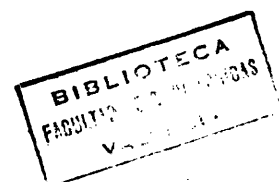


UNIVERSIDAD DE VALENCIA  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
CATEDRA DE CITOLOGÍA E HISTOLOGÍA

ESTUDIO DE LA CINÉTICA DE PROLIFERACIÓN Y DE LA  
PRODUCCIÓN DE CELULAS BINUCLEADAS DE UN CULTIVO CELULAR  
"IN VIVO". TUMOR ASCÍTICO DE EHRLICH.

Tesis Doctoral realizada  
por D. Jose Pertusa Grau  
para acceder al grado de  
Doctor en Ciencias Biológicas.



UMI Number: U607632

All rights reserved

INFORMATION TO ALL USERS

The quality of this reproduction is dependent upon the quality of the copy submitted.

In the unlikely event that the author did not send a complete manuscript and there are missing pages, these will be noted. Also, if material had to be removed, a note will indicate the deletion.



UMI U607632

Published by ProQuest LLC 2014. Copyright in the Dissertation held by the Author.  
Microform Edition © ProQuest LLC.

All rights reserved. This work is protected against  
unauthorized copying under Title 17, United States Code.



ProQuest LLC  
789 East Eisenhower Parkway  
P.O. Box 1346  
Ann Arbor, MI 48106-1346

R. 1876094

R. 4716

Dr. D. Vicente Alcober Coloma, profesor colaborador de la  
Catedra de Citología e Histología de la Faculta de  
Ciencias Biológicas de la Universidad de Valencia.

CERTIFICA.

Que D, Jose Pertusa Grau ha realizado bajo su dirección  
la presente Tesis Doctoral titulada "Estudio de la  
cinética de proliferación y de la producción de Células  
Binucleadas de un cultivo celular in vivo. Tumor ascítico  
de Ehrlich", la cual ha concluido con el máximo  
aprovechamiento.

Y para que conste, expido el presente certificado en  
Burjassot, a 29 de OCTUBRE de 1985.



Fdo. V. Alcober Coloma


Carlos López García, catedrático de Citología e Histología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Valencia.

Tiene el honor de informar.

Que D. Jose Pertusa Grau ha realizado en esta Cátedra los trabajos encaminados a la consecución de la presente Tesis Doctoral y que lleva por título

"Estudio de la cinética de proliferación y de la producción de Células Binucleadas de un cultivo celular in vivo. Tumor ascítico de Ehrlich."

Burjassot a 29 de octubre de 1985



Fdo. C. López García

La presente Tesis Doctoral se ha realizado bajo la total subvención de la Junta Provincial de Valencia de la Asociación Española Contra el Cáncer.

## AGRADECIMIENTOS

Se que me dejaré a alguna persona en el tintero en el listado de agradecimientos. Si así ocurriese no me gustaría que pensases que mi desagradecimiento te ha tocado a ti precisamente, por lo tanto, antes de comenzar a enumerar nada, quiero agradecerte tu ayuda, todo lo que has hecho por los demas y que nunca te han agradecido.

Al Dr. Alcober. Porque, por su culpa, acabé en esta extraordinaria disciplina que es la Histología. Porque me transmitió el gusanillo de la mitosis y perseveró, más que yo mismo, en que nuestro trabajo llegase a buen termino.

A D. Antonio Llombart Rodriguez, por la confianza que depositó en nosotros desde el primer día. No cabe duda que sin su apoyo nunca hubiésemos sacado cabeza en ninguna parte.



A José A. Pellicer Artés, paciente compañero, cincuenta por ciento en todos los trabajos; con el que coincidí un día por orden de lista y al que ya no perdí de vista ni en el servicio militar. Insisto, por tu paciencia, gracias Pepe!

A Pere Lluís Tineo y Juanma Ferrer, porque, codo con codo, fueron los que me enseñaron a luchar en el laboratorio contra las técnicas y los estudiantes.

Además, quiero agradecer a Pere el trabajo extra que le ha llevado leer el manuscrito antes de publicarlo y, especialmente, discutir conmigo su contenido.

A María José Lorente, hermana de leche como aprendices de Ayudante de clases prácticas. Porque siempre pensó que podíamos llegar a ser doctores.

A Paco Pepe Martínez y Chonchi Molowny, por estar siempre dispuestos a prestar esa ayuda insignificante, a veces tan necesaria.

A Carlos López, porque sin su comprensión y tolerancia no se hubiese desarrollado el proyecto de esta Tesis.

A todos los miembros de la Cátedra, a los que he nombrado y a los que no, camaradas de barco universitario.

Quiero agradecer especialmente al Licenciado D. Francisco Vives Boix, que por ahí andará, más que su trabajo y dedicación al proyecto que hoy culmina, al amigo que ha compartido tantas horas de estudio en la Histología y el misterio de la Historia.

A Asun y Ana

A la familia Pertusa

1. Introducción	1
1.1 Origen y definición	2
1.2 Líneas y sublíneas	3
1.3 Descripción	5
1.4 Ciclo celular	6
1.5 Planteamiento	11
2. Material y Métodos	16
2.1 El tumor	17
2.1.1 Origen y características	17
2.2 Preparación del pase donante	18
2.3 Pase de estudio	19
2.4 Modelos de muestreo	20
2.5 Animales de experimentación	21
2.6 Control de pesos	21
2.6.1 Peso de los animales	21
2.6.2 Peso del tumor	21
2.7 Toma de muestras	22
2.7.1 Frotis	23
2.7.2 Densidad celular	23
2.8 Índice Mitótico	24
2.9 Índice de marcado	25
2.10 Índice de Binucleadas	26
2.11 Técnicas de coloración	26
2.11.1 Coloración de May-Grünwald	27
2.11.2 Reacción de Feulgen	29
2.12 Autorradiografía	31
2.13 Obtención de diámetros celulares y cálculo de N/C	33
2.14 Proceso de datos	34
3. Resultados	36
3.1 Peso de los controles	37
3.2 Peso de los portadores	38
3.3 Peso del tumor	39
3.4 Densidad	40
3.5 Índice Mitótico	41
3.6 Índice de células binucleadas	43
3.7 Marcado autorradiográfico	44
3.7.1 Índice de marcado total	44
3.7.2 índice de marcado	45
3.7.3 Índice de binucleadas marcadas	46
3.8 Morfometría	47
3.8.1 Diámetros citoplásmicos	47
3.8.1.1 Población total	47
3.8.1.2 Células marcadas	49
3.8.1.3 Células no marcadas	49
3.8.2 Diámetros nucleares	51
3.8.2.1 Población total	51
3.8.2.2 Células marcadas	51
3.8.2.3 Células no marcadas	52

3.9	Relación Nucleoplásmica (N/C)	52
3.9.1	Población total	53
3.9.2	Células marcadas	54
3.9.3	Células no marcadas	54
3.10	Diámetros en mitosis y binucleadas	54
3.11	Morfología	56
3.11.1	Células en mitosis	56
3.11.2	Células uninucleadas	57
3.11.3	Células binucleadas	58
3.11.4	Elementos no tumorales	59
3.12	Modelo de división	60
4.	Discusión	63
4.1	Parámetros convencionales	64
4.1.1	Pesos	64
4.1.1.1	Peso de controles	64
4.1.1.2	Peso de portadores	65
4.1.1.3	Peso del tumor	67
4.1.2	Densidad	69
4.2	Población mitótica	74
4.2.1	Sincronización inicial	74
4.2.2	Índice mitótico	76
4.2.3	Modelos de crecimiento y división	79
4.2.4	Modelos de muestreo	85
4.2.5	Marcado autorradiográfico	86
4.3	Células Binucleadas	93
4.3.1	Binucleadas como parámetro de crecimiento	93
4.3.2	Morfología	95
4.3.3	Índice de células binucleadas	97
4.3.4	Índice de células binucleadas marcadas	101
4.4	Diámetros celulares y relación N/C	105
4.4.1	Diámetro y relación N/C como parámetros de crecimiento	105
4.4.2	Diámetros celulares	109
4.4.2.1	Células marcadas	111
4.4.2.2	Células no marcadas	112
4.4.3	Relación N/C	113
4.5	Morfología	116
4.5.1	Células en mitosis	116
4.5.2	Células binucleadas	119
4.5.3	Células mononucleadas	120
5.	Conclusiones	122
6.	Figuras	125
7.	Bibliografía	180
8.	Apéndices	192
8.1	Tablas	193
8.2	Figuras regresión lineal	204

## INDICE DE FIGURAS

- 1.- Peso de los controles E1
- 2.- Peso de los controles E2
- 3.- Peso de los controles E3
- 4.- Peso de los ratones portadores E1
- 5.- Peso de los ratones portadores E2
- 6.- Peso de los ratones portadores E3
- 7.- Peso de los ratones portadores S1
- 8.- Peso de los ratones portadores S2
- 9.- Peso del tumor E1
- 10.- Peso del tumor E2
- 11.- Peso del tumor E3
- 12.- Peso del tumor S1
- 13.- Peso del tumor S2
- 14.- Densidad E1
- 15.- Densidad E2
- 16.- Densidad E3
- 17.- Densidad S1
- 18.- Densidad S2
- 19.- Indice mitosico E1
- 20.- Indice mitosico E2
- 21.- Indice mitosico E3
- 22.- Indice mitosico S1
- 23.- Indice mitosico S2
- 24.- Indice de binucleadas E1
- 25.- Indice de binucleadas E2
- 26.- Indice de binucleadas E3
- 27.- Indice de binucleadas S1
- 28.- Indice de binucleadas S2
- 29.- Indice de marcado (LI) S1
- 30.- Indice de marcado total S1
- 31.- Indice de binucleadas marcadas S1
- 32.- Diametros nuclear y citoplasmico en celulas totales S1
- 33.- Diametros nuclear y citoplasmico en celulas marcadas S1
- 34.- Diametros nuclear y citoplasmico en celulas no marcadas S1
- 35.- Relacion N/C en celulas totales, marcadas y no marcadas 40 horas.
- 36.- Relacion N/C en celulas totales, marcadas y no marcadas 41 horas.
- 37.- Relacion N/C en celulas totales, marcadas y no marcadas 42 horas.
- 38.- Relacion N/C en celulas totales, marcadas y no marcadas 43 horas.
- 39.- Relacion N/C en celulas totales, marcadas y no marcadas 44 horas.
- 40.- Histograma de doble entrada N/C, celulas totales, 40 horas.
- 41.- Histograma de doble entrada N/C, celulas totales, 41 horas.

- 42.- Histograma de doble entrada N/C, células totales, 42 horas.
- 43.- Histograma de doble entrada N/C, células totales, 43 horas.
- 44.- Histograma de doble entrada N/C, células totales, 44 horas.
- 45.- Histograma de doble entrada, células marcadas, 40 horas.
- 46.- Histograma de doble entrada, células marcadas, 41 horas.
- 47.- Histograma de doble entrada, células marcadas, 42 horas.
- 48.- Histograma de doble entrada, células marcadas, 43 horas.
- 49.- Histograma de doble entrada, células marcadas, 44 horas.
- 50.- Histograma de doble entrada, células no marcadas, 40 horas.
- 51.- Histograma de doble entrada, células no marcadas, 41 horas.
- 52.- Histograma de doble entrada, células no marcadas, 42 horas.
- 53.- Histograma de doble entrada, células no marcadas, 43 horas.
- 54.- Histograma de doble entrada, células no marcadas, 44 horas.
- 55.- Anafases con cromosomas no orientados. Anafases con filamento. Telofase con micronúcleo y filamento de conexión.
- 56.- Metafase grande y pequeña. Metafases con placas incompletas. Metafase normal, vista ecuatorial.
- 57.- Telofase grande y pequeña. Metafase con cromosomas no orientados.
- 58.- Telofase marcada y no marcada. Anafases marcadas y mitosis tripolar.
- 59.- Profases marcadas.
- 60.- Metafases marcadas.
- 61.- Anafases y telofases marcadas. Telofase no marcada.
- 62.- Células marcadas de distinto tamaño.
- 63.- Células vacuoladas.
- 64.- Células vacuoladas marcadas.
- 65.- Células binucleadas. Binucleadas con micronúcleos. Binucleadas de diferentes tamaños.
- 66.- Célula binucleada con filamento de conexión. Telofase con cromosoma estirado.
- 67.- Células binucleadas marcadas y no marcadas.
- 68.- Células binucleadas no marcadas y marcadas con distinta intensidad de marcado.
- 69.- Células con micronúcleos marcados.
- 70.- Modelos teóricos de división. Toma de muestras continua.
- 71.- Modelos teóricos de división. Toma de muestras a intervalos de 24 y 24+6 horas.

**INTRODUCCION.**



## 1.1 ORIGEN Y DEFINICION.

El carcinoma ascítico de Ehrlich (EAT) es un tumor indiferenciado que se originó espontáneamente en la glándula mamaria del raton común. Paul Ehrlich consiguió estabilizar el carcinoma como tumor transplantable por inyección de un triturado del mismo en la cavidad abdominal y en inoculación subcutánea. Desde el momento en que Ehrlich publica sus trabajos sobre el carcinoma mamario del ratón (1905), y debido a la sencillez de manejo y agresividad de la nueva línea transplantable, comienza una gran demanda del carcinoma en todos los laboratorios, primero en Europa y más tarde en todo el mundo. Parece ser que fué la forma que Ehrlich llamó "mishka", una forma intermedia entre un sarcoma y un epiteloma, la que comenzó a difundirse más prontamente, pasando a Francfurt en primer lugar y Estocolmo y Copenhague, al laboratorio de Klein, después (Haushka, 1953). En la actualidad el carcinoma de Ehrlich es un material muy común en muchos laboratorios.

## 1.2 LINEAS Y SUBLINEAS

La morfología de casi todos los tipos de tumor de Ehrlich es semejante, pero no así el número modal cromosómico de sus células que, desde un principio, fué una de las características que se hicieron más variables, a su paso de laboratorio en laboratorio. Pronto comenzó a hablarse de líneas y sublíneas del EAT que, como primera característica, diferían en la ploidía modal, encontrándose en algunos casos diferencias de hasta 20 cromosomas entre dos líneas de Ehrlich distintas (Stewart et al., 1959).

Se ha mencionado que la morfología del tumor es semejante en todos los casos, con la única excepción de una línea descrita por Paweletz (1971) capaz de almacenar glucógeno, incluso intranuclearmente.

Las causas de esta variabilidad del tumor han sido discutidas con amplitud en un intento de comprender mejor la relación huésped-tumor, ya que el EAT crece sobre ratón, en su cavidad abdominal; con respecto a la variabilidad del tumor y la diferencia entre diversas líneas tumorales, Selbi y colaboradores (1954, 1956), en un estudio comparativo de algunas de ellas y el tronco original, afirman que las líneas establecidas intentan cambiar sus características de diferentes formas, dependiendo de las condiciones ambientales. En todo caso

la interacción huesped-tumor, como ya dijimos, es la responsable exclusiva de la variación tumoral.

Pero quizá no sea la diferencia entre las distintas líneas del EAT el aspecto más difícil de comprender y abordar desde el punto de vista experimental. Recientemente el grupo de Fomina ha planteado la presencia de subpoblaciones dentro de ciertas líneas de tumor de Ehrlich, basándose en la variación que se establece en el número de cromosomas a lo largo del periodo de implantación y en la variación de los cromosomas marcadores durante dicho periodo, produciéndose una alternancia en el predominio de cada subpoblación (Fomina et al., 1978, 1979a, 1979b).

Por otra parte, algunos cromosomas marcadores son una constante para las diversas líneas del carcinoma de Ehrlich (Rodova et al., 1980).

Parece evidente la versatilidad del EAT en lo que a la moda cromosómica se refiere, pero en contra de esta opinión salen al paso Schiffer y Markoe (1974) que sólomente encontraron un cromosoma de diferencia entre la moda cromosómica de una línea de EAT, en dos años, respecto a la moda que dicha línea presentaba en el laboratorio de Lala en 1972. Este último autor (Lala et al., 1980) ha corroborado la poca, o mejor dicho la lenta, variación de algunas líneas de Ehrlich, incluso en condiciones tan adversas como tras hibridación por fusión

con células del ratón CBA/HT6, en cuatro años de estudio.

### 1.3 DESCRIPCION

Las primeras descripciones morfológicas del EAT se deben al propio Ehrlich (1905), aunque las más clásicas, consideradas por todos los investigadores como el punto de partida, las refiere Hauschka (1953) y Stewart (1959), este último en el Atlas de Tumores del "Armed Forces Institute of Pathology", en el capítulo dedicado al tumor de Ehrlich.

#### 1.3.1 Descripción morfológica.

El citoplasma de las células del EAT es altamente basófilo, de aspecto granular y vacuolado, siendo, sobre frotis, más oscuro el periférico que el perinuclear (Stewart et al., 1959). Presenta poliribosomas libres así como pequeñas cisternas del retículo endoplásmico dispersas, sin formar grandes áreas. Es fácilmente observable un aparato de Golgi en disposición perinuclear y relacionado con el centrosoma, de estructura característica. En alguna ocasión se ha descrito la presencia de gotas lipídicas (Wood, 1970), lo que es, junto con la presencia de glucógeno (Paweletz, 1971), poco frecuente.

El núcleo se describe como hipercromático (Stewart et al., 1959), redondo, oval o lobulado y un tanto variable en cuanto a su tamaño. Es frecuente encontrar estructuras basófilas submicroscópicas en los cromosomas (Mundkur, 1967). El número de nucleolos es variable, con la estructura característica de dos áreas: la zona granular y la fibrilar (Goessens y Lepoint, 1974).

Los estudios encaminados a la determinación de la masa nuclear son numerosos, desde la puesta a punto por Lederer y Sandritter (1967) de las técnicas citofotométricas en este material, demostrando la relación 1:1 entre Histonas y ADN en el tumor. Este tipo de trabajo en los momentos actuales ha ido encaminado a la determinación de los tiempos de síntesis y el establecimiento de la secuencia de replicación en el tumor de Ehrlich. Cabe destacar la relación encontrada en la aneuploidía tumoral (Leeman et al., 1968) y la variabilidad en la masa nuclear (Kim y Woo, 1975).

#### 1.4 CICLO CELULAR

Hace ya algunos años que quedó claramente establecido el concepto de Ciclo Celular (CC) y sus fases. Sólomente unas puntualizaciones por parte de Patt y Quastler (1963), postulando el periodo G<sub>0</sub> diferente de G<sub>1</sub>, y de Bullough (1965), con la introducción de los

términos apofase, dicofase y profase como subdivisiones del periodo G1, han completado los conceptos establecidos por Howard y Pelc (1953).

Aunque se conocen los procesos metabólicos principales que ocurren en cada periodo, aún quedan algunas funciones importantes de la síntesis para la división, que han de ser estudiadas más a fondo.

Siempre se hace difícil referirse al CC desde el punto de vista del morfológo, habida cuenta de que estructuralmente sólo es visible la mitosis (M). El resto de las fases del CC se conoce por la aplicación de técnicas no estrictamente morfológicas sino más bien bioquímicas. Es cierto que las fases G1, S, G2 se caracterizaron por seguimiento de procesos sintéticos fundamentalmente, y es eso precisamente lo que hace que el ciclo celular sea complejo de estudiar morfológicamente: sólo es "visible" un periodo de todos aquellos por los que pasa la célula para la división y es, por lo general, el periodo más corto.

Desde el punto de vista cinético la célula tiene tres programas sintéticos que realizar en cualquier momento (Bullough, 1965). En primer lugar el programa principal, relacionado con el mantenimiento de funciones vitales como la respiración, la incorporación y la síntesis de precursores básicos. En segundo y tercer lugar, dos programas alternativos y excluyentes entre sí:

si se realiza el segundo programa, responsable de la diferenciación celular, se ha de abandonar el tercero, de síntesis para la división celular.

Mientras que la síntesis para el mantenimiento celular se realiza en todo momento, en algunos sistemas celulares existe una estrecha relación entre la puesta en funcionamiento del programa de diferenciación y el de división. Los mecanismos por los que se controla la actividad premitótica o funcional, son en la actualidad del mayor interés en el estudio de la cinética de las células y los tejidos.

Se sabe que es en el periodo G<sub>0</sub> (en dicofase) cuando las células desarrollan uno u otro programa sintético (Papaconstantinou, 1967) y que hay un momento (R) que una vez superado conduce indefectiblemente a la célula a la entrada en el programa sintético premitótico.

El periodo alrededor del cual se desarrolla el CC es el tiempo S o periodo de síntesis de ADN. No vamos a entrar aquí en un estudio profundo sobre las fases del CC y sólo queremos destacar la importancia que tiene la síntesis del ADN para el reparto mitótico posterior. Con el desarrollo de las técnicas autorradiográficas se solventó gran parte del problema de la duración del CC y especialmente de la marcha de los acontecimientos de la duplicación del ADN.

El resto de procesos sintéticos que se producen

en G1 van encaminados a hacer posible por una parte la duplicación del ADN, y por otra, la preparación de los elementos necesarios para el reparto. Por lo tanto, si son fundamentales los procesos sintéticos ocurridos en S, no lo son menos los que se producen en las otras dos fases sintéticas del CC, como lo demuestra el hecho de que núcleos inactivos transplantados dentro de células en fase S, comenzaban inmediatamente la síntesis de ADN (Graham, 1966; Prescott y Goldstein, 1967). Parece claro el control citoplásmico de la síntesis de ADN en células en ciclo (Baserga, 1968).

La complejidad de los procesos sintéticos del CC se ha tratado ampliamente desde la determinación de las fases del ciclo por Howard y Pelc (1953), aunque podemos destacar el trabajo de Baserga (1968) en el que se pasa revista detalladamente a los distintos tipos de ciclo, en células blásticas o preparadas para la entrada en CC y las células que se activan y entran en CC pero que de normal no lo hacen; y la revisión de Bullough (1975) sobre la homeóstasis del ciclo celular y el control del mismo por calonas y diversos sistemas hormonales.

La duración del CC es la suma de las duraciones de cada periodo. La mitosis suele ser el más corto de todos ellos, estimándose su duración, por microcinematografía, entre 15 y 60 minutos. Los tiempos de S y G2 suelen ser relativamente constantes para cada



estirpe celular. Pero G1, o más concretamente G0, es muy variable en duración , incluso para una misma línea celular.

En cuanto al ciclo celular del tumor de Ehrlich se refiere, el asunto no es sencillo de tratar debido a los dispares datos que aporta la bibliografía (Tabla I). El ciclo celular se alarga con la edad del cultivo pero, además, diversos autores aportan duraciones diferentes incluso en el mismo día y la misma línea tumoral (Lala y Patt, 1966; Lala y Patt, 1968; Lala 1972a).

No todas las células que acaban la mitosis han de entrar en un nuevo ciclo o comenzar su diferenciación. En el caso del EAT, las células no parecen disponer de la alternativa de la diferenciación por lo que, una porción de elementos, pueden quedarse en G0 por tiempo indefinido formando el compartimento quiescente (Q) o de "resting cells" (Lala y Patt, 1968a; Epifanova y Terskikh, 1968).

Los problemas cinéticos que presentan los cultivos celulares de crecimiento rápido, como el EAT, los hibridomas o las células cultivadas "in vivo", derivan fundamentalmente de la síntesis premitótica y el reparto de cromosomas. Esta afirmación pensamos que toca el fondo del problema en lo que a la variabilidad de los tumores experimentales se refiere. Las causas del alargamiento del ciclo se han interpretado de diversas maneras por los

autores: por la acumulación de productos tóxicos retardadores del crecimiento, demostrado por Lala y col. (1978) y Tong y Chen (1979) no sólo sobre el EAT sino sobre otros modelos experimentales; por la baja disponibilidad de metabolitos para la división (Minkel y col. 1979, Saryan y col., 1979); por la presencia de sustancias (proteínas) que detendrían las células en G0 (Rodova et al., 1980); o por el aporte de fluído por parte del huésped, lo que dificulta el crecimiento tumoral (Rothbarth y col. 1981). Se puede entender fácilmente que una de aquellas o el conjunto sean las causas del alargamiento del CC, pero no se puede ponderar fácilmente el efecto de este alargamiento sin conocer que algunos tumores de Ehrlich pasan de tener un CC de 21.5 horas a 47 horas del día primero al quinto de implantación (Wiebel y Baserga, 1968) o de 12 a 44 horas (Tannock, 1969), del día segundo al cuarto.

