiado. Estudio experimental. Tesis Doctoral; Universidad de La Laguna. Facultad de Medicina. Marzo de 1997.
- 203 Ovejera AA. The use of human tumor xenograf in large-scales drug screening. (In) Kallman RF. Rodent tumor models in experimental therapy Chap 46. Pergamon Books, Inc (1987)
- 204 Paku S. Lapis k. Morphological aspects of angiogenesis in experimental liver metastases *Am J. Pathol.* 143: 926-936 (1993)
- 205 Paweletz N. and Knierim M. Tumor-related angiogenesis. *Crit. Rev. Oncol/Hematol.* 9:197-242 (1989)
- 206 Passaniti A.P., Taylor A.M., Pili R., Guo Y., Long P.V., Haney J.A. Pauly R.R., Grant D.S. and Martin G.R. A simple quantitative method for assesing angio-

- genesis and antiangiogenic agents using reconstituted basement membrane, heparin, and fibroblast growth factor. *Lab. Invest.* 67, 519-528 (1992)
- 207 Penhaligon,M; Laverich,M.: Radiation response of endothelial cells in vitro. *Br.J. Radiol* ;58:913-914 (1985)
- 208 Pepper M.S. and Montesano R.Proteolytic blance and capillary morphogenesis. *Cell. Diff. Dev.*32,319-328. (1990)
- 209 Peters LJ; Mason KA.; Withers HR. Effect of lung irradiation on metastases: radiobiological studies and clinical correlation 8in) Meyn ER: Withers HR, Radiation Biology in Cancer Research: 515-529, Raven Press, New York (1980)
- 210 Philips G.D.,Whitehead R.A. and Knigton D.R. Initiation and pattern of angiogenesis in wound healing in the rat. *Am. J. Anat.* 192,257-262. (1991).
- 211 Phillips, T.L.: An ultrastructural study of the development of radiation injury in the lung. *Radiology* ; 87:49-54 (1966)
- 212 Plunkett M.L. and Hailey J.A. An in vivo quantitative angiogenesis model using tumor cells entraped in alginate.Lab. Invest. 62, 510-517 (1990)
- 213 Polverini P.J. Cotran. R.S. Gimbrone M.A. Jr. And Unanue E.R. Activated macrophagos induce vascular proliferation. *Nature* 269, 804-806 (1977)

- 214 Proia A. D. Chandler D.B. Haynes W.L. Smith C.F. Suvarnamani C. Erkel F.H. and Klinworth G.K. Quantitation of corneal neovascularization using computerized image analysis. *Lab. Invest.* 58. 473-479. (1988)
- 215 Raju K.S., Alesandrini G., Ziche M. And Gullino P.M. ceruloplasmin copper ions and angiogenesis. *J.Nat. cancer Inst.* 69, 1183-1188 (1982)
- 216 Rak JW, Hegmann EJ, Kerbel RS. The role of angiogenesis in tumor progression and metastases. In: Heppner GH, ed. *Advances in mollecular and cell biology.* Greenwich, CT: JAI Press: 205-251 (1993)
- 217 Rak JW, Hegman EJ, Lu C. Et al Progressive loss of sensitive to endothelium-derived growth inhibitors expressed by human melanoma cells during disease progression. *J. Cell Physiol* 159: 245-255 (1994)
- 218 Read J.: The effect of ionoizing radiation on the brad beam root: the dependence of the X-Ray sensitivity on dissolved oxygen. *Br. J. Radiol.* 25: 89-99 (1952)
- 219 Reinhold, H.S.: The influence of radiation on blood vessels and circulation. IV .Structural changes in blood vessels. *Curr. Top. Radiat.Res. Q.*;10:58-74 (1974)
- 220 Reinhold, H.S; Buisman , G.H.; Radiosensitivity of capillary endothelium.*Br. J. Radiol.*;46:54-57.(1973)