### 1.5 PLANTEAMIENTO

La morfología de la célula del EAT es bien conocida tanto al MO como al ME de tal forma que pocos detalles pueden considerarse inéditos desde el punto de vista morfológico (Stewart et al., 1959; Mundkur, 1967; Goessens y Lepoint, 1974). Desde el Bioquímico el panorama es bien distinto. El conocimiento de la

bioquímica tumoral comenzó hace relativamente poco, debido principalmente a los requerimientos técnicos que algunos estudios conllevan. De hecho, el estudio de la bioquímica tumoral es el estudio de la bioquímica de la célula animal en general. Así, el significado de proteínas de membrana con el reconocimiento de la célula por parte del sistema inmune, está siendo abordado en la actualidad con nuevas y refinadas técnicas de inmunohistoquímica. Por lo tanto, aunque el EAT es un material con edad suficiente para considerarlo perfectamente estudiado, no lo es más que una célula plasmática o un linfocito.

Pero además, aún quedan aspectos morfológicos no aclarados en el EAT. Nos referimos especialmente a algunos elementos celulares característicos como son las células vacuoladas, o mejor dicho, la vacuolización que se produce en algunas células del EAT bajo ciertas condiciones; o la forma de producción de las células binucleadas, elementos descritos en contadas ocasiones y relacionados con diversos tratamientos (Roberts y Cole, 1970; Connolly, 1982); aún se desconoce grandemente su cinética de formación. Esto último, la cinética de los elementos del EAT está siendo todavía estudiado y cada vez con más ímpetu, debido a que la cantidad de tumor recolectada de un animal portador es muy grande en muy poco tiempo, es decir, se puede estudiar la evolución del

tumor en tan sólo dos semanas, lo que significa que la experimentabilidad de este material es muy alta.

Un aspecto más de los estudios actuales sobre el EAT se refiere a la utilización del mismo en la evaluación de diversos fármacos antitumorales o antimitóticos, debido precisamente al rápido crecimiento y desarrollo del EAT y la facilidad de apreciar los resultados.

Cuando nos propusimos estudiar el EAT en nuestro equipo de trabajo, la elección recayó en el por dos motivos: Por una parte algunos de los miembros del grupo se encontraban realizando bioensayos para la determinación y evaluación de diversas sustancias antitumorales para un laboratorio farmacéutico. Por otro lado, y consecuencia de lo anterior, los estudios de los controles del EAT habían puesto en la pista sobre algunos aspectos que la bibliografía del momento no explicaba satisfactoriamente. Se planteó en consecuencia un protocolo de trabajo que se escalonó según un orden lógico experimental. En primer lugar se determinó el patrón de crecimiento de la cepa de EAT de que disponíamos en nuestro laboratorio. Fruto del establecimiento del patrón de crecimiento fue un trabajo que sirvió de Tesina de Licenciatura para uno de los miembros del equipo en aquel momento.

El estudio de la presencia común de células binucleadas y gigantes en el EAT, así como su mecanismo de producción fue el primer objetivo que se adoptó para el desarrollo de la presente Tesis Doctoral. A ese planteamiento se le añadió con el tiempo otro aspecto que podía dar luz al problema de la célula binucleada: el estudio autorradiográfico del tumor. No se pretendía determinar la duración del ciclo celular del EAT, sino poder seguir la secuencia de formación de estos elementos. Ello nos llevó de lleno al problema de la cinética celular del EAT en un aspecto de la mayor actualidad: el estudio de las subpoblaciones del tumor, el ritmo mitótico, el alargamiento del Ciclo celular, en definitiva, de la cinética de las distintas subpoblaciones del EAT.

Así pues, se han planteado las siguientes cuestiones en la presente tesis doctoral:

1-Determinar la presencia de las distintas subpoblaciones en el tumor en momentos próximos al implante.

2-Determinar el modelo de crecimiento, o aproximarnos al mismo, durante los días de crecimiento exponencial.

3-Establecer la cinética de las células binucleadas en el tumor

4-Indagar el origen de estos elementos y su

relación con la población mitótica, o su producción por fusión de elementos uninucleados.

Para desarrollar lo anteriormente expuesto, nos hemos apoyado en el estudio cuantitativo de los distintos elementos, en función del tiempo de implantación del tumor en el huesped y la técnica autorradiográfica.

## MATERIAL Y METODOS

Los protocolos experimentales que se diseñaron para el presente trabajo se plantearon sin perder de vista dos directrices fundamentales:

1. Haciendo hincapié en la tasa de crecimiento y la relación huésped-tumor que se establece con el inóculo del mismo;
2. Que el estudio fundamental es el aspecto morfológico y cinético del carcinoma de Ehrlich, especialmente las células binucleadas y de la cinética de proliferación del conjunto del cultivo.

## 2.1 EL TUMOR.

### 2.1.1 Origen y características.

El carcinoma ascítico de Ehrlich que es objeto del presente trabajo es una cepa hipertriploide que llegó a nuestras manos en octubre de 1980, procedente del Instituto de Farmacognosia "Celestino Mutis" del CSIC, por la amabilidad de los doctores Bentura, Murcia y Arroyo, los últimos miembros del citado Instituto. Ellos, a su vez (comunicación personal), lo recibieron del Intituto "Gustave Roussy" de Villejuif.

Como ya hemos mencionado, cariotípicamente el tumor es una línea hipertriploide, presentando, en el



momento de la llegada a nuestro laboratorio, una moda de 68 cromosomas y un índice mitótico normal de valor medio muy próximo al 20 por mil en el quinto día. En una caracterización llevada a cabo algunos meses más tarde, el tumor presentaba un número modal de 65 cromosomas, lo que aún lo mantiene en hipertriploide (Vives, 1984).

En relación a las características morfológicas, se pueden aplicar al mismo las consideraciones hechas en el capítulo de Introducción. Más adelante volveremos a tratar el tema al referirnos a las características morfológicas específicas objeto de estudio en el presente trabajo.

## 2.2 PREPARACION DEL PASE DONANTE.

El tumor se mantiene en nuestro laboratorio por pases semanales sucesivos sobre machos o hembras indistintamente. Es a lo que nos referiremos como pases de mantenimiento y que nos permiten disponer siempre de un cultivo joven cada semana.

Del pase semanal de mantenimiento y cuando se va a proceder al trasplante habitual, se inoculara cierto número de animales, además de los destinados al mantenimiento de la línea tumoral, que serán los donantes de tumor para transplantarlo a los destinados a experimentación. El número de animales que componen el

pase donante es variable en función de la cantidad de individuos destinados a experimentación.

En el quinto día de crecimiento del cultivo se sacrifican los ratones portadores por dislocación cervical y se procede al trasplante en el pase de estudio.

La operación de preparación de un pase donante se realiza con el fin de no hipotecar la supervivencia del tumor en la colonia. Es un método seguro para disponer de cantidad suficiente de fluido ascítico tumoral, en óptimas condiciones de crecimiento celular, para inocular un gran número de portadores destinado a experimentación.

Con la preparación de un pase donante se consigue, además, disponer de un cultivo homogéneo en cada protocolo experimental. Se ha elegido el quinto día de crecimiento por ser éste el punto medio de la fase logarítmica de crecimiento. Evidentemente, cada pase donante es controlado en sus características citológicas con el fin de verificar lo anteriormente expuesto.

### 2.3 PASE DE ESTUDIO

Como acabamos de decir, el pase de estudio se prepara siempre a partir de un tumor de 5 días de edad.

En todos los casos la cantidad de tumor inoculada fué de 0.125 ml, tomada directamente de la cavidad



abdominal del ratón portador, conteniendo 15 millones de células.

El día elegido como comienzo de cada experimento se denomina "día cero" y en todos los casos se tomó la precaución de inocular los ratones de experimentación a las 8 AM solares, ya que algunos de los protocolos se basan, precisamente, en la diferencia horaria de la toma de muestras.

#### 2.4 MODELOS DE MUESTREO

Se siguieron tres modelos de muestreo distintos:

1. Una sola toma de muestras diaria, con intervalo regular de 24 h. Llamamos E1 a este experimento.

2. Doble toma de muestras diaria, con un intervalo de 6h entre las tomas del mismo día, y 24 h entre la primera toma de dos días consecutivos. Dos experimentos se realizaron de esta manera, llamándoles E2 y E3 respectivamente.

3. Muestreo múltiple diario, siguiendo un intervalo horario variable pero muy próximo entre sí, de tal manera que los periodos de toma de muestras fuesen a intervalos regulares. Los dos experimentos que se realizaron siguiendo este tercer tipo de toma de muestras se denominaron S1 y S2.

## 2.5 ANIMALES DE EXPERIMENTACION.

En todos los casos se utilizaron como animales portadores hembras de ratón OF1 con edades comprendidas entre los 40 y 60 días.

## 2.6 CONTROL DE PESOS

### 2.6.1 Pesos de los animales.

Se ha venido efectuando el control del peso tanto en ratones adultos sin tumor, como en portadores, con el fin de determinar el crecimiento del tumor.

Los animales se pesaron en una balanza convencional (Hereus), con error de pesada de 0.1 g, convenientemente tarada con un receptáculo que albergaba a los ratones sobre el platillo.

En el caso del grupo control y en los protocolos con doble toma diaria, se realizaron dos pesadas: una por la mañana (8 AM) y otra por la tarde (2 PM).

### 2.6.2 Peso del tumor.

Se ha optado por determinar el peso y no el volumen, como sería de esperar en el caso de un carcinoma

ascítico, debido a la falta de un método adecuado para evaluar correctamente esta última magnitud. En las ocasiones que se midió el volumen tumoral de cultivos de temprana edad, se obtuvo un error mayor que la propia medida; hasta el día tercero de implantación no aparece una cantidad apreciable de ascitis que permita determinar el volumen tumoral total. Además, en la literatura consultada, la mayoría de los autores recomiendan el parámetro peso como control del crecimiento.

El cálculo del peso se realizó de forma indirecta: los animales se pesaban inmediatamente después del sacrificio; se abría ampliamente la cavidad abdominal, procurando no producir hemorragias y se lavaba ésta abundantemente con suero salino. La diferencia de peso antes y después del lavado se toma como el peso del tumor.

#### 1.7 TOMA DE MUESTRAS

Después de abrir la cavidad abdominal de los ratones y antes del lavado con suero salino, se realizó la toma de muestras del tumor destinadas a dos fines: 1. confección de frotis; 2. determinación de la densidad de la ascitis.

### 2.7.1 Frotis.

La confección de frotis del tumor se realizó siguiendo el método hematológico. Sobre un porta perfectamente desengrasado se coloca una gotita de tumor, aproximadamente en el primer tercio del portaobjetos. Apoyando el borde de otro portaobjetos al que se le han viselado los cantos, se arrastra la muestra, ejerciendo una leve y constante presión hasta que quede completa y uniformemente repartido sobre la superficie del primero.

Se confeccionó suficiente número de frotis para la aplicación de las distintas técnicas.

### 2.7.2 Densidad celular.

Llamamos densidad celular, o simplemente densidad, al número de células tumorales por unidad de volumen de líquido ascítico. Para el cálculo de esta medida se ha recurrido al recuento en cámara cuentaglóbulos según la técnica hematológica del recuento de leucocitos.

Se preparó una dilución con 0.02 ml de tumor en 4 ml de suero salino, al que se le había añadido una pequeña cantidad de rojo neutro, resultando una solución cuyo título era de 1/200. La dilución así preparada debe agitarse repetidamente, para evitar la formación de

agregados celulares que pudiesen introducir errores en el recuento.

Se utilizó una cámara cuentaglóbulos tipo Neubauer doble (RFQ) de 0.0625 mm<sup>2</sup> de área por cuadrado de recuento y 0.1 mm de altura. Se contaron 16 cuadrados por recuento y un total de 12 recuentos por muestra.

El número de células contenidas por milímetro cúbico de líquido ascítico se calculó según la siguiente expresión:

$$N = n * V * 10 * 1/D$$

siendo N: número de células contenidas en 1 mm<sup>3</sup>

n: número de células contadas por cámara

V: volumen de cámara (0.1 mm<sup>3</sup>)

D: dilución

La expresión viene multiplicada por 10 para obtener el resultado en mm<sup>3</sup>.

## 2.8 INDICE MITOSICO

Llamamos índice mitótico (IM) al número de células que se encuentran en mitosis en un momento dado. Su valor se expresa en tantos por mil.

El cálculo de este parámetro, si bien no es difícil de obtener, es sumamente laborioso debido a que se ha de efectuar el recuento directo sobre el frotis coloreado, y sobre un número de células suficientemente

elevado por muestra, con el fin de darle validez estadística.

Para efectuar el recuento partimos de frotis confeccionados según se explicó en el apartado anterior y coloreados por la técnica de May-Grunwald. Se someten a observación microscópica con el objetivo de inmersión, en un microscopio Olympus monocular, modelo KC.

Con el fin de evitar el excesivo número de células por campo, lo que entorpece el recuento, se recurrió a obturar parcialmente el ocular con una laminilla opaca que dejaba un pequeño cuadrado central, por el que sólo se observaban cuatro o cinco células por campo. Se siguieron los bordes de la preparación.

## 2.9. INDICE DE MARCADO

Llamamos índice de marcado (LI) al número de mitosis marcadas, expresado en tantos por cien.

El cálculo de este parámetro se realiza, como en el caso del índice mitótico, por conteo directo de las mitosis marcadas sobre los frotis revelados por la técnica autorradiográfica convencional.

En este caso, evidentemente sólo se estudian las células en mitosis, considerando una célula marcada cuando la marca de plata reducida es muy evidente, sobre los cromosomas ya espiralizados. Si ha lugar a alguna



duda sobre si la célula esta o no marcada, se tomó la norma de desechar como no marcadas a aquellas cuyas marcas no estuviesen localizadas claramente sobre la cromatina y que se encontrase un numero de marcas igual a las medidas en el ruido de fondo.

## 2.10 INDICE DE CELULAS BINUCLEADAS

Aprovechando el estudio que se realizó para el cálculo del IM, se obtuvieron además los índices de células binucleadas y gigantes.

El cálculo de estos nuevos índices se realizó de la misma manera que los anteriores: por recuento directo de dichos elementos y se expresa, también como en el caso anterior, en tantos por mil.

## 2.11 TECNICAS DE COLORACION

Se han utilizado tres técnicas convencionales de coloración, una de las cuales, Hematoxilina de Mayer, no la describiremos por considerarla general de laboratorio y no haber introducido nosotros ninguna variación. Las otras dos, May-Grunwald y Feulgen, las describimos a continuación, con algunas variaciones respecto a las técnicas normalizadas que se encuentran en la bibliografía especializada.

### 2.11.1 Coloración de May-Grunwald.

#### SOLUCIONES Y MATERIAL

\* Colorante de May-Grunwald

Eosinato-Azul de Metileno 0.5 g

(según May-Grunwald)

Alcohol metílico P.A. 100 ml

\* Tampón ácido bórico-bórax pH 9

Acido bórico 50 ml

Bórax 0.2 M 59.7 ml

\* Solución saturada de hidróxido de bario

#### TECNICA

- 1.- Frotis recientes, perfectamente secos
- 2.- Se cubren con solución colorante dejándola actuar durante 5 min con el fin de completar su fijación
- 3.- Sin retirar el colorante se añade la misma cantidad de solución alcalina (tampón borato o solución

de hidróxido bórico), dejándose actuar de 1 a 3 min

4.- Lavar abundantemente con la misma solución alcalina y con agua corriente

5.- Secar al aire

6.- Aclarar con hidrocarburo aromático y montar en resina sintética (Entellán, Merck) o bálamo neutro.

### RESULTADOS

Los núcleos de las células tumorales y leucocitos aparecen en púrpura. Los citoplasmas en azul. Se obtiene una paleta de colores de unos cuatro componentes.

El óptimo de coloración se ha obtenido a pH alcalino, entre 8.7 y 9.

### COMENTARIOS

Si se considera oportuno, se pueden diferenciar las preparaciones con una mezcla de alcohol etílico 70% y ácido acético en la proporción 100:1, lavando posteriormente con solución alcalina y agua corriente.

Si la permanencia en agua alcalina es muy prolongada, se puede llegar a la pérdida del Azul de Metileno de la coloración; esto puede ser interesante en caso de querer estudiar solamente núcleo y nucleolo.

## 2.11.2 Reacción de Feulgen.

### SOLUCIONES Y MATERIAL

#### \* Reactivo de Schiff

pararrosanilina (Merck)	1 g
agua destilada	200 ml
ácido clorhídrico 1 N	10 ml
bisulfito sódico anhidro	1 g

Hacer hervir el agua y agregar la pararrosanilina, agitando hasta su completa disolución. Enfriar a 50 grados y filtrar. Añadir el ácido clorhídrico. Enfriar a 25 grados y añadir el bisulfito. Guardar en la oscuridad al menos 24 h, o hasta que adquiera un color pajizo. Añadir un poco de carbono activo para decolorar totalmente. Filtrar y usar.

#### \* Acido clorhídrico 1 N

#### \* Acido clorhídrico 3 N

#### \* Baño sulfuroso

metabisulfito sódico al 10%	6 ml
ácido clorhídrico 1 N	5 ml
agua destilada hasta	100ml

## TECNICA

- 1.- Frotis recientes, perfectamente hidratados, fijados en vapores de formol o alcohol metílico
- 2.- Lavado en ácido clorhídrico 1 N a temperatura ambiente.
- 3.- Hidrólisis en ácido clorhídrico 3 N a 60 grados durante 10 min
- 4.- Lavado en ácido clorhídrico 1 N a temperatura ambiente
- 5.- Lavado en agua destilada
- 6.- Colorear con el reactivo de Schiff durante una hora y media.
- 7.- Pasar por tres baños sulfurosos de tres minutos cada uno
- 8.- Lavar abundantemente con agua corriente
- 9.- Deshidratar, aclarar y montar

## RESULTADOS

Los núcleos aparecen de color púrpura.

## COMENTARIOS

Se puede dar una coloración citoplásmica de

contraste con Verde Luz al 0.5%, aunque no es de desear porque este último colorante enmascara los óptimos resultados de la reacción.

Tanto los reactivos como las muestras a procesar serán de reciente preparación.

## 2.12 AUTORADIOGRAFIA

La técnica autorradiográfica en estudios de seguimiento del ciclo celular se desarrolla en los años 50, como consecuencia de los trabajos de Howard y Pelc. Originariamente se trabajaba con precursores marcados con P32, pero fue en el laboratorio de Brookhaven donde se sintetizaron los precursores radiactivos a base de tritio.

El fundamento teórico se basa en que un metabolito sencillo, como por ejemplo un nucleótido, en el que uno de sus átomos se ha sustituido por uno de sus isótopos radioactivos, es incorporado en el metabolismo celular sin que ello cause trastorno en el mismo. El precursor así marcado, e incorporado como si se tratase de uno normal con el isótopo corriente no marcado, se detecta a "posteriori" recubriendo la célula con una emulsión fotográfica sensible a la radiación que emite el átomo radioactivo. El revelado de la emulsión sensible

produce un precipitado de plata metálica en las proximidades a los puntos de emisión de radiación.

El único inconveniente que podría presentar la aplicación de precursores radiactivos sería que la dosis de radiación administrada fuera letal para la célula, con lo que no se podría incorporar aquél y, por lo tanto, resultase de todo punto superflua. Esto se ha resuelto sencillamente ya que, precisamente, los marcadores de más frecuente uso emiten radiación beta, poco penetrante.

En nuestro caso se ha utilizado Timidina tritiada, con una actividad específica de 5 mCi/mMol, amablemente suministrada por la Junta de Energía Nuclear. La administración del precursor se hizo por vía intraperitoneal, con una dosis de 0.5 ml de solución de Timidina tritiada, con una actividad total de 10 uCi/ml.

Una vez recogidos los frotis del tumor tratado con solución caliente y fijados con alcohol metílico se procedió a recubrirlos de emulsión sensible Kodak NTB2 (emulsión líquida). Las extensiones así tratadas se dejaron durante cinco días en completa oscuridad a cuatro grados centígrados, pasados los cuales y tras atemperarlos, se revelaron con solución reveladora Kodak D-19 durante seis a ocho minutos a 20 grados de temperatura. Más tarde se fijaron en hiposulfito e inmediatamente se les aplicó una coloración complementaria con Hematoxilina de Mayer, con el fin de

poner de manifiesto los núcleos. Los frotis se deshidrataron con alcohol absoluto, se aclararon con hidrocarburo aromático y se montaron con Entellan (Merck).

En la aplicación de la emulsión sensible se ha de tener la precaución de que esta quede perfectamente seca y uniformemente extendida sobre los portaobjetos, antes de su almacenamiento en nevera. De otra forma, las contracciones que se producen en la gelatina de la emulsión desplazan el grano de plata de la localización real del punto de emisión de radiación, con lo que el estudio posterior de las muestras se hace muy difícil. Se aconseja someter las muestras a ventilación fría, para facilitar el secado.

## 2.13 OBTENCION DE DIAMETROS CELULARES Y CALCULO DE N/C

Se midieron los diámetros celulares (citoplásmicos y nucleares) en el experimento S1, tras el revelado autorradiográfico de los frotis, lo que se realizó siempre sobre ampliaciones fotográficas en tamaño 9x13, con una ampliación total de 2500 aumentos.

En la obtención de la medida se discriminó las células marcadas de las no marcadas, separando asimismo las células en división (metafases y anafases fundamentalmente) y las células binucleadas.



Aunque se dan los resultados en unidades relativas, se calculó un coeficiente de magnificación para obtener los valores de los diámetros reales y expresar los mismos en micras.

La relación N/C se obtuvo como cociente de los diámetros nuclear y citoplásmico. Obviamente, para el cálculo de N/C no es necesario aplicar ningún parámetro corrector sobre los valores directamente obtenidos, ya que, como cociente, expresa una relación sin unidades.

Para la representación gráfica de los diámetros nucleares y citoplásmicos, tanto en células marcadas como no marcadas y relación N/C, se ha elegido el polígono de frecuencias. En el caso de la relación N/C, también se han representado los resultados en histogramas de doble entrada (de tres dimensiones).

#### 2.14 PROCESO DE DATOS

En la elaboración de los datos y el texto de la presente Tesis Doctoral se han utilizado dos ordenadores:

1.- Un microprocesador Olivetti modelo P6066, de 92 Kbytes de memoria central y opción vídeo gráfico.

2.- Un microprocesador Elite I de 64 Kbytes de memoria central, con un programa Applewriter para el proceso de textos. Las gráficas que se presentan se elaboraron con dicho ordenador.

Los programas para la representación tridimensional de los diámetros celulares, se confeccionaron exclusivamente para el caso.

## RESULTADOS

### 3.1 PESO DE LOS CONTROLES

Se ha realizado un seguimiento del peso de los ratones sanos antes de la inoculación del tumor en los experimentos a largo plazo E1, E2 y E3. Se ha considerado el valor medio obtenido en este seguimiento como peso de los controles, ya que los animales sanos, antes del inóculo, son testigos en este parámetro.

Alrededor de una semana antes de la inoculación, los ratones se pesaron diariamente en el mismo momento del día en el que se realizó la toma de muestras posteriormente. Los resultados se expresan en las figuras 1, 2 y 3.

Como se puede observar, las gráficas presentan un aspecto quebrado siendo la resultante en los tres casos una recta con pendiente casi nula, indicando la clara independencia del peso en el tiempo en ratones adultos.

Sólamamente cabe destacar que, por lo general, los valores de la mañana son mayores que los de la tarde, con tan sólo un 5% de variación entre ambas pesadas,

correspondiendo claramente la variación a la pauta de alimentación-excreta que siguen los animales.

El mantenimiento de los ratones a dieta de agua durante el fin de semana no mostró diferencias en el peso respecto al resto de los días en los que se mantuvo a los animales con comida "ad libitum".

### 3.2 PESO DE LOS PORTADORES

El seguimiento del peso de los ratones ha sido continuo durante el tiempo de estudio en los tres experimentos de seguimiento a largo plazo. Momentos antes de la toma de muestras correspondiente, se procedía al pesado de los animales inoculados con el tumor de Ehrlich. De esta manera se ha obtenido tantas medidas del peso como muestras se han realizado.

En los tres casos en que se ha estudiado el tumor a largo plazo, el valor más alto se ha encontrado al final de la experimentación. Las gráficas (Figuras 4, 5 y 6) muestran una clara pendiente positiva.

En los experimentos E1 y E2, en los que se ha realizado una doble pesada diaria, el trazado de las gráficas es característico, con un aspecto semejante al encontrado en los pesos de los controles, en dientes de sierra (Figuras 5 y 6), siendo mayores los valores de los pesos de la mañana que los de la tarde de un mismo día.

Los resultados de los casos de seguimiento, S1 y S2, han presentado pocas variaciones (Figuras 7 y 8) aunque cabe destacar que en ambos casos la resultante tiene una ligera pendiente negativa, indicando una disminución del peso durante el tiempo de estudio. Entre ambos casos existe una gran diferencia de magnitud en los pesos, lo que se debe a que S1 se ha realizado sobre un grupo de animales que mantenían un tumor de tan solo 40 horas, mientras que el otro, S2, se realizó sobre animales que portaban un tumor de cinco días.

### 3.3 PESO DEL TUMOR

Que el tumor crece a lo largo del periodo de implantación, es un hecho evidente que hemos comprobado en los casos E1, E2 y E3, en los que se realizaron estudios durante 6 días de implantación en los ratones portadores.

El crecimiento mas acentuado se ha observado entre el cuarto y el sexto día, lo que se refleja en que la pendiente de las gráficas que representan los pesos del tumor en los experimentos E1, E2 y E3 (Figuras 9, 10 y 11), es más acusada en los días citados para los tres casos. Entre el primer (segundo para E1) y cuarto día, el aumento del peso es poco acusado.

En S1 y S2, en los que la toma de muestras se ha

realizado en intervalos cortos de tiempo, aunque las gráficas muestran un trazado irregular (Figuras 12 y 13), las magnitudes obtenidas se encuentran en el rango de las observadas para el segundo y quinto días respectivamente, que son los días en los que se realizaron ambos experimentos.

### 3.4 DENSIDAD

En los tres experimentos realizados a largo plazo, la densidad ha presentado un notable máximo entre el tercer y cuarto día. Dicho máximo se observa en momentos distintos en dos de los tres experimentos pero en todos ellos la magnitud alcanzada es semejante: alrededor de 180.000 células/mm<sup>3</sup>.

Más tarde, el quinto día, la densidad alcanza un segundo máximo, esta vez común a todos ellos (Figuras 14, 15 y 16), pero de magnitud inferior al primero. El valor de este segundo máximo es de alrededor de 150.000 células/mm<sup>3</sup>.

Así pues, hay dos tramos distintos en cuanto a la densidad se refiere: desde el momento del implante hasta el primer máximo, en el que la tónica es de ascenso; desde el máximo hasta el final, con una tendencia a la disminución del número de células pero de forma más suave con respecto a como se produce el incremento,

encontrándose un segundo máximo, de menor magnitud, en el quinto día.

En el experimento S1, el rango medio de los valores obtenidos concuerda con los del día segundo en los experimentos de seguimiento a largo plazo; ahora bien, el aspecto de la gráfica en este caso (Figura 17), es completamente opuesto y simétrico a los casos anteriores: se presenta un mínimo en la mitad del experimento (42 horas), siendo los puntos extremos los de mayor magnitud. El valor mínimo es de tan solo 70.000 células/mm<sup>3</sup>, lo que significa que se encuentra por debajo incluso de la media obtenida en el primer día.

En S2, la densidad media también se encuentra en el rango esperado para un tumor de cinco días, pero con grandes diferencias de magnitud entre los valores obtenidos en cada momento de muestreo. La gráfica presenta el aspecto de un senoide (Figura 18) con el máximo a los 30 minutos (225.000 células/mm<sup>3</sup>), de mayor magnitud que cualquiera de los valores encontrados para los seguimientos.

### 3.5 INDICE MITOSICO

Las diferencias que se ha encontrado para el IM son las más notables de entre todos los parámetros medidos, distinguiéndose claramente entre el IM de E1, en



el que la toma de muestras es una sólo por día, y E2 y E3, en los que se tomaron dos muestras diarias. Mientras que el IM de E1 parece crecer y ser más alto en los últimos días (Figura 19), en E2 y E3 se observa una clara tendencia a la disminución y estabilización (Figuras 20 y 21). Efectivamente, los IM de E2 y E3 presentan el característico aspecto quebrado de los parámetros del EAT, con una alternancia de máximos y mínimos, con valores de menor magnitud en las muestras de la tarde (hasta el quinto día) que las correspondientes de la mañana del mismo día.

Los valores medios del IM de E1 son menores que los encontrados para E2 y E3: el máximo de la gráfica del IM de E1 se encuentra al sexto día de experimentación, sin embargo los IM de E2 y E3 tienen su punto más alto en la primera medida.

Un importante dato es el obtenido en el tercer día para E2 y el cuarto para E3. Corresponde a un punto que se encuentra por encima de los dos inmediatos anterior y posterior. Este es un punto único en cuanto a sus características ya que, no siendo el de mayor valor del IM durante el tiempo de estudio, corresponde al momento a partir del cual el IM presenta sus valores con menores diferencias de magnitud y con una clara tendencia a la estabilización.

En cuanto a S1, los valores encontrados para el

IM son los más altos de todas las series, alrededor del 40%.; la gráfica (Figura 22) presenta un mínimo a las 42 horas, presentando en conjunto una tónica de descenso.

El IM de S2 se encuentra entre el 20 y el 35%, mostrando un ligero incremento en el tiempo de estudio (Figura 23). No se observan grandes variaciones de magnitud es este caso.

Parece claro que el IM, excepto para E1, presenta mayores valores en los primeros días de implantación que al final de la experimentación. Esto se ve corroborado por S1 y S2, que corresponden al segundo y quinto día de implantación respectivamente, con valores superiores en el IM de S1 a los encontrados en S2. Además, las diferencias de magnitud son más acusadas en los primeros días que al final de los periodos de estudio en los seguimientos.

### 3.6 INDICE DE CELULAS BINUCLEADAS

El número de células binucleadas (CB) presentes en el tumor es pequeño en todos los experimentos, alcanzándose el mayor valor al final del periodo de estudio de E1 (Figura 24).

En el sexto día se alcanzan valores cercanos al 10%, valores semejantes en los tres experimentos de seguimiento a largo plazo. En cuanto al número inicial de

células binucleadas, se aprecian pequeñas diferencias, siendo mayor el valor encontrado en E3 en la muestra tomada en la tarde del primer día.

En resumen, el número de células binucleadas aumenta a lo largo del tiempo en los seguimientos a largo plazo, siendo los más altos valores los del último día de experimentación, con magnitudes del 10% .

En los experimentos con toma de muestras repetidas, destaca que los valores encontrados en cada caso coinciden con los encontrados para el segundo y quinto día respectivamente.

En S1 (Figura 27), el valor más alto encontrado corresponde a las 41 horas desde el momento del implante, siendo dicho valor de 5.3%.

El mayor valor encontrado en S2 corresponde a la última muestra, siendo de 10.2 células binucleadas en 1000 células contadas.

### 3.7 MARCADO AUTORADIOGRÁFICO

#### 3.7.1 Índice de Marcado Total

El índice de marcado total (IMT) es una medida del porcentaje de células que se encontraban en síntesis en el momento de la administración de la Timidina tritiada. Expresa, así mismo, la proporción de las

células marcadas con las no marcadas, en cuanto que de ser muy elevado el de las segundas, tras unas pocas divisiones diluirán el número de células marcadas en el total de elementos.

En todo el tiempo de estudio, el IMT apenas si sufre variaciones, encontrándose su valor medio alrededor del 62.0%. La gráfica se presenta como una línea casi recta, paralela al eje de abscisas (Figura 29).

### 3.7.2 Índice de marcado

Entendemos por índice de marcado (LI), al número de mitosis marcadas frente al total de las mismas. Las siglas LI por las que se ha representado este parámetro no tienen otro sentido que utilizar la misma nomenclatura con la que es conocido en el mundo anglosajón: "Labelling Index".

A lo largo del tiempo de experimentación, el LI pasa por valores muy diferentes en magnitud (Figura 30); el menor valor alcanzado (20%) se da precisamente en la primera hora de muestreo (hora 40), aunque rápidamente, en la hora siguiente, se alcanza el máximo de todo el experimento (90.6%). Un valor de magnitud semejante se obtuvo en la hora 42 (80%), para descender hasta alcanzar el 42.0% en la hora 43, lo que sitúa al IM por debajo de la mitad del máximo. Por último, en la hora 44, el LI

vuelve a subir, sin llegar a alcanzar los altos valores de las horas 41 y 42.

En resumidas cuentas, el LI alcanza su valor más alto 17 horas después de la administración del precursor marcado, manteniendo en la hora siguiente un valor próximo al anterior pero de magnitud ligeramente inferior.

### 3.7.3 Índice de Binucleadas marcadas

Aunque en el segundo día de crecimiento del tumor el número de células binucleadas es pequeño, se ha medido el porcentaje de marcado de estos elementos referido al total de los mismos contados. Su significación se discutirá ampliamente más adelante, pero aquí queremos hacer notar la importancia de encontrar células binucleadas que pasan por S.

El porcentaje de células binucleadas marcadas se ha encontrado por encima del 50% en todo el experimento.

El menor valor se da a las 17 horas de la administración de la Timidina tritiada, presentando la gráfica a partir de aquí un leve incremento y una estabilización, con magnitudes semejantes en los tres puntos de muestreo finales (42, 43 y 44 horas) (Figura 31).

### 3.8 MORFOMETRIA

Los resultados del cálculo de los diámetros citoplásmico y nuclear se han realizado en cuatro poblaciones distintas: células marcadas, no marcadas, en mitosis y células binucleadas. Esto se ha llevado a cabo con el fin de estudiar separadamente el diámetro citoplásmico de las células en mitosis y el de las células en cualquier otro momento del CC; así mismo, la distinción entre marcadas y no marcadas se hizo pensando en que daría luz al problema de las poblaciones presentes en el tumor.

#### 3.8.1 Diámetros citoplásmicos

##### 3.8.1.1 Población total

En la primera hora de muestreo, 40 horas desde la implantación, la distribución se muestra como trimodal, con dos valores (10 y 12) que reúnen la mayor parte de las células (46%); el tercer valor modal solamente supone un 5.5% del total de los elementos, pero con diámetros superiores a 20 micras. En esta hora, el conjunto de elementos mayoritario (80.7%) es menor de 14 micras.

A las 41 horas del implante, la proporción de células menores de 14 micras ha disminuido hasta el

66.5%. La distribución se ha hecho bimodal, con valores modales en las clases 12 y 15. Y se ha hecho además homogénea y semejante a una gaussiana.

Más tarde, en la hora 42, la distribución es unimodal, con el valor modal situado en las 12 micras y con el 90.8% de las células menores de 14 micras. El porcentaje de células con diámetros cercanos a las 9 micras no ha variado sustancialmente en estas dos horas últimas, siendo de 1.9% y 1.2% respectivamente para las 41 y 42 horas. No ocurre lo mismo con el conjunto de células de 15 micras, que ha quedado reducido en esta hora al 9.1%.

Los valores más altos de células pequeñas (menores de 12 micras) se consiguen en la hora 43. El tamaño medio ha disminuido, quedando la distribución desplazada a las clases menores. No obstante, el porcentaje de células grandes se mantiene en 7.6%, siendo la clase 13 la que más elementos ha perdido, pasando de 20% en la hora anterior a tan solo 4.6% en este estadio.

En la última fase del muestreo la situación tiende a alcanzar los valores observados en la hora 42. Una distribución unimodal centrada en la clase 12 (Figura 32).

### 3.8.1.2 Diámetros en células marcadas

La distribución de los diámetros citoplásmicos de las células marcadas es muy semejante a la observada en la población total, lo que no nos ha llamado la atención ya que el porcentaje de células marcadas es muy alto durante todo el experimento; dicho de otra manera, siendo las células marcadas mayoritarias desde el principio y, como ya vimos, con valores muy cercanos al 70%, es lógico pensar que las variaciones en este grupo de células tenga una influencia muy superior que las ocurridas en las células no marcadas.

Las principales diferencias entre las distribuciones de las células marcadas y el total se presentan a las 41 y 42 horas: la distribución de los diámetros citoplásmicos de las células marcadas es unimodal a las 40 horas, no presentándose elementos en las clases 15, 16 y 17; el porcentaje de células pertenecientes a las clases 14, 15, 16 y 17 en el grupo de marcadas es menor que en el total a las 41 horas: por otra parte, la distribución es más claramente bimodal en el primer caso (Figura 33).

### 3.8.1.3 Diámetros en células no marcadas

De manera distinta a como ocurría entre las



células marcadas y el total, en el caso de las no marcadas se aprecian grandes diferencias proporcionales respecto a la distribución del total.

En la primera hora de estudio, 16 horas tras la inyección de la Timidina tritiada, la distribución es claramente bimodal, con un valor nulo en la clase 11, lo que le da el aspecto de dos curvas tangentes. La mitad de las células se encuentran englobadas en la población de diámetros inferiores, que, además, presenta una moda más alta que la de la otra distribución.

En la siguiente hora han desaparecido por completo las clases 9 y 10, siendo bimodal la distribución, pero correspondiendo el máximo a la clase 14. Se ha producido un claro desplazamiento de los diámetros a valores altos.

Una hora más tarde, 42 horas tras la inoculación del tumor, se observa una curva unimodal en la que el 90% de las células se encuentran agrupadas alrededor de la moda. Es notable que las clases extremas hayan desaparecido.

En las dos últimas horas del experimento, a las 19 y 20 horas de la administración del precursor radioactivo, se repite la situación de las dos primeras horas, mostrándose en ambos casos las distribuciones bimodales y, a las 19 horas, con un notable número de elementos en las clases de menor diámetro (Figura 34).

### 3.8.2 Diametros nucleares

#### 3.8.2.1 Poblacion total

Durante todo el tiempo de estudio, la variación de los diametros nucleares es pequeña y unimodal.

Solamente es destacable que en las cuatro primeras horas de estudio, la curva se desplaza hacia la derecha, quedando, ademas, los valores mas agrupados (Figura 32).

#### 3.8.2.2 Diametros en celulas marcadas

Igual que ocurría con los diámetros citoplásmicos, el alto porcentaje de células marcadas hace que la distribución en marcadas y totales difieran poco. Así, se aprecia aquí una mayor proporción de diámetros menores durante el tiempo de experimentación; las distribuciones son unimodales en todas las horas, con la excepción de un pequeño máximo que se detecta en la clase 12, en la hora 17 desde la administración del precursor marcado.

En resumen, la distribución de los diámetros nucleares de las células marcadas y del total son muy semejantes (Figura 33).

### 3.8.2.3 Diámetros en células no marcadas

Aunque existen notables diferencias a lo largo de las 5 medidas realizadas en células no marcadas, una importante característica es común a todas las distribuciones y es que en todas ellas la clase 10 representa la moda, lo que significa que se puede considerar este punto como el eje alrededor del cual se desplaza cada distribución. Obviamente, el porcentaje de células que pertenecen a esta clase varía en magnitud a lo largo del experimento, oscilando entre el 28.5% de las 16 horas y el 48% de las 19 horas.

Tres distribuciones son claramente bimodales: las correspondientes a las 17, 19 y 20 horas, pero en todo caso con valores más bajos en la primera, situada en la clase 8, que la segunda, de la clase 10.

En la primera hora de muestreo, la distribución es ligeramente bimodal y es destacable que el valor más alto se encuentra en la clase 8, con un 33.3% de elementos en ella (Figura 34).

### 3.9 RELACION NUCLEOPLASMICA (N/C)

La relación N/C se ha obtenido por cociente entre los diámetros nuclear y citoplásmico, por lo que dicha relación carece de unidades.

Es evidente que  $N/C$  nunca puede valer 1, puesto que eso supondría que el diámetro nuclear y citoplásmico sería el mismo.

Los valores que se alcanzan están siempre por encima de 0.6 de relación y en ningún caso superan 0.92 (Figuras 35, 36, 37, 38 y 39).

La representación en forma de un histograma de doble entrada, ocupando el eje  $Ox$  los diámetros citoplásmicos,  $Oy$  los diámetros nucleares y  $Oz$  la frecuencia, ayuda a comprender las variaciones que se producen en este parámetro (Figuras 40 a la 54).

### 3.9.1 Población total

Durante el tiempo de estudio la distribución de la relación  $N/C$  es bimodal, coincidiendo en todos los casos las clases en las que se observan las modas (0.75 y 0.85), separadas siempre por una frecuencia menor en la clase 0.80. De otra manera, la frecuencia encontrada para la relación 0.80 es menor que las dos adyacentes a lo largo del experimento. Esta simetría que se observa en todas las distribuciones de  $N/C$  solo difiere de una hora a otra en la proporción de elementos en cada parte, lo que se puede observar en la tabla .

### 3.9.2 Células marcadas

Como ocurría al estudiar los diámetros, la relación N/C de las células marcadas se asemeja a la de las células totales, cumpliéndose también aquí la forma bimodal de la distribución y la baja frecuencia de la clase 0.80. Las variaciones porcentuales vienen expresadas en la tabla .

### 3.9.3 Células no marcadas

Solamente la hora 16 sigue la tónica de la relación N/C vista para las células marcadas y las totales. Por el contrario, este grupo de elementos presenta una frecuencia elevada en la clase correspondiente a la relación 0.80.

Hecha esta excepción, las distribuciones son unimodales en las horas 17, 19 y 20. La hora 18, aunque puede considerarse como bimodal en su distribución, ambos valores modales son comunes a varias clases, lo que le da un aspecto totalmente distinto al presentado por las distribuciones de N/C en células marcadas y totales.

## 3.10 DIAMETROS DE CELULAS MITOSICAS Y BINUCLEADAS

Hemos de distinguir entre la telofase y el resto

de fases de la mitosis, en relación a los diámetros celulares: en el caso de las telofases, se han medido los diámetros de ambas células hijas, de prenucleo y citoplasma; para la metafase y anafase solamente se midió el diámetro citoplásmico, por razones obvias; aunque se ha medido el diámetro nuclear en las profases, debido a la alta dispersión de los valores encontrados, no lo incluiremos aquí sino que será objeto de un estudio posterior con más profundidad.

El diámetro medio de las células en profase, metafase y anafase es de 14.13 micras, con una desviación tipo de 1.30. Para las células en telofase, el diámetro medio citoplásmico es de  $9.05 \pm 1.60$  y el nuclear de  $6.08 \pm 1.16$ .

En cuanto a los diámetros de las células binucleadas, es muy amplio su rango, habiéndose encontrado entre 13 y 27 micras para el citoplasma y entre 8 y 20 micras para los núcleos. La media encontrada para los diámetros citoplásmicos es de  $20.28 \pm 4.58$ , mostrándonos que predominan los elementos de gran tamaño, aunque con una amplia dispersión, como ya habíamos dicho. La media de los diámetros nucleares es de  $13.52 \pm 4.05$ , con la misma variabilidad que en los citoplasmas

### 3.11 MORFOLOGIA

No queremos abundar aquí en los resultados morfológicos del crecimiento del EAT en los primeros días de implantación, habida cuenta que ya fueron expuestos con amplitud en la Tesina de Licenciatura de Vives (1984).

Pasaremos por alto, por lo tanto, lo relativo a la descripción morfológica convencional para detenernos en los resultados de la autorradiografía.

#### 3.11.1 Células en mitosis

En los primeros días de implantación del EAT, el aspecto de las mitosis encontradas es el normal, sin ningún detalle destacable. Hacia mitad del experimento, tercer día, se observan algunas metafases en las que la placa madre parece no cerrada completamente, observándose algún cromosoma no orientado, fuera de la placa; puede tratarse de metafases tempranas que no han concluido la orientación de todos los cromosomas, aunque se ha relacionado este fenómeno con los cromosomas fuera de placa observados en algunas anafases. Es decir, es probable que algunas metafases con cromosomas no orientados lleguen a anafase con estos cromosomas

definitivamente fuera de placa anafásica. También a partir de este momento, aparece cierto número de anafases y telofases en las que algún cromosoma no se ha separado completamente, quedando éstos en forma de un largo filamento que se extiende uniendo las placas hijas. Algunas telofases tardías muestran estos mismos filamentos de cromatina (Figura 55, 56, 57).

La presencia de anafases con placas supernumerarias es poco frecuente, estimándose su aparición a razón de 1:16000.

El marcado autorradiográfico de las células en mitosis no deja duda en cuanto a la bondad del proceso autorradiográfico, técnicamente hablando. La marca se localiza a lo largo del cromosoma y en las células poco marcadas, que ya se encontraban concluyendo el periodo de síntesis, se puede observar el marcado autorradiográfico comenzando en muchos casos por la cromatina centromérica, y, en unos pocos cromosomas, extendiéndose por todos ellos a lo largo de los telómeros. Nada más podemos precisar sobre la tasa de incorporación ya que no se ha contado con un sistema de análisis que permita discriminarla (Figura 58, 59, 60, 61).

### 3.11.2 Células uninucleadas

El aspecto morfológico de las células



uninucleadas es el descrito en la introducción, sin que se haya detectado diferencias con respecto a las descripciones clásicas de Haushka (1953) o Stewart y col. (1959).

En cuanto al marcado de la célula uninucleada, se pueden encontrar células marcadas de todos los tamaños y relación N/C descritos, con diversa cantidad de marcas, según el caso (Figura 62).

Se han observado células vacuoladas, clásicamente interpretadas como elementos terminales, cuyo núcleo, en birrete, se encontraba marcado, con importante número de gránulos de plata reducida en el mismo, indicando su capacidad de síntesis, al menos en el momento de la administración de la timidina. No se ha determinado el contenido de la gran vacuola que presentan estas células. Sabemos que es cromófoba, PAS negativa y Feulgen negativa, aunque se adivina en su interior contenido de aspecto proteico (Figura 63, 64).

### 3.11.3 Células binucleadas

La mayoría de estas células presentan un aspecto característico, con los núcleos elípticos, separados por una estrecha banda citoplásmica con la zona de enfrentamiento rectilínea. Alguna vez se descubren uno o dos micronúcleos, difícilmente localizables por estar

enmascarados por la masa mayor de los núcleos principales.

No siempre los dos núcleos se encuentran independientes en la célula, sino que se han podido ver como unos finos filamentos de cromatina los unían. El filamento es otras veces más ancho, pero con un contenido más pobre en cromatina que los dos lóbulos que comunica. Por esta razón nos hemos sentido tentados a denominar a éstas células "de núcleo lobulado", más que como células binucleadas; ahora bien, insistimos que no en todos los casos se presentan dichos filamentos y que, la mayoría de las células son "de facto" binucleadas (Figura 65, 66).