- 221 Reed JA, McNutt NS, Albino AP. Differential expression of basic fibroblast growth factor (bFGF) in melanocytic lesions demonstrated in situ hybridization. *Am J. Pathol.* 144: 329-336 (1994)
- 222 Rhee, J.G.; Lee, I.; Song, C.W.: The clonogenic response of bovine aortic endothelial cells in culture to radiation. *Radiation Res.*; 106:182-189 (1986)
- 223 Rhine W. Hsieh D.S.T. and Langer. Polymers for sustained macromolecule release: procedures to fabricate reproducible delivery systems and control release kinetics. *J. Pharm. Sci.* 69, 265-270 (1980)
- 224 Robertson N.E. Discapani C.M. Downs E.C. Hailey J.A. Sarre O. Runkle R.L. Jr Popper T.L. and Plunkett M.L. a quantitative in vivo mouse model used to assay inhibitors to tumor-induced angiogenesis. *Cancer Res.* 51, 1339-1344 (1991)
- 225 Rodeck U, Melber K, Kath R et al, Constitutive expression of multiple growth factor genes by melanoma cells but not normal melanocytes. *J. Invest. Dermatol.* 97: 20-26 (1991)^o
- 226 Rodriguez Hernandez. F. Estudio experimental de la acción de las radiaciones ionizantes sobre la proliferación y diferenciación celular durante los fenómenos

- reparativos. Tesis Doctoral. Universidad de La Laguna. Facultad de la Medicina. (1991).
- 227 Roftad E.K. Growth and vascular structure of human melanoma xenograft. *Cell Tissue Kinet.* 17, 91-101 (1984)
- 228 Rooney P. Wang M. Kumar P et al. Angiogenic oligosaccharides of hyaluronan enhance the production of collagens by endothelial cells. *J. Cell Science* 195.213-218 (1993)
- 229 Rosving , T. : Tilfaelde af rongennbehandlede maligne Knolesvulster. *Hospitalstiende* 1: 701 (1919)
- 230 Roswit B, Higgins GA, Shields W, Kahn RJ. Preoperative Radiation therapy for carcinoma of the lung: report of a national veterans administration controlled study. In: Vaeth JM, ed. *Frontiers of Radiation Therapy and Oncology* 5. Baltimore: University Park Press 163-176 (1970)
- 231 Rowett HGQ. *Guías de Disección: III La rata, con notas sobre el ratón.* Urania. Barcelona (1976)
- 232 Russ, S. And Scott, G.: The growth of tumors in tissue exposed to x-rays and radium. *Lancet* 1:815-816. (1927).

- 233 Sagebiel RW. Melanocytic nevi in histological association with primary cutaneous melanoma of superficial spreading and nodular types: effect of tumor thickness. *J. Invest.Dermatol* 100: 3225-3255 (1993)
- 234 Sato N., Sawasaki Y., SenoA., Fuse Y., Hirano Y., And Goto T. Development of capillary networks from rat microvascular fragments in vitro: the role of myofibroblasts cells *Microvasc. Res.* 33,194-210 (1987)
- 235 Sato Y. And Rifkin D.B. Inhibition of endothelial cell movement by pericytes and smooth muscle cells:Activation of a latent transforming growth factor-b1-like molecule by plasmin during coculture. *J.Cell:Biol.*109,309-315 (1989)
- 236 Schoefl G.I. Studies on inflammation.III. Growing capillaries: Their structures and permeability. *Virchows Arch. Pathol. Anat.* 337,97-141 (1963)
- 237 Schor A. M. and Schor S.L. Tumor angiogenesis. *Br.J. Pathol.* 141.385-413 (1983)
- 238 Schultz- Hector S. Haghayegh S. β -Fibroblast growth factor expression in human and murine squamous cell carcinomas and its relationship to regional endothelial cell proliferation. *Cancer Research* 53: 1444-1449 (1993)

- 239 Shen RN; Hornback NB; Shidnia H; Lu L; Montebello JF; Brahmi Z. A comparison of lung metastases and natural killer cell activity in daily fractions and weekly fractions of radiation therapy on murine B16a melanoma. *Radiation Research* 114: 354-360 (1988).
- 240 Sholley M.M. Ferguson G.P., Seibel H.R.; Montuor J.L. and Wilson J.D. Mechanism of neovascularization. Vascular sprouting can occur without proliferation of endothelial cells. *Lab. Invest.* 51. 624-634. (1984)
- 241 Sim BK, O'Reilly MS, Liang H et al. A recombinant human angiotensin protein inhibits experimental primary and metastatic cancer. *Cancer Res.* (57):1329-1334 (1997).
- 242 Selye H. On the mechanism through which hydrocortisone affects the resistance of tissues to injury. *J. Am. Med. Ass.* 152, 1207-1213 (1953)
- 243 Shepro D. Endothelial cells, inflammatory edema, and the microvascular barrier: Comments by a "free radical". *Microvasc. Res.* 35,247-264. (1988)
- 244 Simionescu N. and Simionescu M. Endothelial cell dysfunction. Plenum Press. New York. (1991)