Se han encontrado tanto células binucleadas marcadas con timidina, como otras que no lo están, pero en aquellas marcadas se marcan ambos nucleos con una intensidad similar (Figura 67, 68, 69).

#### 3.11.4 Elementos no tumorales

Cuatro son los tipos celulares no tumorales más abundantes que se pueden encontrar en el EAT: macrófagos, linfocitos, neutrófilos y células cebadas. Todos ellos presentes desde los primeros días de estudio.

Destacaremos en este apartado, sin insistir más en ello, la presencia de macrófagos formando grupos, durante los primeros días de implantación, y el marcado

de algunos linfocitos.

### 3.12 MODELO DE DIVISION

Se sugiere un modelo de división tumoral, en base a la observación del IM y considerando los datos que aporta la bibliografía.

En este apartado queremos exponer sucintamente el planteamiento y el resultado del modelo, que se pasó por alto en material y métodos para que su exposición favoreciese la comprensión del mismo.

Sabemos que la duración de la mitosis es la menor de todos los periodos del Ciclo celular. Los datos que se aportan son dispares y muchos autores no refieren la duración del tiempo M. No obstante sabemos que la duración máxima es de una hora, por lo que en un ciclo de 16 horas, representa 1/16 de la duración total. A esto hay que añadir el alargamiento que se produce con el tiempo en el Ciclo celular. Por lo tanto, hemos presentado un modelo computerizado que pondera, por una parte, que la probabilidad de encontrar una célula en mitosis en una población en ciclo, es proporcional a la duración de este periodo en el ciclo; por otra parte que las distintas poblaciones presentes en el tumor alargan su ciclo despues de cada mitosis, esto es: la duración del ciclo que comienza es mayor que el que finaliza.

Suponemos asimismo, que puede haber una población principal, por su número de elementos, que siga un ritmo de CC conjunto. También suponemos que esto no ocurra.

Para poder representar un ciclo celular que sólo es visible, y por lo tanto cuantificable morfológicamente durante el tiempo M, se ha recurrido a una función trigonométrica que sólo se hace positiva durante un intervalo (la duración de la mitosis) de entre la longitud total del intervalo  $2\pi$ . Asimismo, dicho intervalo va creciendo a medida que progresa la representación, con lo que se quiere significar el alargamiento del ciclo.

Dicha función es:

$$y = \frac{\sin^2(A \cdot K \cdot x)}{\sin^2(K \cdot x)}$$

siendo K: la duración del CC de una subpoblación dada.

A: la probabilidad de encontrar una mitosis perteneciente a la subpoblación K.

x: la variable tiempo.

Por lo tanto, y expresa la probabilidad de encontrar una división celular para un tiempo dado, conociendo la duración del ciclo de las poblaciones presentes y la proporción de dicha población frente al total.

Los resultados vienen representados en la figura 70. El modelo representa la resultante de 24 curvas

correspondientes a otras tantas subpoblaciones cuyos ciclos celulares tienen unas duraciones desde 14 a 20 horas, con desfase de 15 minutos.

Cada una de las 24 curvas representa idéntica probabilidad de encontrar una división celular por cada unidad de tiempo.

Por otro lado, hemos considerado oportuno ponderar la curva correspondiente a una duración de CC 18 horas por ser éste el tiempo medio aportado por los distintos autores (ver tabla I). Ello se ha conseguido haciendo que la probabilidad de encontrar una división celular en esta curva sea 5 veces mayor que en las restantes. Por lo tanto cada 18 horas se destacará un máximo correspondiente a esta subpoblación (Figura 70).

Si en vez de dibujar punto a punto la resultante de la suma de todas las curvas simples, representamos sólo los valores que adquiere cada 24 horas y 6 más tarde, comenzando el día 1, los resultados son los que aparecen en la figura 71. Nótese que existe una clara diferencia entre los valores de las curvas, aunque estos no sean idénticos a los datos experimentales (Figuras 20 y 21).

## **DISCUSSION**

## 4.1 PARAMETROS CONVENCIONALES

### 4.1.1 Pesos

#### 4.1.1.1 Peso de controles

La razón fundamental por la que se lleva a cabo un seguimiento del peso de los animales sanos antes de la inoculación, no es otra que comprobar su buen estado y la homogeneidad del grupo de estudio. Así pues, antes de cada experimento, durante la semana anterior, los animales se pesaron dos veces diarias.

Lo más destacable en la representación gráfica de este parámetro, es la alternancia de máximos y mínimos que se presenta a lo largo del seguimiento del peso. Ya se había observado con anterioridad este fenómeno, atribuyendo como causa del mismo el ritmo particular de alimentación-excreta de los mustélidos (Vives, 1984), con máxima actividad en las últimas horas del día y primeras de la mañana.

Pocas son las variaciones en la conducta cíclica

del peso en las condiciones de laboratorio ya que, incluso sometiendo a los animales a una dieta exclusiva de agua, no se observaron diferencias significativas en el peso, respecto al periodo en que recibieron comida abundante. No obstante, sí se produce una variación apreciable cuando los animales se someten a transporte, probablemente como consecuencia del efecto ansiogénico del mismo; en otras palabras, el incremento de actividad por encima de la media que vienen desarrollando en el laboratorio, causado por el "stress" del transporte, produce una disminución del peso, bien por una mayor excreta, bien como consecuencia de una mayor actividad.

Como se ha dicho anteriormente, el control de peso se realiza con la finalidad de comprobar la homogeneidad de los lotes, habiéndose encontrado estos óptimos para la experimentación, al no diferir en más del 5% en la media de peso en los animales con pesos extremos.

#### 4.1.1.2 Peso de portadores

El peso de los animales inoculados con tumor, se modifica por el crecimiento de este en la cavidad abdominal, de tal manera que la gráfica que representa esta medida tiene una marcada pendiente positiva.

Se observa, además, que el peso de los portadores



sigue las mismas pautas relativas a los ritmos de alimentación-excreta que vimos al hablar de los controles, aunque siendo más precisos deberíamos decir que el ritmo de alimentación-excreta no se ve enmascarado por el crecimiento del tumor.

La razón de efectuar este control es, fundamentalmente, comprobar que el prendimiento del tumor es correcto y las condiciones de crecimiento buenas. Pero además se realiza para asegurar la homogeneidad del grupo de animales.

Respecto a la elección del sexo de los animales, se tomaron hembras en todos los casos porque parece haber un crecimiento menor en machos que sobre individuos del otro sexo (Vincent y Nichols, 1967); por lo tanto, para evitar las posibles diferencias de crecimiento del tumor en portadores de distintos sexos, es por lo que siempre se tomaron aquellas.

La hora de comienzo en la experimentación atendió inicialmente a razones semejantes a las expuestas en el párrafo anterior: si los animales inoculados por la mañana (10 a.m.) viven más tiempo que los inoculados en el tránsito lumínico nocturno (7 p.m.) (Tsai et al., 1979), es obvio que para poder comparar los resultados de los distintos experimentos, se debía tener en cuenta la hora de toma de muestras. No es un azar la determinación de la hora de comienzo de la experimentación. La

existencia de un ritmo circadiano en el incremento de peso del ratón, demostrado por Tsai et al. (1979) y confirmado por Vives (1984), obliga a tener como variable acotada las horas del día de las tomas de muestra. Apoyando lo expuesto, se ha encontrado que algunas líneas del EAT, no todas, presentan ritmos circadianos en su crecimiento sobre el ratón (Romanov et al., 1980).

#### 4.1.1.3 Peso del tumor

El peso del tumor es el primer parámetro de crecimiento que tiene un importante significado en el control del mismo. Siendo el EAT un carcinoma ascítico, se podría pensar que es mucho más sencillo determinar el volumen y no el peso. Sin embargo en la práctica, la determinación del volumen tumoral ofrece serias dificultades debido a que la localización del carcinoma es, dentro de lo que cabe, difusa y en íntima relación con otros fluidos corporales. Además, obtener el volumen total de un cultivo joven de 24 horas, cuando el volumen inicial del inóculo es de 0.125 ml, es una labor casi imposible de abordar sin incurrir en errores mayores que la propia medida.

El método seguido por nosotros para la determinación del peso del tumor es muy simple y sujeto a pocas manipulaciones. En primer lugar, tras la extracción

de la cantidad necesaria para confeccionar los frotis y obtener la dilución para el cálculo de la densidad (lo que supone un volumen conocido y siempre el mismo), se lava la cavidad abdominal del ratón con suero salino y se obtiene el peso del tumor por diferencia de los pesos antes y después del lavado. En el caso de que la cantidad sea poco apreciable, se cuenta al menos con el tumor recolectado para la obtención de las muestras. El error de la medida es el debido al aparato, 0.1 g en todos los casos.

Las consideraciones expuestas más arriba, tienen especial significación hasta el cuarto día de crecimiento, ya que a partir de aquí el tumor crece rápidamente, llegando a duplicar su peso en tan sólo 24 horas.

De todos es conocido que el tumor está compuesto por células que se encuentran libres en un fluido aportado por el huésped; esto quiere decir que el incremento de peso se ha de deber al incremento del número de células y al aumento del fluido ascítico. Pero cabría preguntarse que proporción es debida a cada uno de los componentes fundamentales y que preponderancia tiene cada uno de ellos en lo que al crecimiento total se refiere. En otras palabras, cabría preguntarse cual es el componente responsable del rápido crecimiento en peso del tumor ascítico de Ehrlich.

Para responder a esta pregunta, debemos estudiar previamente la densidad del tumor, ya que este parámetro es el que relaciona el número de células presentes en una unidad de volumen.

#### 4.1.2 Densidad

La cavidad abdominal es el entorno ambiental de las células del EAT. En los tumores ascíticos, debido a su localización, no se puede producir una vascularización "de novo" como ocurre en la mayoría de formas sólidas. Los metabolitos nutritivos y el oxígeno llegan a las células disueltos en plasma ascítico. Esto nos puede hacer ver la importancia que reviste el aporte ascítico en el crecimiento tumoral. El contenido de oxígeno en la ascitis es más bajo que en los tejidos vecinos, lo que lleva a las células a vivir en condiciones próximas a la anaerobiosis (Kaz'min y Kolosov, 1979; Lazo y Sols, 1982).

El aporte de ascitis por parte del animal se ha considerado como una respuesta defensiva a la agresión; el mismo fenómeno se produce si se inocula tumor en cualquier otra cavidad serosa (Goldie y Felix, 1951; Klein, 1951; Yoshida, 1952; Hauschka, 1953) habiendo dejado paso el término original de "efusión tumoral" o de "células tumorales libres" al de "tumor ascítico". Por lo tanto, sería muy interesante conocer la pauta de aporte

ascítico en el tumor y, consiguientemente, la concentración de células en el mismo.

Se ha comprobado el efecto del aporte de ascitis por el huesped, siendo de deceleración del crecimiento tumoral (Fomina et al., 1979a). Este efecto se produce asimismo en otros tumores ascíticos (Rothbart et al., 1981).

Pero la inyección de fluido libre de células produce en el tumor procesos selectivos como la eliminación (muerte) de células con unas concretas características cromosómicas (Fomina et al., 1979a) o el retraso del crecimiento por sincronización de los ciclos celulares (Lala, 1972b).

Son dos los momentos en los que el aporte de ascitis es más importante: el tercer y quinto días (Vives, 1984). En nuestro caso, el primero aporte se produce entre el tercer y cuarto día y el segundo en el quinto día. La importancia del primer aporte de ascitis se refleja en las figuras correspondientes, en las que cambia la pendiente de la curva.

Es indudable que antes del primer aporte importante de líquido ascítico, se debe de producir una paulatina entrada de este en la cavidad abdominal, pues, de lo contrario, los valores de la densidad serían mucho más altos que los encontrados experimentalmente hasta este momento; el incremento de peso del tumor se debe

fundamentalmente al incremento del número de células; el incremento debido a la ascitis es pequeño en relación a aquellas, como se deduce al observar las figuras correspondientes: desde el primer aporte importante de líquido ascítico hasta el final de la experimentación, mientras que la densidad sufre importantes modificaciones, el crecimiento en peso es lineal. No se ha observado, por lo tanto, un aminoramiento del crecimiento del tumor. Esto se puede explicar fácilmente porque aunque la efusión de líquido pueda retrasar el crecimiento (Fomina et al., 1979a, Lala, 1972b; Rothbart et al., 1981), supone al mismo tiempo la entrada de oxígeno y metabolitos nutritivos, así como una dilución de los productos nocivos que se han ido concentrando en el medio. Además, el entorno libre disponible por célula aumenta, con lo que la competencia por los nutrientes disminuye.

Que el aporte de fluido ascítico es continuo pero en pequeña cantidad queda patente al estudiar la evolución de la densidad en el "screening"; la curva tiene la forma de una parábola con el mínimo en las 42 horas. El descenso en la densidad y la posterior recuperación parecen indicar cual sería la relación entre aporte de ascitis e incremento de peso debido a ella o la producción de células por división: el mayor valor en el peso se alcanza precisamente a las 42 horas, aunque es

probable que se pudiese deber este máximo a un error en la medida, estando el valor real muy por debajo, pero siendo siempre mayor que sus valores adyacentes. No obstante, la magnitud más alta es la medida en la hora 44, al final, cuando se ha producido la recuperación en la densidad, por lo tanto insistimos en que el aumento del peso debido a la ascitis es de menor significación que el debido a las células. Más adelante, al tratar de la mitosis, volveremos a plantear la relación de aporte de ascitis al crecimiento tumoral.

La fluctuación que se produce en la entrada de fluido durante periodos más cortos (en una hora, en la que se han tomado muestras cada 15 minutos) es variada y muy difícil de interpretar debido a que no se puede controlar si el primer punto en la gráfica es continuación de una bajada o de una subida en la densidad anterior; de otra manera, pensamos que el momento o momentos del día en los que se produce la entrada de líquido ascítico al tumor viene controlado por el ritmo de alimentación-excreta y por el momento en que se inóculo el tumor, de tal forma que dependería tanto de la edad del mismo como de la hora del día en que se realizan las muestras y el momento en el que se realizó la inoculación. Debido a estas condiciones, para un cultivo de cinco días (ya en la edad madura del crecimiento tumoral) y en el que la toma de muestras se realizó a las

doce horas, en mitad del periodo diurno, creemos que los aportes ascíticos son de mayor magnitud que los que se producen en los primeros días de implantación, por lo que tras la división de un grupo importante de células que aporta nuevos elementos, la entrada de ascitis va atenuando, a renglón seguido, la elevada densidad conseguida momentáneamente.



## 4.2 POBLACION MITOSICA

### 4.2.1 Sincronización inicial

Se ha demostrado que el ciclo celular se alarga con la edad en diversos tumores experimentales, como es el caso del sarcoma S-180 de ratón (Schiffer et al., 1973), el carcinoma ascítico NCTC 2472 de ratón (Frindel et al., 1969) y en EAT (Lala, 1972c, Woo et al., 1975), lo que visto desde la perspectiva de la reimplantación significa que, con cada reinoculación del tumor en el nuevo portador, los ciclos celulares se deben acortar.

¿Cuales son los factores de alargamiento (o acortamiento) del ciclo celular del EAT?. Se han apuntado diversas causas, unas propias del tumor y otras como resultado de la interacción de este con el huésped:

A) Propias del tumor. La alternancia de dos subpoblaciones presentes en el tumor caracterizables por sus cromosomas marcadores, una de las cuales predominaría los primeros días, siendo sustituida gradualmente por la otra (Fomina et al., 1978). El paso de un contingente de

células mitóticas a "resting cells" (células G) (Kaz'min y Sherban, 1980), deteniéndose en G0 por tiempo indefinido y caracterizables por la presencia en sus núcleos de una proteína específica.

B) Resultado de la interacción con el huésped. El aporte de fluido ascítico por parte del animal portador produce un retraso en la proliferación tumoral (Rothbarth et al., 1981), lo que se ha comprobado cuando se inyecta fluido libre de células de forma experimental (Lala 1972b, Fomina et al., 1979a). Además, la falta de metabolitos para la síntesis y la presencia de productos tóxicos en el fluido ascítico contribuirían al alargamiento de los ciclos celulares, estando en relación con la edad del cultivo (Lala 1972b).

Ahora bien, la manera de como esto influye en las células del EAT es todavía poco conocida. Se ha apuntado que el primer efecto detectable es una sincronización de las células tras el reimplante (Wiebel y Baserga, 1968) teniendo como causa, no la entrada de "resting cells" a ciclo, sino el retardo que se produciría en S y G2 (Lala y Patt, 1968). Pero aunque se produzca la sincronización de los CC de algunas de las poblaciones con cada reimplante, esto no explica el acortamiento, si no se produce, además, un predominio de aquellas poblaciones de ciclo corto tal y como lo describe Fomina et al., (1978). Si el alargamiento del CC se produce como resultado del

alargamiento de alguna de sus fases (o todas), tal y como ocurre en el sarcoma S-180 ascítico de ratón (Schiffer et al., 1973), el acortamiento tras el reimplante debe acortar en la misma proporción las fases del CC (Lala, 1972); esto último no contradice la opinión del grupo de Fomina de que sería la alternancia de poblaciones, con CC de duración característica para cada una de ellas, la causa principal del acortamiento del CC del tumor.

A todo esto se añade un problema y es que la forma de determinar el crecimiento y la proliferación tumoral es por medio del Índice de marcado y el Índice mitótico, ambos apoyados en la medida del número de mitosis presentes en el tumor en un momento dado. La duración de la mitosis es pequeña en relación a la duración del CC de tal manera que, en el mejor de los casos, supone tan solo 1/16 del CC total. Se entenderá fácilmente que el tratamiento de estos dos parámetros debe ser cauteloso.

#### 4.2.2 Índice Mitótico

Una gran diferencia se observa al estudiar el IM a largo plazo con una o dos tomas de muestras diarias: mientras que el IM de E1 crece durante el tiempo de estudio, sin grandes variaciones, los IM de E2 y E3 muestran una clara tendencia al descenso, con acusados

altibajos.

Las muestras matutinas de E2 y E3 son de mayor magnitud que las vespertinas hasta el cuarto día. Esto podría sugerir cierto ritmo divisional, circadiano o no, pero, como se observa en los gráficos, hay un momento que se invierte esta diferencia de magnitud; no se trata pues, de un ritmo circadiano, ya que la conducta del IM no es cíclica; además, sólo se conoce una línea de EAT que presenta este tipo de ritmo (Romanov y Stepanenko, 1980). El resto de tumores estudiados no lo presenta.

Sin embargo, el hecho de que los tumores estudiados se hayan implantado siempre por la mañana, que sea este momento cuando mayor es el IM y que se vaya amortiguando la diferencia de valores diarios, sugiere que el ritmo que presenta el EAT sea consecuencia de la duración característica del CC. Esto concuerda claramente con el alargamiento de ciclo ya apuntado.

Al estudiar el IM en experimentos cuya toma de muestras se realizó con diferencias muy cortas de tiempo (S1 y S2), se afianza más la idea del ritmo divisional como predominante en la curva del IM. Pero hay más: para que pueda producirse un máximo en el IM, el número de mitosis presentes debe ser mayor, proporcionalmente, a las presentes en el punto homólogo (misma hora) del día anterior.

Efectivamente, tras una división se produce un gran número de elementos, lo que supone un crecimiento en número de células en el tumor; si ahora se divide el mismo número de células que lo hizo anteriormente, el IM sería menor ya que se expresa como número de mitosis frente al total de elementos. Si se mantiene el valor del IM, sería razonable pensar que entraron en mitosis todas las células que se acababan de producir, esto es, las dos células hijas producto de la división anterior. De esta manera se mantendría un IM alto y constante durante cierto tiempo.

Una disminución del IM entre dos máximos consecutivos hace pensar en la existencia de un grupo de células, mayoritario, que alterna con otras células capaces de dividirse y que formarían la línea de fondo (background) del IM, es decir, el grupo principal produciría células por división que supondría un gran incremento de elementos, frente a la producción de células por parte del resto.

Si el grupo principal presenta alguna sincronía, se podría explicar por que son mayores los valores más tempranos del IM. Con el tiempo se produciría el desfase de algunos ciclos, saliendo por lo tanto del conjunto principal y haciendo que este disminuya en número.

Si se observa con detalle el IM de S1, se ve lo que antes apuntábamos de los grupos de células en

división. Para que se produzca un descenso a las 42 horas, ha debido tener lugar un incremento en el número de células presentes (producto de la división anterior) y un descenso proporcional del número de mitosis. Análogamente, para que el IM se mantenga tan alto durante las horas 40 y 41, cuando, de seguro, el número de células totales es mayor, el número de mitosis en este momento debe superar con creces al que se produjo una hora antes.

En resumen, parece claro que exista más de un grupo de células, cada uno con una duración de CC característica, que produzcan nuevas células en forma discreta, en oleadas, con un número de elementos por grupo variable. Uno o más de estos grupos sería mayoritario (con mayor cantidad de células) sobresaliendo su ritmo mitótico sobre el resto, que quedaría formando un nivel de fondo de mitosis.

#### 4.2.3 Modelos de crecimiento y división

Considerando una población celular homogénea, el IM indica la relación de células del compartimento proliferativo o mitótico (M) frente al no mitótico o quiescente (Q). En dicha población, una disminución del IM puede ocurrir por varias causas: 1) que algunas de las células resultantes de la división del compartimento M

pasen al compartimento Q, con lo que la relación M/Q disminuye; 2) que el compartimento M disminuya por muerte de sus elementos; 3) que toda la población de células mitóticas produzca células del compartimento Q.

Sin embargo, en cultivos heterogéneos, con más de una población celular, la fluctuación del IM puede deberse a más de una causa y no necesariamente a la modificación de la relación M/Q. Efectivamente, basta suponer un desfase divisional en las poblaciones presentes para que el IM se presente en altibajos; suponer, así mismo, la presencia de una población principal, mayoritaria en el número de divisiones, frente a un conjunto de poblaciones con menor número de elementos por población que la principal y con diferentes ritmos mitóticos, conduce a la manifestación de altibajos en el IM; incluso un ritmo circadiano divisional daría como resultado una fluctuación del IM.

Tanto la disminución del IM como la presencia de máximos y mínimos alternados en este parámetro, se manifiestan en el EAT. No obstante, la presencia de células Q parece ser muy baja en el tumor, habiéndose estimado el factor de crecimiento para el EAT entre 0.9 y 1 en los primeros días de implantación (Tannock, 1969; Frindel et al., 1969), por lo que se puede descartar la relación M/Q como responsable de la variación del IM.

No se ha podido demostrar una influencia

circadiana en todos los tumores de Ehrlich estudiados (Romanov et al., 1980), aunque es posible que esta influencia se ejerza sobre el tumor por otros parámetros que si presentan dicho ritmo (Tsai et al., 1979).

Por lo tanto, y como ya se ha visto al hablar de la sincronización de las células tumorales, la fluctuación del IM en altibajos puede deberse fundamentalmente a la presencia en el tumor de diversas poblaciones cuyo predominio y alternancia sería la causa de dichas variaciones (Fomina et al., 1978).

Es difícil demostrar evidencias de los distintos grupos de división, basándose sólo en los resultados del IM. Para ello habríamos de recurrir al estudio "in vitro" del tumor, con lo que se eliminaría uno de los factores primordiales en el EAT: la relación con el portador y las condiciones naturales del mismo.

Ahora bien, por otros dos caminos se puede abordar la presencia de subpoblaciones en el tumor: 1) Planteando un modelo teórico que recoja todos los supuestos expuestos más arriba y desarrollando un sistema de simulación del mismo. 2) La exposición del tumor a precursor marcado, como la Timidina tritiada, que nos permita seguir las tasas de marcado de una población mitótica determinada. Este segundo camino se discutirá más adelante.

De la duración total del CC sólo una pequeña



parte corresponde al tiempo de mitosis (TM). Si pudiéramos obtener para cada célula de cada población la curva del IM, observaríamos que esta adquiriría valores nulos en el periodo de interfase y 1 en TM.

Si todas las células de una misma población actúan de igual manera y sincrónicas, sus curvas coincidirán superponiéndose, de modo que podremos tomar una única célula como representante de la población. Al utilizar una función continua, el paso de interfase a mitosis o viceversa no se realiza de un modo brusco sino gradual, por lo que se genera un máximo en TM semejando una gaussiana, situación que nos viene bien para hacer extensible la gráfica a una población real en la que las células entran en mitosis o salen de ella casi al mismo tiempo, pero no exactamente.

El primer modelo propuesto, con 24 poblaciones que poseen la misma probabilidad de encontrar una mitosis perteneciente a una de ellas, quiere indicar que el número de poblaciones es grande pero finito, que participan en igual proporción en la producción de células. De este modo, la fluctuación de la resultante dependerá de la superposición de dos o más poblaciones, con probabilidad aditiva en sus TM. Cuando el número de curvas que coincidan en un punto sea mayor, se presentará un pico más alto que los vecinos. Esta situación de un fondo de mitosis (background) entre el que destaca de

cuando en cuando un pico se puede observar en todos los IM calculados, es decir, el IM nunca se hace cero, lo que significa que siempre se pueden encontrar células en mitosis en cualquier momento.

Lo dicho es extensible al segundo modelo en el que ha ponderado una de las poblaciones, haciendo que la probabilidad de encontrar sus TM sea 5 veces más alta que en el resto de las curvas. Una única diferencia se aprecia en este caso y es que ciertos puntos presentan mayor valor que lo que correspondería a la adición de curvas simples en las que coincidiesen sus TM, con algún punto en el que los dos valores contiguos no difieren grandemente, por ser los correspondientes a la curva ponderada y a la confluencia de las curvas de varias poblaciones.

Las razones que nos llevaron a elegir 24 curvas representativas de otras tantas poblaciones, con 15 minutos de desfase, que los ciclos celulares estuvieran entre 14 y 20 horas y que la sincronización del cultivo ocurriese exactamente en el momento del inóculo, fueron precisamente las expuestas al referirnos a la sincronización inicial. Debido a la disparidad de datos respecto a la duración del CC (Tabla I), pensamos que se debían de abarcar todos los tiempos de ciclo citados, por lo menos en los primeros días de implantación, procurando que el tiempo medio -17 horas- fuese aproximadamente el

central en el modelo. Se tomó como desfase 15 minutos, por ser este el tiempo mínimo de la mitosis medido para el tumor. El número de curvas debía de ser grande ya que, siendo la función nula en la mayoría del intervalo de representación, se podría obtener algún valor igual a cero, cosa que no ocurre experimentalmente; como el desfase se estimó de 15 minutos, entre 14 y 20 horas de CC caben 24 curvas. Por último, el momento de la sincronización se tomó en el día cero por la facilidad de cálculo y por las opiniones de Wiebel y Baserga (1968).

Otros modelos semejantes se han propuesto tanto para el EAT como para otros tumores, estudiando algunas veces los parámetros de crecimiento (Dethlefsen et al., 1968), tanto en formas sólidas como ascíticas (Tannock, 1969), como considerando la pérdida celular y el paso al compartimento Q de las células (Steel, 1967; Roti Roti y Okada, 1972; Kim y Woo, 1974; Bronk, 1979). El objeto de todos ellos, así como el nuestro, no es otro que ayudarnos a comprender unos fenómenos temporales tan complejos como son el alargamiento del CC de algunas células, la entrada sincrónica en mitosis de grupos de ellas o la salida del compartimento mitótico por muerte o por entrada a otros compartimentos como el Q.

#### 4.2.4 Modelos de muestreo.

Los protocolos seguidos en el presente trabajo recogen los planteamientos anteriormente expuestos en relación con los modelos teóricos de crecimiento. Se ha seguido tres diferentes tipos de muestreo: Toma de muestras simple diaria, la forma más sencilla de muestreo, que refleja el crecimiento global del cultivo. Toma de muestras doble diaria, una a las 8 a.m. y otra a las 2 p.m., siempre con 6 horas de diferencia entre las tomas del mismo día y 24 horas entre las tomas correspondientes del día siguiente; las muestras que tienen por diferencia 6 horas, permiten seguir el ritmo de división de dos grupos de células con ciclos celulares de diferente duración, ya que la diferencia mínima de dos ciclos es de 8 horas en el día primero (Lala,1972), de tal manera que las mitosis encontradas en un mismo día (8 am y 2 pm) no pertenecen a la misma población. Toma de muestras con intervalos muy cortos (1 hora), utilizada para la determinación del Índice de marcado tras la aplicación de Timidina tritiada: determina la duración del ciclo celular y la presencia de distintas poblaciones tumorales.

Como se ha explicado, cada uno de los modelos de muestreo tiene una aplicación básica específica y su estudio aporta datos distintos y complementarios.

La determinación del IM en los casos con toma de muestras simples diarias presenta un ritmo mitótico descendente, tendiendo a la estabilización, y con pocas fluctuaciones en el conjunto: se diría que el cultivo disminuye su ritmo mitótico tempranamente. Ahora bien, cuando se toman dos muestras diarias se aprecia claramente como el IM, aunque también tendiendo a la estabilidad, presenta puntos en los que su magnitud alcanza valores muy por encima de los encontrados en el caso anterior. Lo más notable es que las muestras vespertinas son más altas que las matutinas del mismo día, como si se tratase de distintos grupos de células, cada una con un ritmo mitótico propio, mayor en el caso del grupo vespertino. La explicación a este fenómeno se puede encontrar considerando por una parte la sincronización que se produce con cada implante (Wiebel y Baserga, 1968, Lala 1972) y la desincronización que se va produciendo con el tiempo.

#### 4.2.5 Marcado autorradiográfico.

Como ya se ha expuesto más arriba, la sincronización que sufren las células del EAT tras un nuevo implante puede deberse a varias causas, entre otras el "stress" (Wiebel y Baserga 1968; Kalisnik et al. 1979) y/o la respuesta inmune del animal portador (Lala 1974;

Levan y Levan 1980).

Analizando diversos parámetros de crecimiento, entre ellos el Índice Mitótico, se pone de manifiesto dicha sincronización (Pertusa et al. 1982, 1984), de tal manera que, suponiendo un modelo de crecimiento con sincronía inicial, los valores máximos del Índice Mitótico corresponderán al momento en que cierto número de células coinciden en sus ritmos mitóticos.

Estudiando el IM y el LI tras la aplicación de un pulso de Timidina tritiada, creemos que se pone de manifiesto alguna de las poblaciones presentes en el EAT, así como el estado de sincronía, ya que aparecerán marcadas las mitosis de aquellas células que se encontraban en S en el momento de la administración del precursor radioactivo; si aparecen en el mismo momento del estudio del IM células no marcadas, se trata indudablemente de células con duración de CC distinta, ya que estando en un mismo momento en mitosis no estaban a la vez en síntesis de ADN.

El IM es una medida relativa que expresa el potencial de división del cultivo en un momento dado. Es relativa puesto que representa la proporción de mitosis frente al total de elementos del tumor. Es asimismo dinámica debido a que alcanza su mayor sentido cuando se expresa en relación al tiempo. Cualquier variación del IM a lo largo del tiempo de experimentación, da información

muy importante sobre la dinámica de dicho cultivo. Estas variaciones son medidas de la probabilidad de encontrar determinado número de células en división en un momento dado.

Con tiempos de estudio más largos se observa la tendencia a la disminución del IM, produciéndose así mismo una estabilización en las diferencias de magnitud (Wiebel y Baserga 1968; Frindel et al. 1969; Schiffer et al. 1973; Dombernowsky et al. 1973; Pertusa et al. 1984). No obstante se pueden muestrear puntos en los que el IM se manifiesta con un máximo, rompiendo la tónica de descenso general, lo que se ha interpretado (Pertusa et al. 1984) como un momento en el que coinciden los ritmos mitóticos de diversos grupos de células, dando lugar al mencionado máximo de los valores del IM.

Estudiando el IM en el segundo día de crecimiento del tumor, se observa que este varía en el transcurso del tiempo de muestreo. Una disminución del IM significará que el número de mitosis presentes en el cultivo ha disminuido respecto al total de elementos celulares. Este descenso indica que no han entrado nuevas células en mitosis en número proporcional a las producidas en la mitosis anterior, ya que el mantenimiento del IM en una población con mayor número de elementos totales significa un aumento del número de mitosis, en valores absolutos, proporcional al aumento del número total de células del

tumor.

Sin embargo, el recuento de mitosis para la determinación del IM es un proceso con base cuantitativa y morfológica que no puede aportar "per se" datos cualitativos sobre la naturaleza de las células que se encuentran en división. Por ello es conveniente preguntarse si nos encontramos frente a un cultivo cuyas células son semejantes desde el punto de vista cinético, es decir, si todas ellas siguen un ciclo celular de duración similar, o no, puesto que variaciones en la duración del ciclo celular se pondrán de manifiesto a lo largo del tiempo, dando oleadas mitóticas no sincrónicas, separadas entre sí tanto como se separen las duraciones de los ciclos correspondientes. Los distintos IM de cada población celular con una duración de ciclo diferente, pueden dar una suma total que presenta variaciones tanto más importantes cuanto mayor sea la coincidencia de duración de los ciclos.

Así pues, el IM que obtenemos no será sino el IM medio de todas las posibles poblaciones celulares con distintas duraciones de ciclo.

Con el fin de determinar la posible existencia de diferentes poblaciones celulares con longitudes de ciclo distintas, hemos realizado un marcado autorradiográfico con Timidina tritiada, apoyándonos en los datos de otros autores que indican una sincronización parcial tras el



implante (Wiebel y Baserga, 1968; Lala y Patt, 1968). Esa sincronía sólo se puede detectar durante el primer ciclo celular de las células tumorales recién transplantadas, puesto que cuando comienza el segundo ciclo, cada célula lo realizará a partir de la duración característica de la población a la que pertenece.

El primer dato, obtenido a las 16 horas de la inyección de la Timidina tritiada, arroja un 25% de mitosis marcadas. Existe pues un 75% de células en mitosis que no estaban en S 16 horas antes. Se deduce la presencia de dos poblaciones celulares con diferente longitud de ciclo ya que, estando a la vez en mitosis, no habían estado simultáneamente en síntesis.

Una hora después, casi la totalidad de las mitosis están marcadas, por lo que se deduce que todas ellas estaban en síntesis 17 horas antes de esta toma.

La toma de muestras de las 18 horas presenta un decremento del IM que se debe por completo a la caída del número de mitosis marcadas, ya que las mitosis no marcadas no modifican su número en este punto de muestreo.

A las 19 horas el número de mitosis marcadas sigue disminuyendo hasta alcanzar un mínimo. Parece claro que la oleada mitótica ha concluido por completo. Sin embargo, el aumento del IM indica la presencia de otra población diferente a la marcada, que entra en mitosis en

ese momento. La diferencia de los IM de las dos poblaciones es muy notable a favor de las no marcadas. Estamos en una oleada mitótica de la población no marcada, ya que la marcada está en su segundo mínimo.

La última toma, correspondiente a las 20 horas, muestra el declive del número total de mitosis, con un ligero aumento de las mitosis marcadas. La fuerte caída del número de mitosis no marcadas es la responsable del descenso del IM general.

La sincronización pues, afecta a un grupo de células dejando intacto a otro grupo importante que forma una población, o quizás más de una, con una duración del ciclo celular diferente a la de la otra.

Existe gran discrepancia, en lo que a la duración del ciclo celular se refiere, en la bibliografía consultada (ver tabla I). No obstante ya se ha apuntado más arriba la coincidencia de muchos en lo que al alargamiento del ciclo celular se refiere. Nosotros pensamos que este alargamiento debe ser el resultado de la desincronización que se produce ya en la segunda generación celular por lo que, teniendo en cuenta el desfase ocasionado, sólo debería hablarse de duración media del CC.

Cuando el tumor envejece, además de estos fenómenos de desincronización, se sumarían como factores de alargamiento la supresión de la síntesis del ADN por

inhibidores difusibles liberados por las propias células (Rothbarth et al., 1981, Tong y Chen, 1979), la menor disponibilidad de energía, la competencia por nutrientes (Lala 1972), entre otros.

Podríamos poner como alternativa que las células no se encuentren sincronizadas en absoluto, lo que está en desacuerdo con los datos experimentales, ya que en este caso se debería encontrar muy poca variación en el IM a lo largo del tiempo, siendo así igual la probabilidad de encontrar una célula en mitosis en todos los momentos de muestreo.

Podemos hablar en definitiva, de sincronización de grupos de células en los primeros días de implantación, claramente separables exclusivamente durante cortos periodos de tiempo.

Tras la aplicación de un pulso de Timidina tritiada 24 horas después de la inoculación del tumor y realizando la toma de muestras cada hora, se observa que desde el primer muestreo al segundo, el índice de marcado pasa del 25% al 90.6%, volviendo a descender éste dos horas más tarde al 40%.

Estos resultados indican la presencia de una población altamente sincrónica, responsable de un índice de marcado tan acusado.

## 4.3 CELULAS BINUCLEADAS

### 4.3.1 Binucleadas como un parámetro de crecimiento.

Cuando emprendimos la tarea de caracterizar la población de células gigantes del tumor, tropezamos de lleno con el problema de los criterios de selección. En aquel momento, no teníamos completamente desarrollada la técnica estereológica, ni se habían procesado las muestras para tal fin. No disponíamos del equipo básico para realizar la citofotometría. Siendo insuficiente a todas luces el criterio del observador y comprendiendo la dificultad que entrañaba poner a punto una técnica para evaluar aquellos elementos, optamos por buscar otro parámetro que expresase adecuadamente el número de células de mayor tamaño.

Nos habíamos percatado, en el estudio microscópico, de que muchas de las células de mayor tamaño presentaban dos o más núcleos, de manera que quisimos ver en el carácter "numero de núcleos", un buen índice para evaluar estos elementos.

El parámetro no resultó todo lo indicativo que hubiesemos querido en cuanto a la población de células gigantes, sin embargo, estudiando detalladamente las células que tenían dos o más núcleos, rápidamente observamos que eran un componente habitual en el tumor. Esto nos sugirió el evaluar este elemento celular, la célula binucleada, e intentar averiguar tanto su origen como el significado de la misma. Además, aunque la bibliografía no era muy pródiga en referencias a las células binucleadas en el EAT, encontramos relacionada su producción con circunstancias tan especiales como la acción de macrófagos activados sobre las células del EAT (Connolly, 1982). Inmediatamente nos propusimos averiguar si en el tumor de Ehrlich se producían células binucleadas como resultado del tratamiento con análogos de base como el 5-Fluorouracilo, que sí lo hacía en otros tejidos como el meristemo radical de "Vicia faba" (Berger y Witkus, 1962) y la médula ósea humana (Brennan et al., 1960).

Encontramos que dependiendo del daño causado por la dosis, se observaba un número de células binucleadas cada vez mayor (Pellicer et al., 1984).

Ahora bien, la célula binucleada se produce espontáneamente en el tumor. Si como resultado del tratamiento con el 5-Fluorouracilo se potenciaba su número, cabría suponer que el mecanismo de producción de

aquellas no estaría más que potenciado con el tratamiento, con lo que esto supondría una pista en su posible origen. Por lo tanto, decidimos evaluar el número de células binucleadas apoyándonos en tres razones fundamentales:

1.- El carácter morfológico de la binucleación no permite la subjetividad del observador, ya que el número de núcleos es un carácter puramente objetivo.

2.- Podíamos considerar el número de binucleadas como representativo de la población de mayor tamaño, o un paso hacia él, ya que muchas de ellas presentaban un tamaño superior al resto de los elementos mononucleados.

3.- Si aumentaba el número de binucleadas bajo distintas condiciones, necesitábamos conocer el patrón de evolución espontánea perfectamente, así como estudiar su posible origen en el tumor intratado.

Aprovechando el recuento del IM, se introdujo un nuevo apartado junto a los de profase, metafase, anafase y telofase: células binucleadas.

#### 4.3.2 Morfología

Como el resto de los elementos del tumor, la célula binucleada presenta un citoplasma basófilo escaso, más intensamente teñido en la periferia que en la zona perinuclear, de aspecto granular.

La cromatina es densa, hipercromática y repartida homogéneamente por toda la superficie nuclear.

Como se ve, sus características no difieren en absoluto de la célula mononucleada más abundante en el tumor, diferenciándose de ella por su característica de presentar dos núcleos dispuestos generalmente como un grano de café. Un carácter distintivo de estos elementos es la presencia de una estrecha banda citoplásmica clara que separa ambos nucleos, coincidiendo con el diámetro mayor.

El carácter diferencial más significativo y además de más difícil comprensión es la conexión que en algunos casos se ha observado entre los dos núcleos de estas células. Sería sencillo relacionarlo con aquellas mitosis (anafases y telofases) en las que se observaban algunos cromosomas estirados, dispuestos entre las dos estrellas hijas. No es prueba suficiente la morfología para relacionar ambos fenómenos, pero entre los posibles orígenes, como ya se apuntó en el apartado correspondiente de la introducción, está el de la división incompleta. En otros casos se ha observado la presencia de micronúcleos junto a dos núcleos grandes de tamaño semejante; posiblemente sean aquellos el resultado de los cromosomas retardados que, situados fuera de las placas en el reparto, quedan separados del conjunto cromosómico principal y, llegado el momento de la

reorganización de los cromosomas, sufran un proceso de reorganización independiente del principal.

Queremos insistir en la conexión de algunos núcleos por un fino filamento de cromatina, que les da un aspecto de células con núcleo lobulado, semejante a los núcleos de los leucocitos polinucleares, aunque con distinta significación funcional.

#### 4.3.3 Índice de células binucleadas

La célula binucleada es un elemento del EAT que se encuentra presente desde los primeros días de crecimiento en el ratón. Su número aumenta constantemente durante todo el tiempo de estudio.

Nos hemos preguntado con frecuencia que ocurre con estas células para que tras el trasplante del tumor en un nuevo ratón, descienda su proporción (el ICB) siendo así que su número es alto en el tumor donante, y de nuevo vuelva a crecer hasta alcanzar valores significativos al séptimo día.

Este proceso de disminución del ICB se repite con cada reimplante (las series E1, E2 y E3 son consecutivas temporalmente) y, aunque el pase donante contenga un 15% de células binucleadas, el pase de estudio presenta en el primer día un ICB entre el 3 y 5%. Este hecho es de una



notable importancia en relación a esclarecer el origen de las CB en el tumor.

Las condiciones del medio se modifican con el tiempo en la cavidad abdominal del ratón, por la concentración de metabolitos de desecho (Lala et al., 1978; Tong y Chen, 1978), la falta de oxígeno (Lazo y Sols, 1980) y el aporte de ascitis (Rothbart et al., 1981) entre otras causas. Tras la reinoculación, las células comienzan la división libres de la presión del antiguo medio, lo que se manifiesta en que el IM de los primeros días es el más alto. En consecuencia, se produce un gran número de nuevos elementos. Aunque la tasa de producción de CB fuese constante, la gran producción de nuevas células haría disminuir el ICB.

Se comprende fácilmente la disminución si, además suponemos un origen mitótico de la célula binucleada. De producirse por otra causa (la fusión de células por ejemplo) la variación del ICB no mantendría ninguna relación con la producción de células por mitosis. De otro modo, considerando la célula binucleada como una mitosis incompleta o abortada, su presencia estará relacionada directamente con la producción de mitosis normales en el tumor.

Cuando se trata el EAT con 5-Fluorouracilo, el número de CB aumenta proporcionalmente a la dosis empleada de tal manera que es tanto mayor su número y se

alcanza más rápidamente el máximo, cuanto mayor es la dosis (Pellicer et al., 1984); pero también depende el número final de binucleadas obtenidas tras el tratamiento con 5-Fluorouracilo de la edad del tumor tratado (Pellicer et al., 1984).

De acuerdo con esta hipótesis, otros cultivos "in vitro" (Sutou, 1981; Ben-Ze'ev y Raz, 1981; Ghosh y Paweletz, 1984) y algunos tejidos, como el hígado, bajo diversas circunstancias como lesión o toxicidad, produce células binucleadas después de una kariocinesis sin citocinesis (Digernes y Bolund, 1979; Brasch, 1980; Bohm y Noltemeyer, 1981; Severin et al., 1984a; Severin et al., 1984).

Las condiciones de alta síntesis mitótica o la presencia de sustancias que retrasan la mitosis, concurren precisamente en el tumor. La velocidad de síntesis de ADN es alta en el tumor, lo que puede llevar a anomalías en el reparto que acabe en la binucleación; a partir del cuarto día se produce un importante aporte de ascitis, acentuándose el ambiente tumoral arriba apuntado.

Todas estas consideraciones nos llevan a pensar en un origen mitótico de la CB: las mitosis abortadas.

Analizando los resultados de las experiencias S1 y S2, la idea se afianza más, ya que, en ambos casos, el rango del ICB coincide con el encontrado para esos días

en los experimentos a largo plazo. Además, en estos tiempos de estudio tan cortos, el ICB presenta pocas diferencias de magnitud.

En S1 disminuye el ICB cuando lo hace el IM, después de haberse producido un número de mitosis importante en la hora anterior. En S2, conforme progresa la mitosis, disminuyendo, crece el número de binucleadas, seguramente como consecuencia de las posibles mitosis abortadas que pasan a binucleadas; el tumor de S2 tiene 5 días, por lo que ni el IM ni el ICB presentan grandes variaciones.

Como se vió en el apartado correspondiente en el capítulo de resultados, las células binucleadas presentan un tamaño diverso, encontrándose tanto elementos de pequeño y mediano tamaño, como células binucleadas mayores que las células mononucleadas mas grandes, lo que está en consonancia con la hipótesis de producción propuesta, al menos para las células de mediano tamaño, ya que la célula normal del tumor capaz de dividirse oscila entre esos límites.

Finalmente plantearemos otros hechos que apuntan en esa dirección: los filamentos de conexión entre los núcleos, la formación de gemaciones nucleares en algunas células no cláramente binucleadas y los micronúcleos. Se pueden relacionar correspondientemente con las anafases y telofases con cromosomas estirados, con la presencia de

anafases con placas de distinto tamaño y con las metafases con cromosomas no orientados en la placa.

#### 4.3.4 Marcado autorradiográfico

Se ha encontrado células binucleadas marcadas desde la primera hora de toma de muestras, lo que indica la capacidad de síntesis de ADN de la célula origen de éstas, es decir, 16 horas antes, se encontraban en fase S.

El número de células binucleadas marcadas (CBM) es relativamente constante a lo largo del tiempo de estudio, con una importante salvedad: a las 17 horas de la administración del precursor radioactivo, el número de binucleadas es menor. Esto supone que se han producido otras células binucleadas no marcadas, que ocasionan el descenso del número de las anteriores, lo que, unido a la constancia del ICBM, nos lleva a pensar en una producción constante y acumulativa de estas células. Hay que añadir, con el fin de aclarar este punto, que el ICBM expresa el porcentaje de CBM frente al total de CB presentes en el tumor en un momento dado; por lo tanto, la variación en la proporción de marcadas y no marcadas refleja la variación de la población de CB y no su proporción al resto de elementos. Por lo tanto, la única variación del ICBM se deba al cambio en la proporción de éstos.