- 245 Sinzinger, H.; Firbas, W.: Irradiation depresses prostacyclin generation upon stimulation with the platelet-derived growth factor. *Br. J.Radiol.*58:1023-1026(1985)
- 246 Smith-McCune KK, Weidner N. Demonstration and characterization of the angiogenic properties of cervical dysplasia. *Cancer Res.* 54, 800-804 (1994)
- 247 Sorgente n. Kuettner K.E. Soble W.H. and Einstein R. The resistance of certain tissues to invasion. II. Evidence for extractable factors in cartilage which inhibit invasion by vascularized mesenchyme. *Lab. Invest.* 32, 217-222. (1975)
- 248 Stenstrom,K.W., Vermund, H., Mosser,D.G. Effects of roentgen irradiation on the tumor bed.I. The inhibition action of local pretransplantation roentgen irradiation (1500 r) on the growth of mouse mamary carcinoma. *Radiat. Res.* 2:180-191(1955)
- 249 Stenstrom.K.W.; Mosser,D.G. And Johnson, E.A.: Effects of Roentgen irradiation on the tumor bed.II. The inhibition action of differen dose levels of local pretransplantation roentgen irradiation on the growth of mouse mammary carcinoma. *Radiat. Res.* 354-364 (1956)
- 250 Sugiura,K.; Studies on radiosensitivity of mouse sarcoma. *Radiology* 29:352-361 (1937)

- 251 Summers, W.C., Clifton, K.H. and Vermund, H. X-irradiation of the tumor bed. A Study of the indirect actions of radiation on transplantable tumors. *Radiology*, 82, 691-703 (1964)
- 252 Sweeney TM; Kibbey MC; Zain M; Fridman R; Kleinman HK. Basement membrane and the SIKVAV lamini-derived peptide promote tumor growth and metastases. *Cancer and Metastasis Reviews* 10: 245-254 (1991)
- 253 Takiwana M. Nishida Y. Susuki F. Kishi J. Yamashita K. And Hayakawa T. Induction of angiogenesis in chick yol-sac membrane by polyamines and its inhibition by tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP and TIMP-2) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 171, 1264-1271 (1990b)
- 254 Tano Y. Chandler D.B. and Machener R. Vascular casts of experimental retinal neovascularization. *Am.J.Ophtalmol.* 92, 110-118 (1981)
- 255 Tannock I.F. and Hayashi S. The proliferation of capillary endothelial cells. *Cancer Res.* 32, 77-82 (1972)
- 256 Taraboletti G. Roberts D. Liotta L.A. and Giavazzi R. platelet thrombospondin modulates endothelial cell adhesion, motility, and growth: A potential angiogenesis regulatory factor. *J. Cell Biol.* 111, 765-772 (1990)

- 257 Trott,R.R. and Kummermehr,J. Split dose recovery of a mouse tumour and its stroma during fractionated irradiation. *Br. J. Radiol.*55:841-846 (1982)
- 258 Tsao, C.H.; Ward, W.F.; Port, C.D.: Radiation injury in rat lung. III. Plasminogen activator and fibrinolytic inhibitor activities. *Radiat. Res.*; 96:301-308.(1983)
- 259 Urano,M. And Suit,H.D.Experimental evaluation of tumor bed effect for CH3 mouse mammary carcinoma and for CH3 mose fibrosarcoma. *Radiation Research*,45,41-49.(1971)
- 260 Van den Brenk,H.A.S.,Sharpington,C.; Orton,C., y col : Effects of X-radiation on growth and function of the reapiir blastema.II. Measurement of angiogénesis in the Selye Pouch in the rat. *Int. J.Radiat.Biol.* 25:277-289.(1974)
- 261 Van den Brenk,H.A:S. Crowe,M.Kelly,H. And Stone,M.G.The significance of free blood in liquid and solid tumors.*Br.J.Exp.Pathol.*,58:147-159.(1977)
- 262 Van den Brenk,H.A.S.Crowe,M.C. and Stone,M.G. Reactions of the tumor bed to lethally irradiated tumor cells and the Revesz effect. *Br. J. Cancer*,36: 94-104.(1977)

- 263 Vermund, H.: The significance of the tumor bed reactions in the radiation treatment of malignant tumors. *Amr. J. Roentgen.* 82: 678-687 (1959)
- 264 Zetter B.R. Angiogenesis. State of the art. *Chest* 93,159S-166S (1988)
- 265 Ward. W; Molteni,A; Tsao c.H. y col; Radiation injury in rat lung. IV. Modification by D-Penicilamina. *Radiat. Res.* 98:397-406.(1984)
- 266 Ward, W.F.; Solliday, N.H.; Molteni,A. Y col. Radiation injury in rat lung.II Angiotenssin converting enzyme activity. *Radiat. Res;* 96:294-300.(1983)
- 267 Warren B.A. The vascular morphology of tumors. In: *Tumor blood circulation.* Peterson H.I. (ed) CRC Press. Boca Raton. Pp 1-47.(1979 a)
- 268 Warren B.A. Tumor angiogenesis. In: *Angiogenesis, vascular morphology and blood flow of experimental and hman tumors.* Peterson H.I. (ed) CRC Press. Boca Raton.pp 33-74. (1979b)
- 269 Warren B.A., Greenblatt M. and Kommineni V.R.C. Tumor angiogenesis: ultrastructure of endothelial cells in mitosis. *Br. J. Exp. Pathol.* 53,216-224 (1972)

- 270 Weidner N. Semple J.P. Welch W.R. and Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis- Correlation in invasive breast carcinoma. *New Engl. J. Med.* 324, 1-8 (1991)
- 271 Williams R.J: Robertson D. And Davies A.J. identification of vascular (endothelial cells in murine omentum using the lectin, Dolichos biflorus agglutinin: possible applications in the study of angiogenesis. *Histochem. J.* 21,271-278 (1989)
- 272 Williams S. Angiogenesis in three-dimensional cultures. *Lab.Invest.* 69, 491-493 (1993)
- 273 Withers H.R. And Peters LJ: Biologic aspects of radiation therapy IN: G.H. Fletcher (ed) *Textbook of Radiotherapy.* Ed 3, pp 103-180. Philadelphia (1980)
- 274 Yamamoto T. Terada N. Nishizawa Y et al. Angiostatic activities of medroxyprogesterone acetate and its analogues. *Int. J. Cancer* 56:. 393-399 (1994)
- 275 Zetter BR. Angiogenesis and tumor metastasis. *Annual Review of Medicine* 49:407-424 (1998).

276 Ziche M. Alesandri G. And Gullino P.M. Gangliosides promote the angiogenic response. *Lab. Invest.* 61, 629-634 (1989).

277 Ziche M., Jones J. And Gullino P.M. Role of prostaglandin E1 and copper in angiogenesis. *J. Natl. Cancer Inst.* 69, 475-482 (1982).

8. ANEXOS

ANEXO 1: HOJA DE RECOGIDA DE DATOS

RATON N° SERIE..... SUBGRUPO.....

FECHA IRRADIACIÓN:

LECHO.....

TUMOR.....

FECHA IMPLANTE:

TUMOR SÓLIDO.....

SUSPENSIÓN CELULAR.....

INTERVALO ENTRE IRRADIACIÓN E IMPLANTE:

INFERIOR A 24 HORAS.....

UNA SEMANA.....

FECHA DE SACRIFICIO DEL ANIMAL:

INTERVALO ENTRE IMPLANTE Y SACRIFICIO:

CATORCE DÍAS: SÍ / NO

SI SUPERIOR, INDICAR N° DE DÍAS:

INCIDENCIAS :

ANEXO 2

HOJA DE RECOGIDA DE DATOS PARA ANATOMIA PATOLÓGICA.

RATON N°..... SERIE..... SUBGRUPO.....

DATOS MACROSCÓPICOS:

LARGO MAYOR DEL TUMOR.....

ANCHO MAYOR DEL TUMOR.....

ALTO MAYOR DEL TUMOR.....

¿SE TOMAN FOTOS?.....N°.....

DATOS DE INTERES EN LA NECROPSIA:

DATOS MICROSCÓPICOS:

N° DE PREPARACIÓN DE MICROSCOPIA OPTICA.....