Morfológicamente, el marcado en las CB se produce en ambos núcleos en, aproximadamente, la misma proporción. No se ha encontrado ninguna célula binucleada que solo tuviese uno de los núcleos marcados, de tal manera que debemos descartar otro origen que no sea la formación de binucleadas por la vía del ciclo celular. Efectivamente, si la proporción de células marcadas y no marcadas es de 7:3, si se produjesen células binucleadas por fusión, cabría esperar que algunas de ellas, provenientes de la fusión de células mononucleadas marcadas y no marcadas, presentasen uno de sus núcleos no marcado, o al menos, con marcado irregular en ambos, lo que no se observa en ningún caso.

Sin embargo, siempre se ha encontrado células binucleadas en las que el marcado era semejante en ambos núcleos.

El hecho de que se mantenga la proporción de CBM relativamente constante durante todo el tiempo de estudio, está de acuerdo con el supuesto de que la producción de estos elementos es pequeña frente al total de células presentes en los primeros días de implantación. Esto sugiere, además, que las CBM se han producido todas a la vez tras la aplicación de la Timidina o que las CB la han incorporado porque son células en ciclo y se encontraban en S en el momento de la administración, igualmente que el resto de elementos

mitóticos mononucleados del tumor.

Es difícil precisar cual de las dos vias se produce porque, una vez marcada la célula binucleada, no se distinguen unas de otras. Pero dos datos distintos pueden aclarar el origen del marcado de las CB: 1) Se ha descrito la viabilidad de las mitosis tripolares que producen como producto de su división, una célula binucleada y otra mononucleada (Roberts y Cole, 1970), aunque la frecuencia de este tipo de mitosis es muy baja como para explicar el total de elementos marcados. 2) Se ha observado células binucleadas con sus cromosomas espiralizados, como entrando en profase, lo que indicaría la viabilidad de esta célula y su pertenencia al compartimento proliferativo. Además, es característica la presencia de mitosis de gran tamaño, en las que se aprecia un elevado número de cromosomas, provenientes de células con una dotación cromosómica múltiplo de la modal del tumor.

Que la mitad de las células binucleadas aparezcan marcadas 16 horas después de la administración del precursor marcado apunta hacia un origen de la CB en las mitosis abortadas, ya que de ser su origen la formación de heterocariones (Connolly, 1982) o la fusión de células mononucleadas, daría como resultado núcleos con distinto marcado y, sobre todo, una frecuencia de CBM mucho menor que la encontrada.

El marcado de la célula binucleada interesa a ambos núcleos, aunque no en todos los casos con la misma intensidad; las marcas están claramente delimitadas en ambos indicando claramente su origen sintético, es decir, las células binucleadas encontradas tienen todas una elevada marca desde la primera hora de muestreo.

#### 4.4 VARIACION EN LOS DIAMETROS Y RELACION N/C

##### 4.4.1 Los diámetros celulares y la N/C como parámetros de crecimiento

El único fenómeno visible en todo el ciclo celular es la mitosis, siendo el resto de los tiempos irreconocibles e indiferenciables bajo el microscopio. Sin embargo, los fenómenos de síntesis premitótica que acontecen en la célula producen en esta el incremento de tamaño. De todos es conocido el redondeamiento que se produce en la célula poco antes de entrar en profase; asimismo, la duplicación del ADN hace que la célula incremente el tamaño de su núcleo tanto en masa como en volumen. Es por esto que se abordó el estudio de las variaciones de diámetro celular, esperando que se produjesen diferencias apreciables durante el tiempo de estudio del EAT tras la aplicación de la timidina tritiada, y comparar aquellas con los parámetros LI y IMT, con el fin de determinar un sencillo método de evaluación de la actividad sintética, no observable



morfológicamente.

Se ha estudiado con anterioridad el tamaño celular en relación a la fase de ciclo, lo que ha abordado por métodos muy diversos como gradientes de densidad en sacarosa (Horakova et al., 1975; Rothbart et al, 1981; Sungurov et al, 1983), columnas de Ficoll (Lepoint, 1975, Lepoint y Goessens, 1982), contadores de partículas capaces de discriminar el diámetro (Peel y Fletcher, 1969) o con medida directa con un micrómetro ocular calibrado (Andersson y Agrell, 1972). En nuestro caso se ha seguido el último método apuntado pero, a diferencia de Andersson, la medida se efectúa sobre una extensión de células del tumor, y no sobre gota pendiente, como en su caso.

El hecho de realizar las medidas de diámetros sobre frotis parece añadir un factor de error: el aplastamiento sobre el portaobjetos. Si bien se puede tratar como inconveniente a la hora de referirnos a tamaños reales de las células, no lo es en cuanto a la obtención de un parámetro válido para el cálculo de la relación N/C y el estudio de la variación del mismo. Aun así, se puede obtener fácilmente un factor de deformación por extensión aplicable a los resultados obtenidos. Además, la extensión de células tumorales no se realiza aplastando las mismas contra la superficie de la laminilla de vidrio, sino arrastrando una gota de líquido

ascítico tumoral, con lo que las células van quedando extendidas sobre el portaobjetos, por su propia adhesión al sustrato. No cabe, pues, hablar de presión homogénea en la confección de los frotis, aunque, de todas maneras, se ha procurado en todo momento realizar las extensiones bajo condiciones semejantes.

El estudio de los tamaños celulares se realiza mediante un modelo de seguimiento a lo largo del tiempo, tomando muestras en días sucesivos, día tras día (Andersson y Agrell, 1972; Sungurov et al., 1983), de modo discontinuo (Peel y Fletcher, 1969) o siguiendo un modelo de toma única en un día determinado (Horakova et al., 1975; Lepoint, 1975). Nosotros hemos seguido un procedimiento de muestreo repetido con una hora de diferencia entre dos puntos consecutivos, con el fin de comprobar la relación a ciclo del tamaño celular, o más exactamente, con el fin de seguir la población mitótica principal del momento, a través de sus variaciones en los diámetros nuclear y citoplásmico y la relación N/C.

En cuanto a las diferencias de tamaño esperables en una célula a lo largo de un ciclo celular, pensamos que siguen siendo válidos los supuestos explicados por Vives (1984) en relación a este mismo problema y que replantearemos aquí.

La relación N/C se considera una característica específica de cada tipo celular. Se habla de ella como

indicativo de su actividad metabólica, de su capacidad de síntesis o duplicación, de tal manera que se consideran células blásticas aquellas cuya relación N/C sea alta; por otra parte, una célula de tamaño mediano o grande, con un núcleo pequeño (baja relación N/C) se la considera diferenciada. Las células del EAT pertenecen al primer grupo, con elevada relación N/C, lo cual se corresponde con su elevada tasa de mitosis.

Pero una célula que acaba de concluir su división y otra que esta pronta a iniciarla difieren notablemente de tamaño: la primera porque aun ha de crecer hasta alcanzar el tamaño propio de su clase, la otra porque tras la duplicación del ADN y la síntesis preparatoria para la división, es mayor que las células que no han comenzado la fase S. Entre un extremo y otro, se pueden dar todos los tamaños intermedios, según el número de células que acaben de concluir la mitosis o las que estén prontas a comenzarla.

Ya se ha hablado en el apartado 4.2 de DISCUSION de la sincronización de las células, formando subpoblaciones que acometen la mitosis a la vez, confirmada tras la aplicación de un pulso de timidina tritiada. Así pues, solo nos quedaría confirmar estos grupos de células sincronizadas, con el estudio de la variación de sus diámetros celular, nuclear y la relación N/C.

#### 4.4.2 Diámetros

Se ha de distinguir entre el diámetro nuclear y citoplásmico a la hora de referirnos a ellos como parámetros de crecimiento, ya que los procesos que se producen en el núcleo durante el ciclo celular ocurren en momentos distintos a los citoplásmicos. Mientras que el diámetro nuclear puede modificarse sólo durante el periodo de síntesis de ADN y en los instantes anteriores al comienzo de la profase, el citoplasma sufre mayores variaciones de tamaño a lo largo del ciclo celular. Poco después de concluir una mitosis, la célula restablece su tamaño característico; a continuación, si entra de nuevo en ciclo, la síntesis que tiene lugar en G1 produce el incremento del diámetro, que continúa hacia el final de G2.

Se ha observado, en todos los casos estudiados (células marcadas, no marcadas y totales) mayor variación en los diámetros citoplásmicos que en los nucleares. Mientras que las distribuciones de los diámetros citoplásmicos son a menudo, bimodales, los diámetros nucleares en células marcadas y totales son unimodales y en células no marcadas, con excepción de las horas 41 y 43, también lo son.

Las distribuciones de los diámetros citoplásmicos

de células marcadas y no marcadas, se presentan complementarias a lo largo del tiempo de estudio, lo que se ha interpretado como un indicativo de las diferencias de situación en el ciclo celular de unas y otras; si comparamos estos datos con los obtenidos para el índice de marcado, comprenderemos de lo que se trata: en la hora 40, el LI es el más bajo de los encontrados en todo el tiempo de estudio, lo que quiere decir que la mayoría de las células en mitosis presentes no estaban en síntesis de ADN al administrar el precursor radioactivo. En esa misma hora, un importante número de elementos no marcados son de pequeño tamaño (menores de 12 micras), quizás el producto de esas divisiones; esto se refleja en las distribuciones de diámetros en que aparece un elevado porcentaje de células pequeñas que, sumadas a las marcadas de esa misma hora, hacen que la distribución de células totales se presente bimodal.

De hecho, las diferencias antes apuntadas para la hora 40, continúan durante todo el tiempo de experimentación, lo que nos ha llevado a analizar por separado las distribuciones de diámetro de células marcadas y no marcadas. En cuanto a la población total, debido a que se encuentra muy influida por el elevado número de células marcadas, su estudio se limitará a destacar las características propias de ellas.

#### 4.4.2.1 Células marcadas

La secuencia que se desprende de la distribución de los diámetros de las células marcadas esta en completo acuerdo con lo expuesto con anterioridad al hablar de la población mitótica. Efectivamente, el hecho de que el 70% de las células presentes en el tumor entre las 40 y 44 horas de implantación del mismo se encuentren marcadas permite suponer que, al menos dicho porcentaje, se encuentran activas y en el compartimento mitótico. El factor de crecimiento para el segundo día se ha estimado entre 0.9 y 1 (Tannock, 1969), 0.99 (Frindel, 1969) y 0.95 (Schiffer et al., 1973), lo que nos da un margen del 30% de células activas (mitóticas) pertenecientes al grupo de las no marcadas.

El mayor número de células marcadas presentan diámetros entre 9 y 13 micras, apareciendo, a partir de las 41 horas, un número reducido de células mayores. Podemos interpretar esta agrupación de células con moda 11 micras, como la población principal. Forman un conjunto heterogéneo en cuanto a la situación en el CC se refiere, y de las que no podemos determinar su estado ni si son sincrónicas todas ellas. Sin embargo, en la hora 41 aparece un grupo de células (con valor modal 15 micras) que no estaban presentes en la hora anterior; esto se puede interpretar como que dicho grupo ha

alcanzado este diámetro por encontrarse en G2. En las dos horas siguientes se reduce de nuevo el número de estas células, posiblemente porque han pasado a mitosis. Evidentemente se puede hablar de sincronización en este caso.

Si unimos estos datos a los obtenidos en el LI, podemos concluir que pequeños grupos de células se encuentran en la misma fase del CC, sincronizadas, detectables por sus características morfométricas y su marcado autorradiográfico.

#### 4.4.2.2 Células no marcadas

En este caso, se observan mayores evidencias de la existencia de poblaciones sincrónicas en el tumor y de la elevada tasa de crecimiento del mismo. La distribución comienza siendo bimodal en la hora 40, con un porcentaje elevado de células de 12 micras. Una hora más tarde casi ha desaparecido el primer máximo, siendo la moda 14 micras. Las células que acababan de concluir la mitosis han restablecido su tamaño característico. En la hora 43 la distribución vuelve a ser bimodal, es decir, se han producido nuevas mitosis con incremento de las células menores de 12 micras. Es evidente que se trata de dos grupos de mitosis distintos ya que, en tan solo 3 horas, no se ha podido producir un ciclo completo; esto supone

que se trata de dos grupos de células no marcadas importantes en número, en un estado de CC próximo y que serían los responsables de las variaciones de diámetros.

Que las células no marcadas presenten mayor variación que las marcadas no ha de extrañarnos por dos motivos: son minoritarias en el tumor con lo que su heterogeneidad es más acusada, de por si corresponde a un grupo característico ya que la ausencia de marcas denota que no se encontraban en S, o lo que es lo mismo, que su número debía repartirse entre las que se encontraban en G1 y G2. Hemos tenido la fortuna de encontrar un alto porcentaje de células que habían concluido la mitosis en el momento de efectuar la primera muestra.

#### 4.4.3 RELACION N/C

La determinación de la relación N/C que se ha seguido no tiene en cuenta el tamaño absoluto de las células ya que, al tratarse de un cociente, dos elementos de diferente tamaño pueden presentar la misma relación N/C. Se trata, por lo tanto de una medida de coordinación entre la masa total y la nuclear. Con el fin de ayudar a la comprensión de este parámetro, se ha confeccionado una serie de histogramas de doble entrada (tridimensionales) en los que se representan, en el eje OX, diámetros citoplásmicos, en eje OY, diámetros nucleares y, en el



eje OZ, la frecuencia relativa para cada par de puntos.

Es muy significativo que, excepto en la hora 40, la clase 0.8, que es el punto tangente de las distribuciones de las células marcadas, corresponda a la moda de las distribuciones de las células no marcadas.

Se puede conseguir un valor de N/C mediante el cociente de distintos tamaños de núcleo y citoplasma, por lo que a la hora de referirnos a las diferencias encontradas entre células marcadas y no marcadas en este parámetro, debemos recurrir al estudio de la distribución de diámetros nucleares frente a los citoplásmicos. Se observa que dicha representación en células marcadas tiende a acercarse a los valores menores hasta las 43 horas, encontrándose la mayoría de las células ocupando el vértice inferior izquierdo de la representación; lo que significa que las células son cada vez más pequeñas y de núcleo menor.

Por el contrario en la representación tridimensional de los diámetros en células no marcadas, con excepción de las 41 horas, se encuentran la mayoría de elementos en la porción central de la gráfica; se trata pues de un grupo de células que no sufren grandes variaciones en sus diámetros. El importante grupo de células pequeñas de las 40 horas disminuye de tal manera que casi ha desaparecido en la hora 42; si se trataba de células que habían concluido recientemente la mitosis, en

tan sólo una hora han alcanzado el tamaño crítico de la población. Esto explica que sólo la hora 40 presente una distribución bimodal para N/C, ya que el resto del tiempo de experimentación la mayoría de los elementos no modifica sustancialmente sus tamaños nuclear y citoplásmico.

Debido a que son las células marcadas las que sufren mayores variaciones de tamaño, lo que equivale a decir que son más activas desde el punto de vista del ciclo celular, y que siempre se encuentra entre ellas tanto células que han concluido la mitosis como en G2 o en las otras fases, es por lo que su distribución de N/C es más heterogénea.

## 4.5 MORFOLOGIA

### 4.5.1 Células en mitosis

La interpretación de algunas de las figuras mitóticas que se observan en el tumor supone un verdadero reto, ya que, aunque la mayoría de ellas son normales morfológicamente hablando, unos pocos casos se salen de toda norma y entran de lleno en el terreno de la patología celular. Así pues, cremos haber sido cautos en cuanto a la interpretación que a ellas se les da.

Se ha observado que el diámetro de las mitosis es heterogéneo, encontrándose algunas de gran tamaño. Prueba de ello son las figuras 56 y 57, en la que se ha podido fotografiar dos células en metafase y dos en principio de telofase, casi en el mismo estadio, y cuya diferencia de tamaño es muy evidente. La significación de esta imagen es clara: las células de mayor tamaño son mitóticamente activas, capaces de dividirse y por lo tanto responsables del mantenimiento de la heterogeneidad del número de cromosomas en el tumor. Aunque se puedan perder

cromosomas en el curso de un reparto mitótico o incrementar el número de los mismos como consecuencia de rupturas o modificar su número, aunque no la masa total de ADN por fusión de algunos de ellos, las nuevas estirpes celulares son viables y llegan al reparto como las células pequeñas de la población principal del tumor. Además, la presencia de células en mitosis con un número de cromosomas elevado, podría sugerir que se ha llegado a esta situación por una reduplicación sin reparto o por una cariocinesis sin citocinesis (binucleadas) que pueden, posteriormente, emprender el reparto, pero ya con una dotación cromosómica supernumeraria.

Las metafases con placas incompletas o con cromosomas no orientados pueden interpretarse como metafases tempranas. Ahora bien, cierto número de anafases presentan cromosomas no orientados todavía, es decir, se ha observado cromosomas no dispuestos en las placas hijas en anafase. Hablamos de ellos como cromosomas retardados, cromosomas que no se llegaron a orientar en metafase o que no formaron a tiempo sus filamentos de tracción. Se ha relacionado este fenómeno con la presencia de micronúcleos en algunas células mononucleadas, en las que la masa principal de su ADN ocupa un sólo núcleo, con su micronúcleo completamente separado del principal. No se trata pues de polimorfismo nuclear sino de cromosomas retardados que quedaron en una

de las células hijas tras la telofase.

También en anafase y telofase se ha observado como algunos cromosomas quedan estirados, conectando las dos estrellas hijas. Sería tentador ver en este fenómeno el origen de la célula binucleada, ya que con frecuencia estas quedan conectadas por finos filamentos de cromatina. Pero para que así fuese se debería de producir, además de los cromosomas estirados, un fenómeno de no citocinesis y en muchos casos se ha visto como las telofases han roto el cromosoma estirado, que se presenta observable en una o las dos células hijas. Podría ser que fuese causa indispensable el cromosoma estirado para producir una célula binucleada, pero no la única.

En cuanto al marcado autorradiográfico de las células en mitosis, se han observado tanto marcadas como no marcadas, en todas las fases. El marcado es desigual en las mitosis observadas lo que significa que dos células en mitosis, una marcada y otra no marcada o con pocas marcas se encontraba en el momento de la administración en el periodo S, la segunda a punto de concluirlo. Si han llegado a mitosis a la vez significa que la duración del CC de cada una es distinta: un ciclo es mas largo que el otro. Se trata de una evidencia clara de que coexisten en el tumor subpoblaciones con CC de distinta duración y que el IM medido en ese punto es el resultado de las sumas de las mitosis de cada población.

Se a visto, además, mitosis marcadas y no marcadas en la misma fase, dando a entender que cuando se administró el precursor radioactivo unas se encontraban en S y otras no; no sabemos si la mitosis marcada se encontraba en G1 o en G2, pero queda claro una vez más que se trata de dos células con distinta duración en su ciclo celular.

#### 4.5.2 Células binucleadas

La presencia de finos puentes de cromatina conectando ambos núcleos es, quizá, el carácter morfológico más peculiar de algunas de estas células. No se ha observado dicho filamento en todos los casos, aunque es posible que haya pasado desapercibido en alguna ocasión por estar en los límites de resolución del microscopio. Se le ha dado el origen de los cromosomas estirados, ya que el aspecto que presenta la células binucleada es de haberse producido tras una cariocinesis abortada o incompleta.

La técnica autorradiográfica demostró que estas células se encontraban marcadas en ambos núcleos, con un marcado semejante. Hemos de suponer por lo tanto que son células mitóticas que han llegado a binucleadas tras pasar por el periodo S.

#### 4.5.3 Células mononucleadas

Aunque la frecuencia de aparición de las células vacuoladas es baja, llama poderosamente la atención que el tamaño de éstas no es necesariamente grande en todos los casos, habiéndose observado células vacuoladas del tamaño medio de la población principal. Lo más destacable de todas ellas es la gran vacuola central que deja al núcleo desplazado a un extremo, adoptando la forma de un birrete. No se ha precisado su origen, habiendo sido descritas por la Patología como elementos terminales del tumor, células viejas o degeneradas. Sin embargo, buen número de ellas se ha encontrado marcadas tras la aplicación de un pulso de timidina tritiada, lo que manifiesta que dichos elementos o bien han producido la vacuola después de pasar por síntesis de ADN (pudiendo seguir considerándolas como terminales) o bien han incorporado el precursor siendo ya vacuoladas (por lo tanto células activas). En unas pocas ocasiones se ha podido observar células vacuoladas que parecen encontrarse en mitosis, aunque dichas imágenes sean discutibles. De ser células con capacidad mitótica, se podría tratar de elementos que, digamos, han entrado en diferenciación. No olvidemos que el tumor tiene un origen epitelial, de glándula mamaria y bien podría tratarse de células que, bajo precisas circunstancias, han vuelto a

sintetizar y almacenar productos para la exportación. La demostración de esta afirmación debe venir por otra vía que es la detección histoquímica de algún componente específico de la leche del ratón, o por el estudio y la cuantificación de las células vacuoladas tras el tratamiento del tumor con hormonas estimulantes de la secreción láctica y el estudio del mismo en machos, hembras jóvenes y hembras en estado de gravidez y lactancia.



## CONCLUSIONES

- 1.- Siguiendo los protocolos propuestos por Vives (1984): Se ha confirmado la entrada masiva de liquido ascitico despues del tercer dia, asi como la diferencia entre los valores de la mañana y la tarde para los parametros Peso de los animales portadores, Peso del tumor e Indice Mitosico asi como para el Indice de Celulas Binucleadas.
- 2.- Se ha propuesto un modelo teorico computarizado de crecimiento y division del tumor ascitico de Erhlich, en base a la presencia de subpoblaciones en el mismo desde el punto de vista cromosomico (Fomina et al. 1978), a la sincronizacion que se produce tras el implante (Wiebel y Baserga, 1968), al acortamiento de los ciclos celulares en cada reinoculacion del tumor (Lala 1972) y al paulatino alargamiento con la edad del cultivo (Tannock, 1969; Frindel et al., 1969). Dicho modelo teorico explica la fluctuacion de maximos y minimos encontrda experimentalmente en el Indice Mitosico.
- 3.- La curva del IM viene modulada por el ritmo divisional del tumor de tal manera que el tipo de modelo de toma de muestras es fundamental a la hora de determinar las variaciones reales que aquel sufre.
- 4.- En caso de producirse la sincronizacion de los ciclos celulares tras el implante del tumor en un nuevo portador, esta solo afecta a la primera generacion, ya que a las 40 horas ya se ha producido un desfase de ellos tal que en esa hora y las siguientes se han observado al menos tres grupos de celulas que entran en mitosis consecutivamente, manteniendo el IM alto, y separables dichos grupos por su marcado autorradiografico.
- 5.- Los maximos que se producen en el IM alternando con valores menores indican la presencia de las poblaciones arriba mencionadas asi como la existencia de un nivel de mitosis pertenecientes a celulas completamente asincronicas. En todo momento existen celulas con duracion de ciclo celular diferente, como lo demuestra el hecho de que coexistan mitosis marcadas y no marcadas en todos los puntos en que se han tomado muestras
- 6.- Las celulas de mayor tamaño tambien son celulas mitoticamente activas, como lo demuestra la presencia de divisiones en estos elementos.
- 7.- Se apunta un posible origen de la celula binucleada:

resultado de mitosis abortadas o incompletas. Se relacionan los puentes de cromatina que conectan los nucleos de estas celulas con los cromosomas "estirados" observados en anafase y telofase.

- 8.- La celula binucleada se produce y se acumula en el tumor, produciendose un incremento de estas durante todo el tiempo de estudio. Aunque no son un buen indice de las celulas de mayor tamaño, sino que se consideran un tipo celular caracteristico del tumor, son un buen indice de la edad del cultivo.
- 9.- En el segundo dia de crecimiento del tumor la casi totalidad de las celulas son activas mitoticamente. El 70% de las celulas incorporan timidina tritiada; el resto de las celulas aunque no se encontraban en sintesis en el momento de la administracion del precursor, si producen mitosis en numero suficientemente elevado como para modificar el Indice Mitosico.
- 10.- La relacion N/C de las celulas del tumor ascitico de Ehrlich nunca es inferior a 0.6 .
- 11.- Se ha encontrado una diferencia morfometrica entre las celulas marcadas y no marcadas: su relacion N/C. Ademas de la situacion de marcadas y no marcadas, estas ultimas se presentan agrupadas alrededor de una relacion N/C de 0.8, precisamente una relacion que presenta muy pocos elementos marcados, ya que estos se distribuyen en forma bimodal con valores modales de 0.75 y 0.85 respectivamente.
- 12.- La celula vacuolada aparece marcada al aplicar la timidina tritiada, lo que significa que era una celula activa en el momento de la administracion del precursor. No se ha podido,precisar si la vacuolizacion es anterior o posterior al marcado.