¿SE TOMAN FOTOS?.....N°.....N° DE CARRETE.....

OBSERVACIONES:

N° DE PREPARACIÓN DE MICROSCOPIA ELECTRONICA...

¿SE TOMAN FOTOS?.....N°. N° DE CARRETE.....

OBSERVACIONES:.....

ANEXO 3: RELACIÓN DE ANIMALES UTILIZADOS

SERIES	1	2	3	4	5	6
S.C.T.S	0	10	0	5	0	15
S.C.S.C	0	10	0	6	0	16
IA	1	10	2	3	0	16
IB	1	10	3	0	0	14
IIA	0	10	0	0	0	10
IIB	2	10	0	0	0	12
IIIA	2	10	0	0	0	12
IIIB	0	10	0	0	0	10
IVA	1	10	2	3	5	21
IVB	3	10	3	2	4	22
VA	0	10	0	0	7	17
VB	0	10	0	0	5	15
VIA	0	10	1	0	5	16
VIB	3	10	0	0	5	18
TOTALES	13	140	11	19	31	214

S.C.T.S* ES SERIE CONTROL DE TUMOR SÓLIDO

S.C.S.C* ES SERIE CONTROL SUSPENSIÓN CELULAR

1 : NÚMERO DE ANIMALES FALLECIDOS EN EL ACTO QUIRURGICO.

2: NÚMERO DE ANIMALES SACRIFICADOS A LOS CATORCE DÍAS

3: NÚMERO DE ANIMALES SACRIFICADOS DESPUES DEL DIA CATORCE
POST-IMPLANTE.

4: NUMERO DE ANIMALES EN LOS QUE NO SE EFECTUÓ EL IMPLANTE
TRAS IRRADIACIÓN Y SE DEJARON PARA CONTROL FOTOGRAFICO DEL
LECHO IRRADIADO.

5: NÚMERO DE ANIMALES EN LOS QUE SE COMPROBÓ ESCASA
VIABILIDAD DE LA SUSPENSIÓN CELULAR TRAS IRRADIACIÓN.

6: NÚMERO TOTAL DE ANIMALES USADOS POR SERIE.

ANEXO 4: HOJA DE SPSS PARA ESTUDIO ESTADÍSTICO.

VARIABLES (V) Y DATOS GLOBALES

V1 REPRESENTA: “NUMERO DE ANIMAL OBJETO DE ESTUDIO”

V2 : “ VOLUMEN TUMORAL ALCANZADO” (EN MILIMETROS CÚBICOS)

V3 :” ELEMENTO IRRADIADO”

SE INDICA CERO (0) CUANDO NO SE IRRADIA NADA (CONTROL)

SE INDICA UNO (1) CUANDO SE IRRADIA EL LECHO

SE INDICA DOS (2) CUANDO SE IRRADIA EL MODELO TUMORAL

SE INDICA TRES (3) CUANDO SE IRRADIAN LECHO Y TUMOR.

V4 :”INTERVALO ENTRE IRRADIACIÓN E IMPLANTE”

SE INDICA COMO CERO (0) EN LOS CASOS CONTROL

SE INDICA COMO UNO (1) CUANDO EL INTERVALO ES INFERIOR A 24 HORAS (SE REFLEJA COMO IMPLANTE INMEDIATO EN SPSS)

SE INDICA COMO DOS (2) CUANTO EL INTERVALO ES DE SIETE DÍAS

V5 ES LA VARIABLE”: TIPO DE IMPLANTE TUMORAL”

SE INDICA COMO UNO (1) SI SE IMPLANTE TUMOR SÓLIDO

SE INDICA COMO DOS (2) SI SE IMPLANTA SUSPENSIÓN CELULAR

	v1	v5	v2	v3	v4
1	4	251,00	1	1	1
2	8	99,00	1	1	1
3	9	147,00	1	1	1
4	10	147,00	1	1	1
5	24	115,00	1	1	1
6	28	209,00	1	1	1
7	33	126,00	1	1	1
8	34	314,00	1	1	1
9	35	117,00	1	1	1
10	70	235,00	1	1	1
11	5	88,00	1	2	1
12	6	311,00	1	2	1
13	13	138,00	1	2	1
14	17	162,00	1	2	1
15	18	147,00	1	2	1
16	23	103,00	1	2	1
17	26	63,00	1	2	1
18	80	138,00	1	2	1
19	164	418,00	1	2	1
20	165	311,00	1	2	1
21	138	503,00	0	0	1
22	139	864,00	0	0	1
23	140	785,00	0	0	1
24	141	419,00	0	0	1
25	142	838,00	0	0	1
26	143	733,00	0	0	1
27	144	785,00	0	0	1
28	145	503,00	0	0	1
29	146	829,00	0	0	1