**FIGURAS**

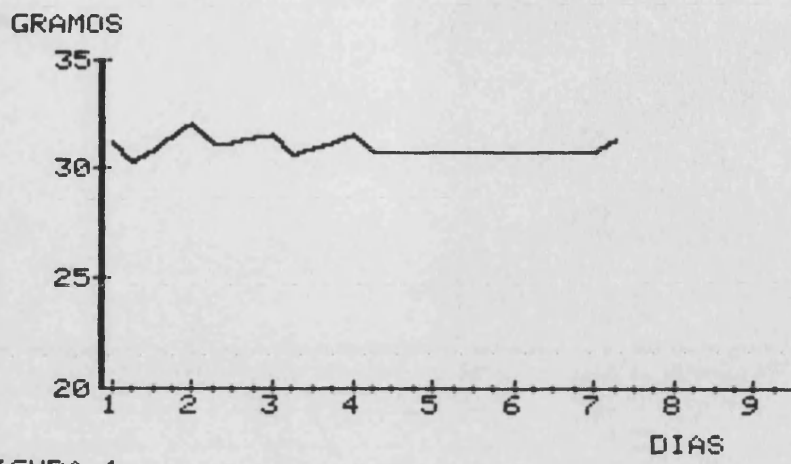


FIGURA 1

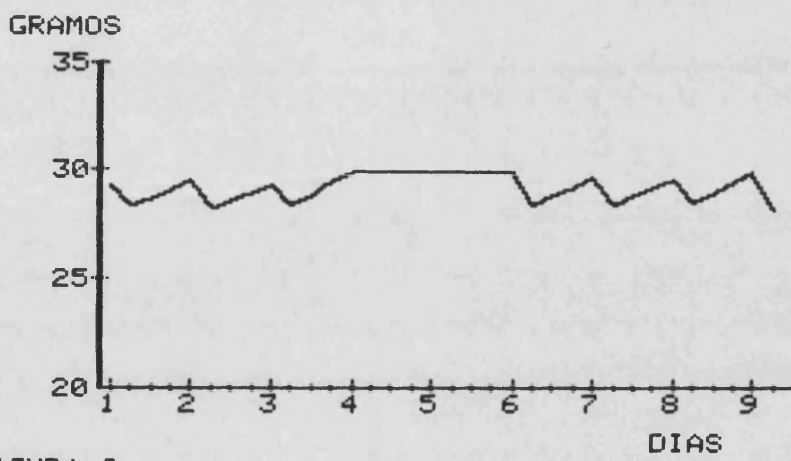


FIGURA 2

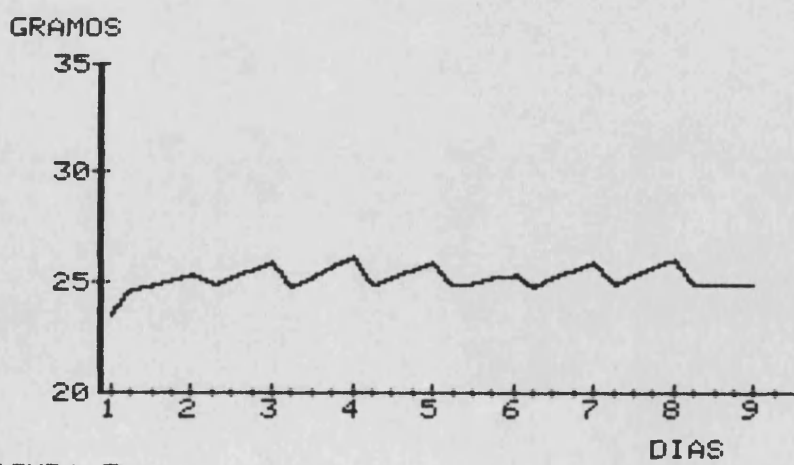


FIGURA 3

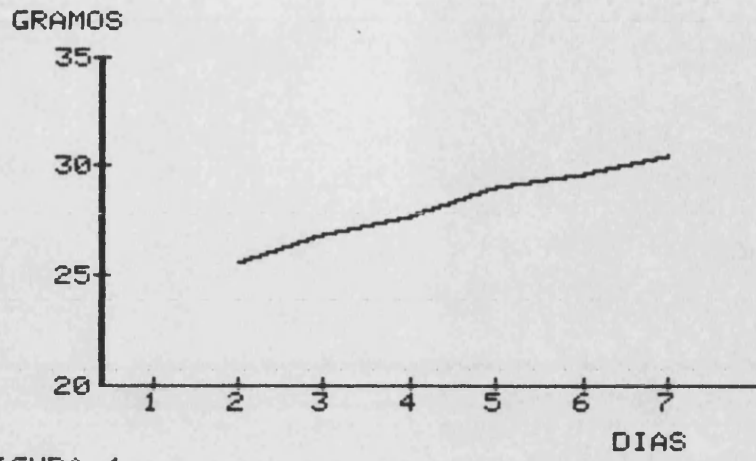


FIGURA 4

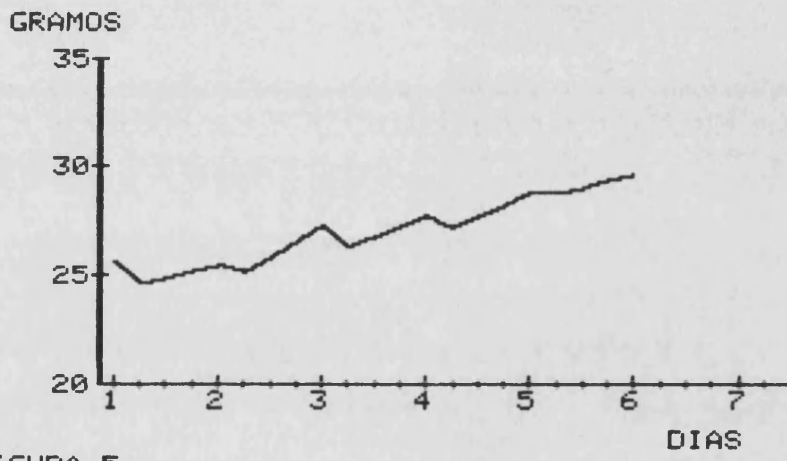


FIGURA 5

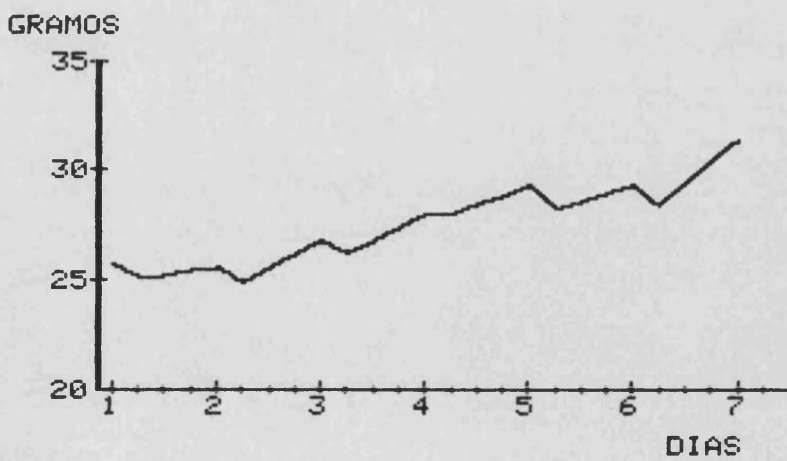


FIGURA 6

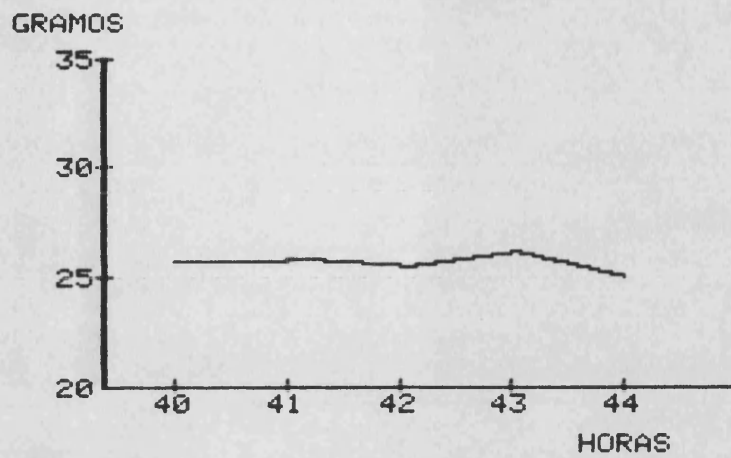


FIGURA 7

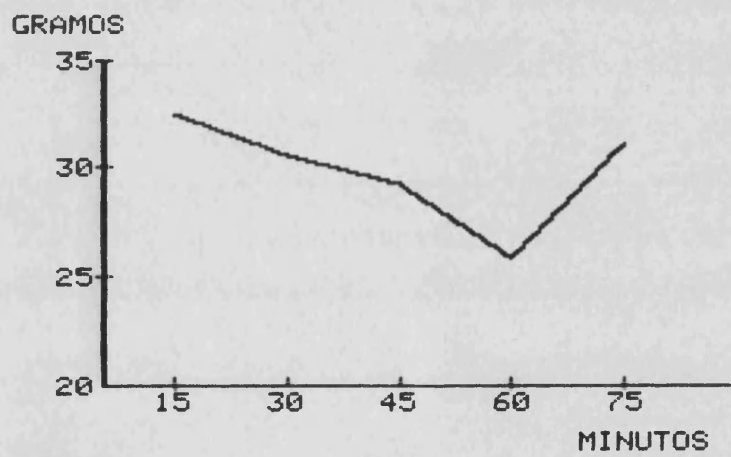


FIGURA 8

PESO DE LOS RATONES PORTADORES

FIGURA	EXPERIMENTO
4	E1
5	E2
6	E3
7	S1
8	S2

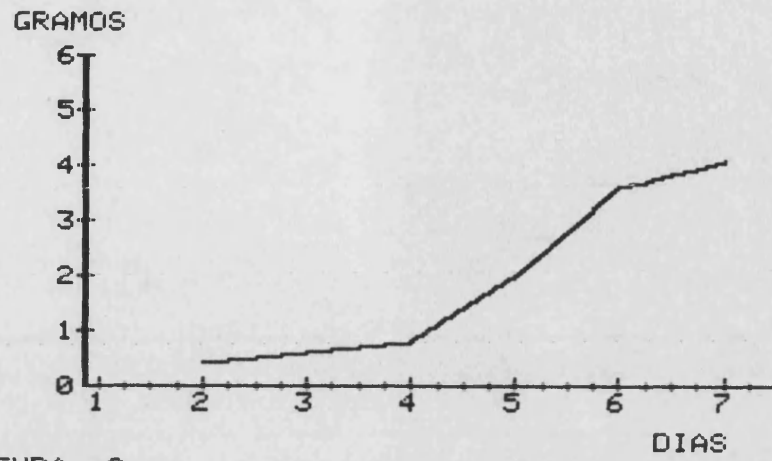


FIGURA 9

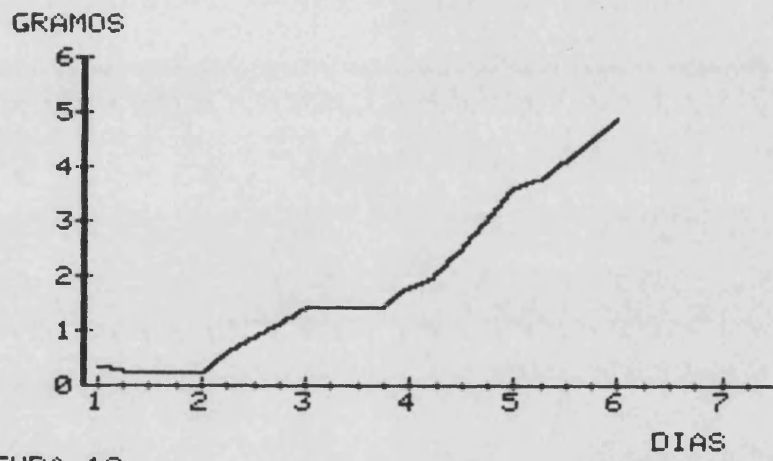


FIGURA 10

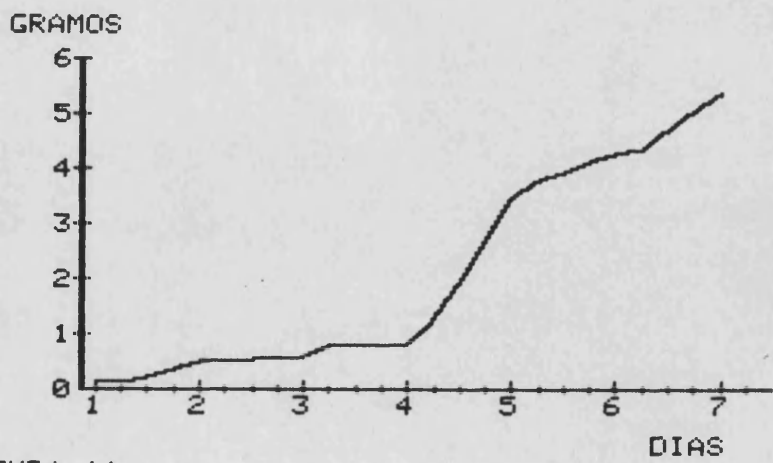


FIGURA 11



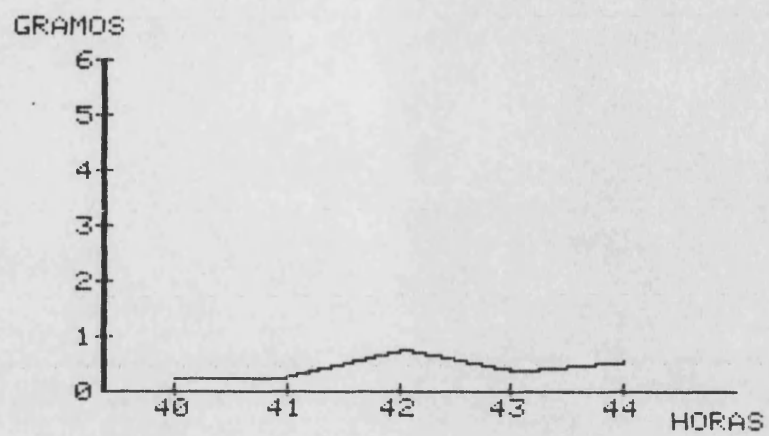


FIGURA 12

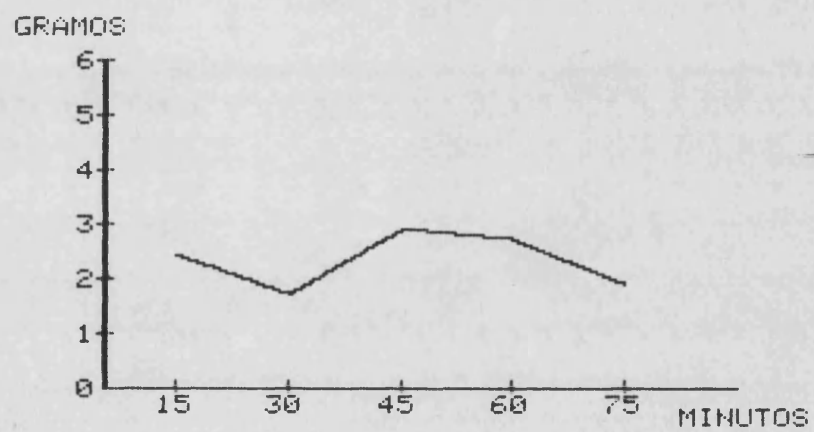


FIGURA 13

PESO DEL TUMOR

FIGURA	EXPERIMENTO
9	E1
10	E2
11	E3
12	S1
13	S2

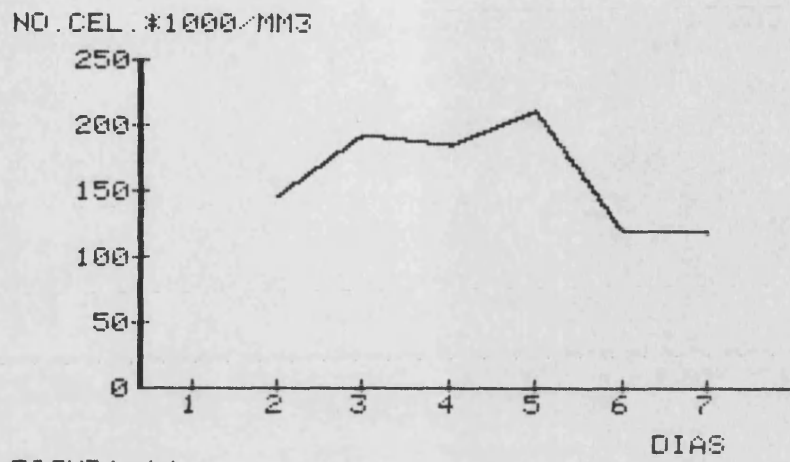


FIGURA 14

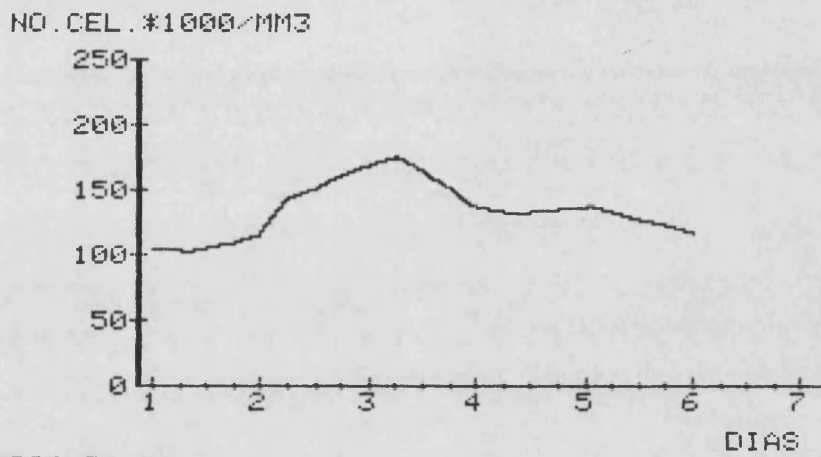


FIGURA 15

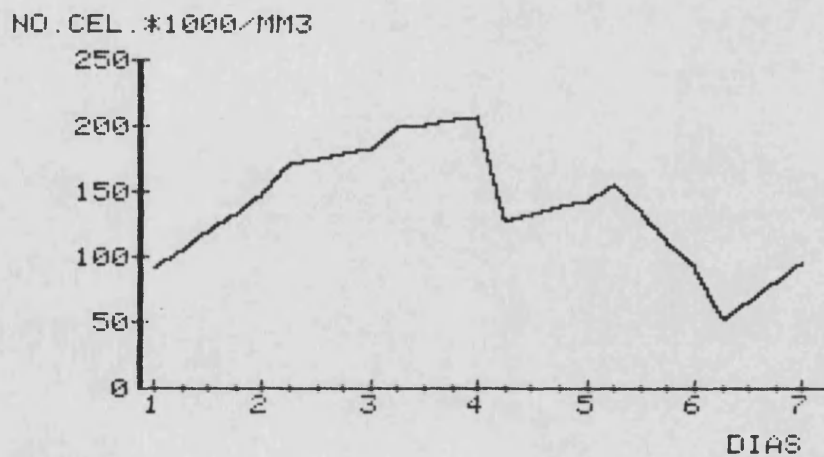


FIGURA 16

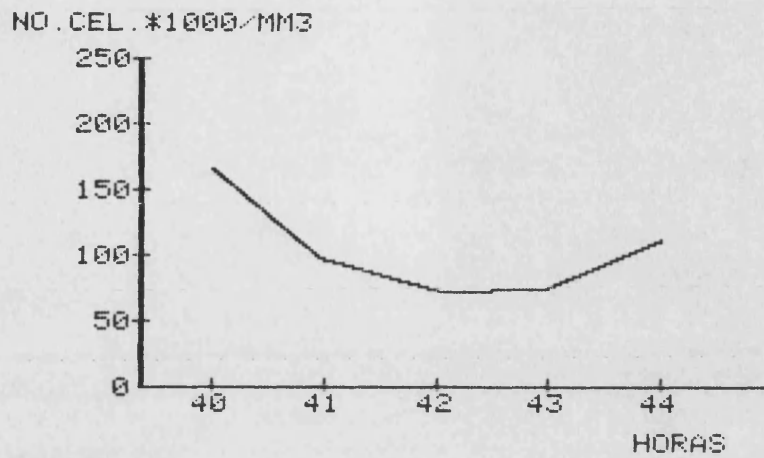


FIGURA 17

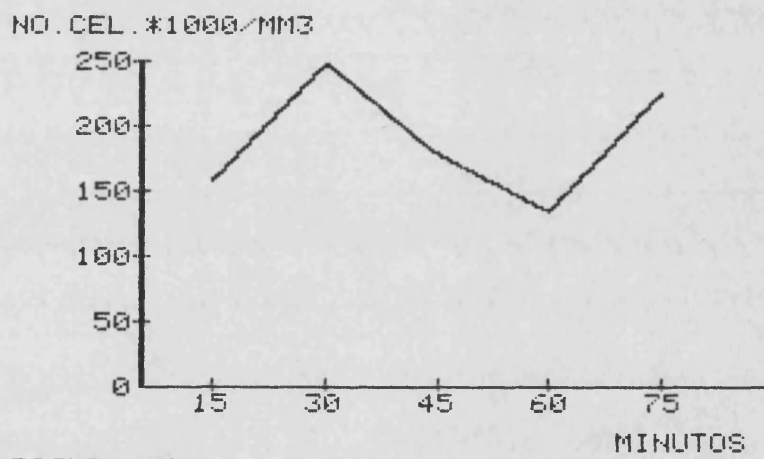


FIGURA 18

DENSIDAD CELULAR

FIGURA	EXPERIMENTO
14	E1
15	E2
16	E3
17	S1
18	S2

NO. MITOSIS/1000

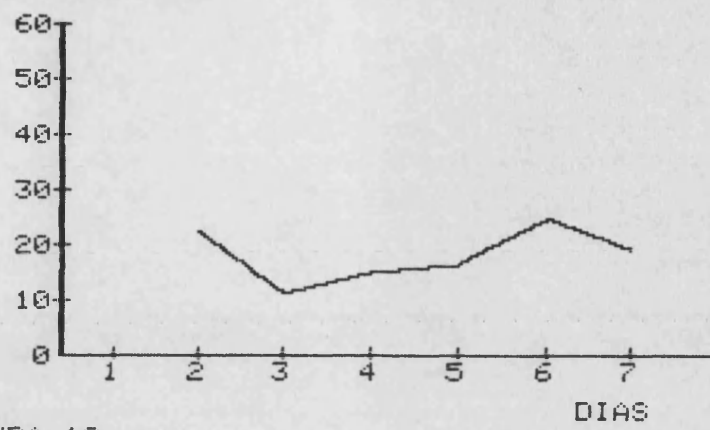


FIGURA 19

NO. MITOSIS/1000

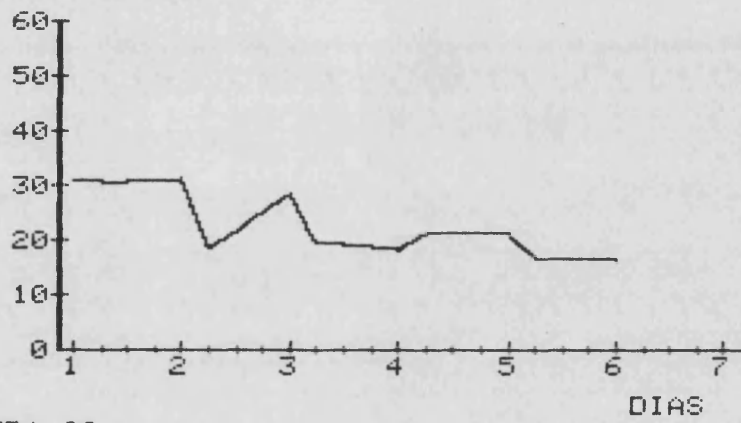


FIGURA 20

NO. MITOSIS/1000

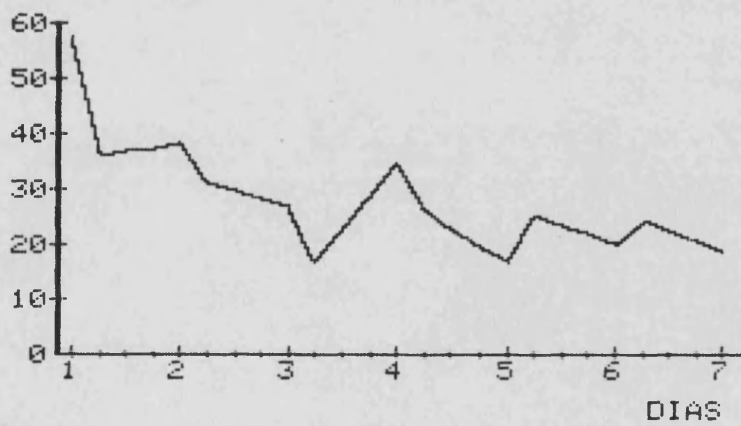


FIGURA 21

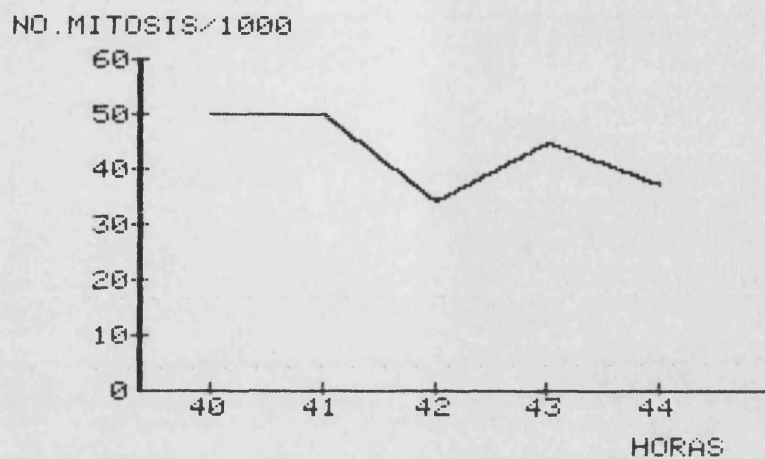


FIGURA 22