	v1	v5	v2	v3	v4
30	147	817,00	0	0	1
31	73	,50	2	1	1
32	74	,50	2	1	1
33	75	1,00	2	1	1
34	76	1,00	2	1	1
35	81	,50	2	1	1
36	82	1,00	2	1	1
37	83	1,00	2	1	1
38	84	1,00	2	1	1
39	85	1,00	2	1	1
40	86	,80	2	1	1
41	130	,50	3	1	1
42	131	,50	3	1	1
43	132	,50	3	1	1
44	133	1,10	3	1	1
45	134	,50	3	1	1
46	135	1,00	3	1	1
47	136	,80	3	1	1
48	174	,50	3	1	1
49	175	,50	3	1	1
50	176	,50	3	1	1
51	77	,50	3	2	1
52	78	,30	3	2	1
53	105	,30	3	2	1
54	106	,06	3	2	1
55	107	,06	3	2	1
56	108	,06	3	2	1
57	110	,10	3	2	1
58	111	,10	3	2	1

	v1	v5	v2	v3	v4
59	112	,06	3	2	1
60	166	,05	3	2	1
61	27	524,00	1	1	2
62	29	180,00	1	1	2
63	36	101,00	1	1	2
64	37	168,00	1	1	2
65	42	524,00	1	1	2
66	43	524,00	1	1	2
67	44	524,00	1	1	2
68	45	524,00	1	1	2
69	46	524,00	1	1	2
70	48	188,00	1	1	2
71	72	293,00	1	2	2
72	79	377,00	1	2	2
73	117	105,00	1	2	2
74	118	335,00	1	2	2
75	148	180,00	1	2	2
76	149	151,00	1	2	2
77	151	154,00	1	2	2
78	152	154,00	1	2	2
79	153	180,00	1	2	2
80	154	180,00	1	2	2
81	56	1,20	2	1	2
82	57	1,04	2	1	2
83	63	1,04	2	1	2
84	64	1,04	2	1	2
85	65	,60	2	1	2
86	66	,20	2	1	2
87	67	1,80	2	1	2

	v1	v5	v2	v3	v4
88	68	1,20	2	1	2
89	92	2,10	2	1	2
90	94	2,10	2	1	2
91	52	,50	3	1	2
92	53	,30	3	1	2
93	54	,30	3	1	2
94	55	,30	3	1	2
95	59	,50	3	1	2
96	60	,50	3	1	2
97	96	,10	3	1	2
98	98	,30	3	1	2
99	103	,30	3	1	2
100	104	,30	3	1	2
101	101	,10	3	2	2
102	102	,10	3	2	2
103	113	,06	3	2	2
104	114	,06	3	2	2
105	115	,06	3	2	2
106	116	,10	3	2	2
107	121	,06	3	2	2
108	122	,10	3	2	2
109	190	,10	3	2	2
110	191	,06	3	2	2
111	155	880,00	0	0	2
112	156	1089,00	0	0	2
113	157	1089,00	0	0	2
114	158	785,00	0	0	2
115	159	898,00	0	0	2
116	160	952,00	0	0	2

	v1	v5	v2	v3	v4
117	161	942,00	0	0	2
118	162	1026,00	0	0	2
119	192	785,00	0	0	2
120	193	950,00	0	0	2
121	194	,30	2	2	1
122	195	,30	2	2	1
123	196	,50	2	2	1
124	197	,30	2	2	1
125	198	,10	2	2	1
126	199	,30	2	2	1
127	200	,30	2	2	1
128	201	,50	2	2	1
129	202	,10	2	2	1
130	204	,30	2	2	1
131	205	,30	2	2	2
132	206	,30	2	2	2
133	207	,10	2	2	2
134	208	,30	2	2	2
135	209	,10	2	2	2
136	210	,50	2	2	2
137	211	,10	2	2	2
138	212	,50	2	2	2
139	213	,10	2	2	2
140	214	,50	2	2	2