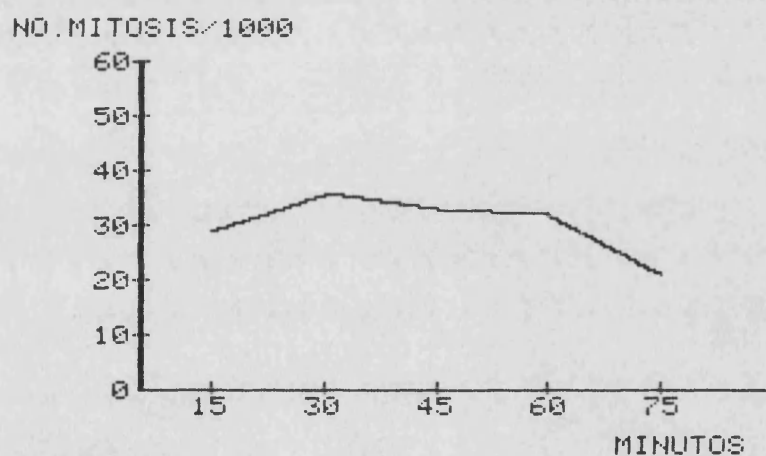


FIGURA 23

INDICE MITOSICO

FIGURA	EXPERIMENTO
19	E1
20	E2
21	E3
22	S1
23	S2

NO. CEL. BIN/1000

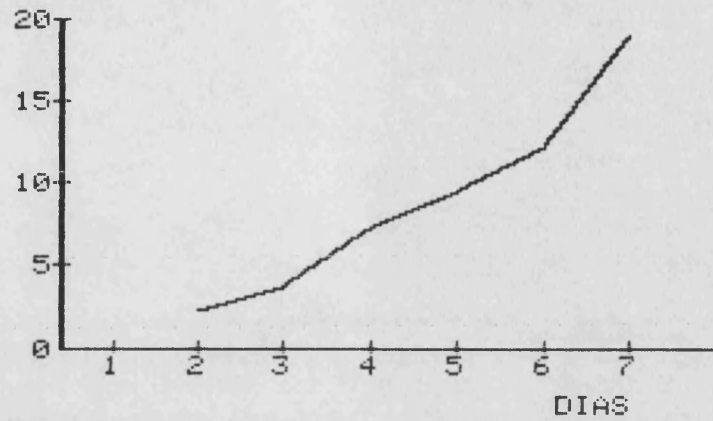


FIGURA 24

NO. CEL. BIN/1000

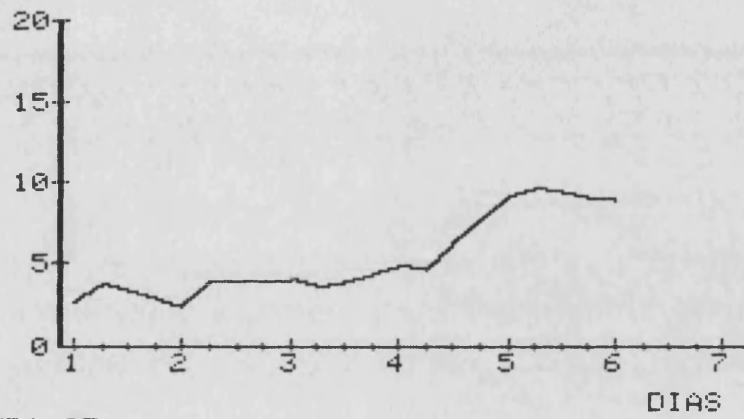


FIGURA 25

NO. CEL. BIN/1000

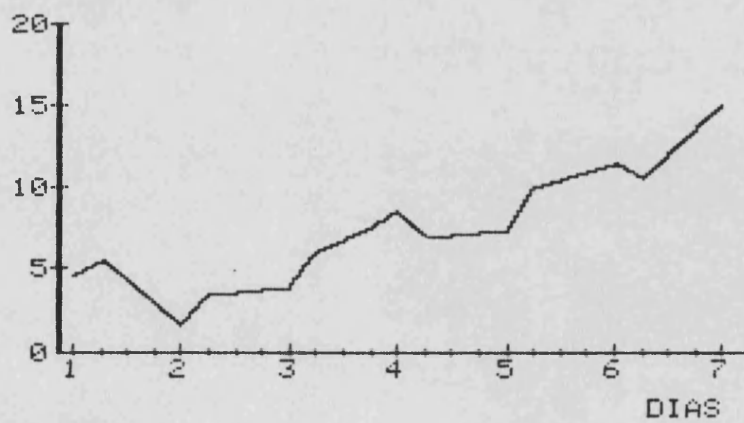


FIGURA 26

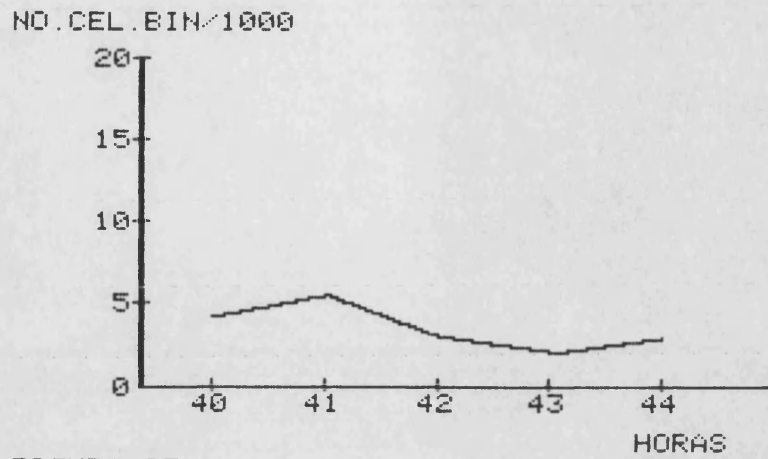


FIGURA 27

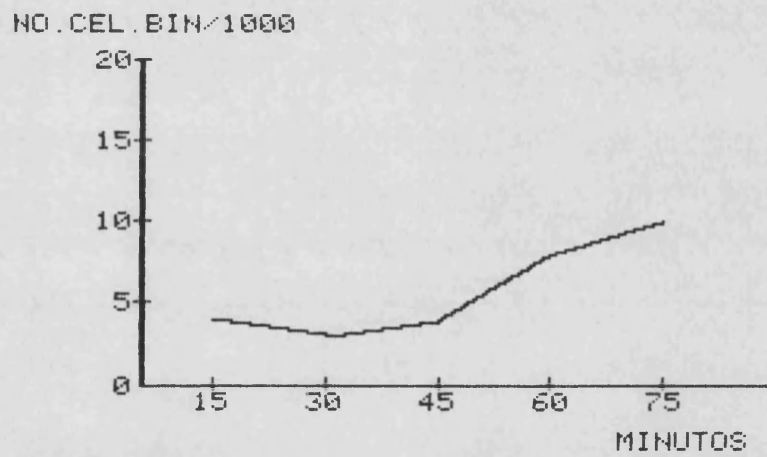


FIGURA 28

INDICE DE CELULAS BINUCLEADAS

FIGURA	EXPERIMENTO
24	E1
25	E2
26	E3
27	S1
28	S2

% MITOSIS MARCADAS

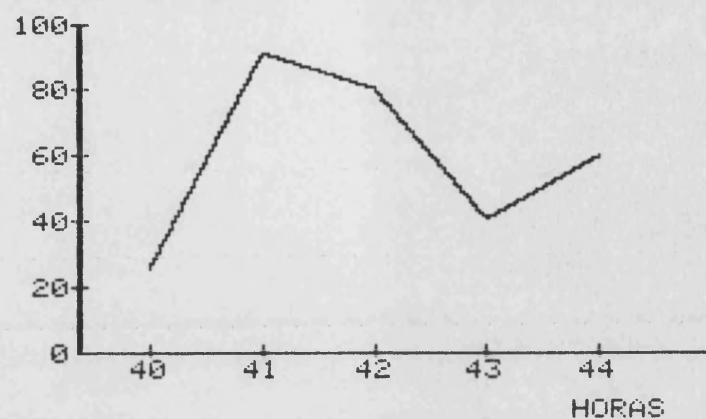


FIGURA 29

% CEL. MARCADAS

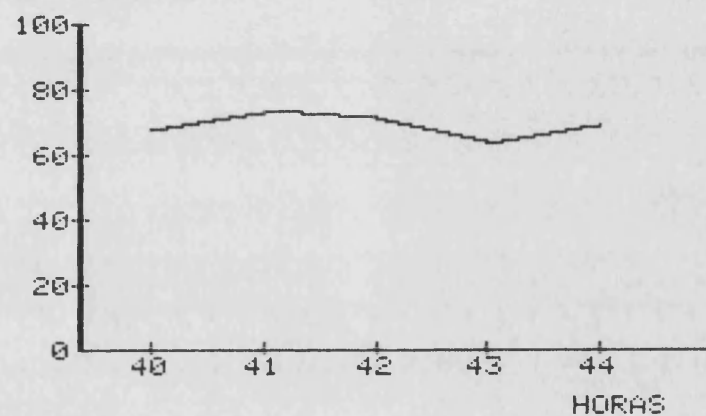


FIGURA 30

% CEL. BIN. MARCADAS

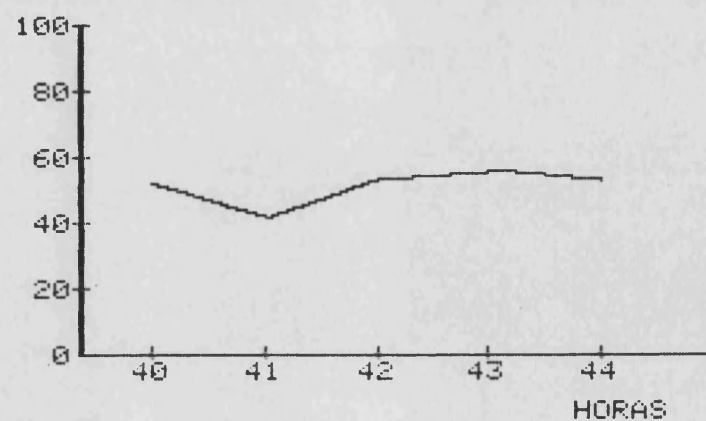
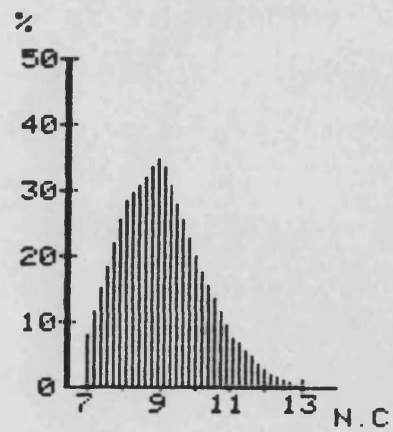
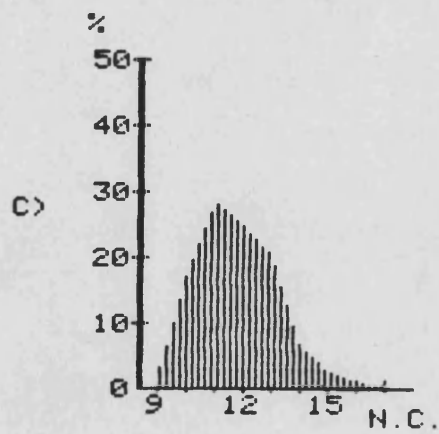
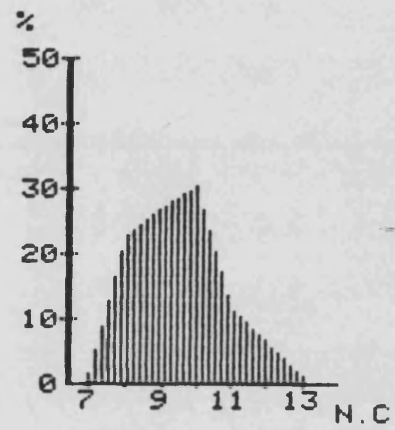
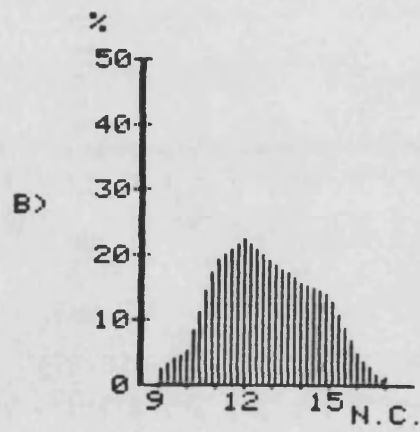
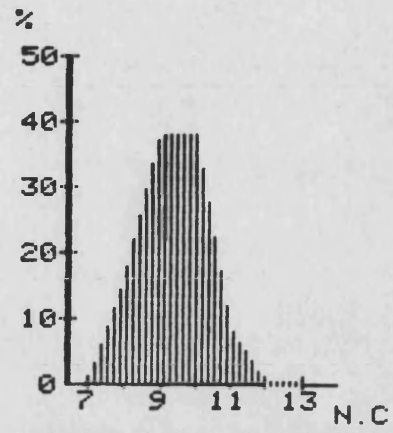
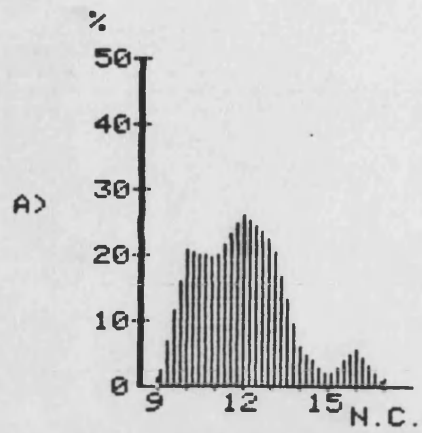


FIGURA 31





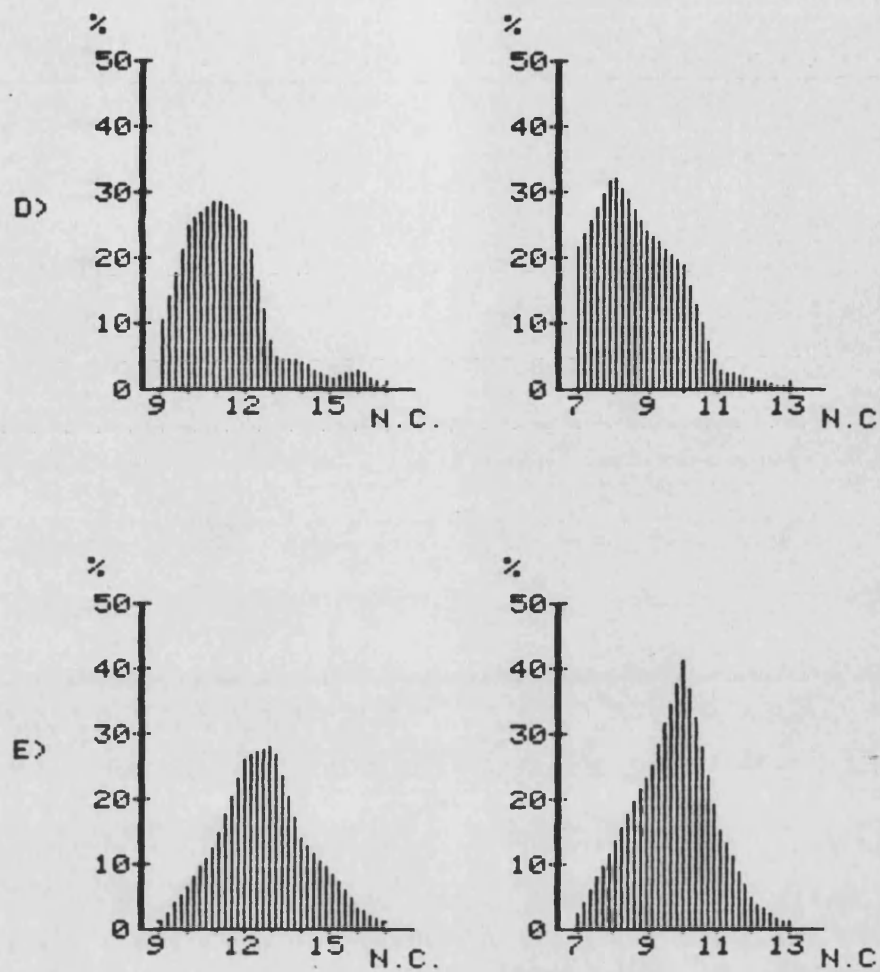
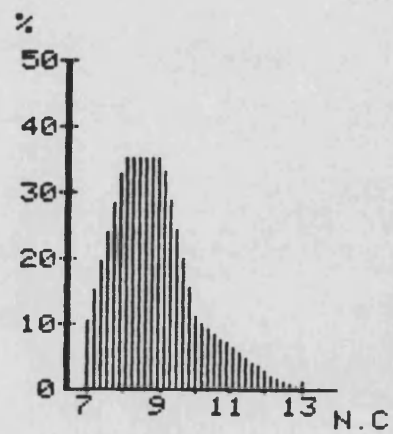
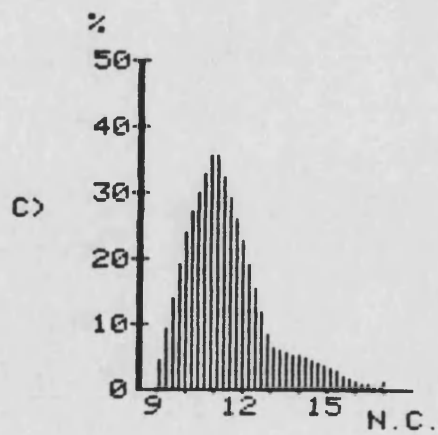
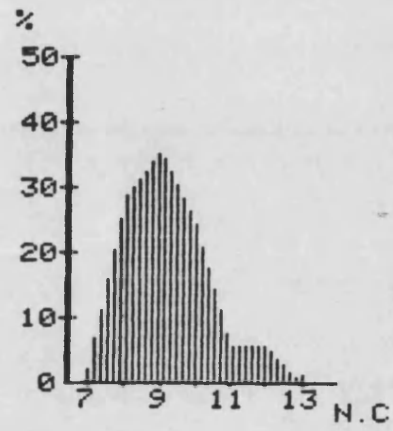
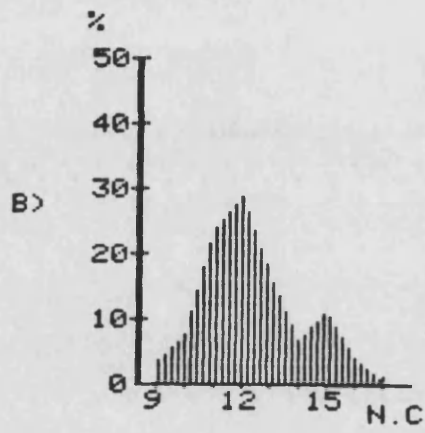
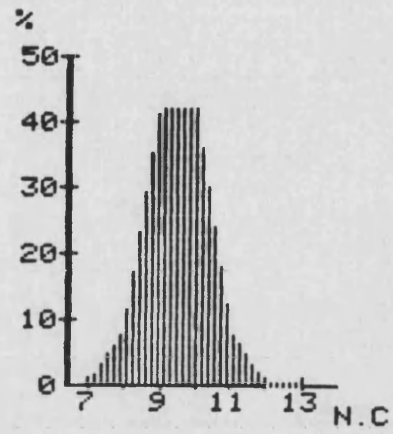
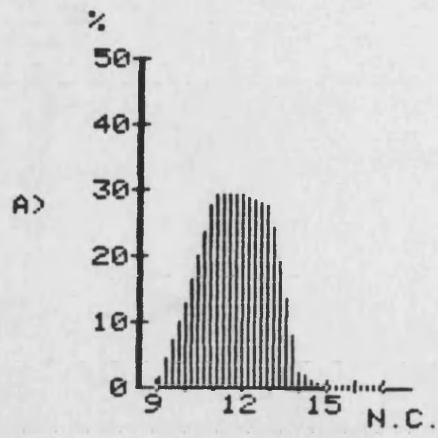


FIGURA 32: DISTRIBUCION DE DIAMETROS EN CELULAS TOTALES.  
 A) 40 HORAS  
 B) 41 HORAS  
 C) 42 HORAS  
 D) 43 HORAS  
 E) 44 HORAS  
 IZQUIERDA: DIAMETROS CITOPLASMICOS  
 DERECHA: DIAMETROS NUCLEARES



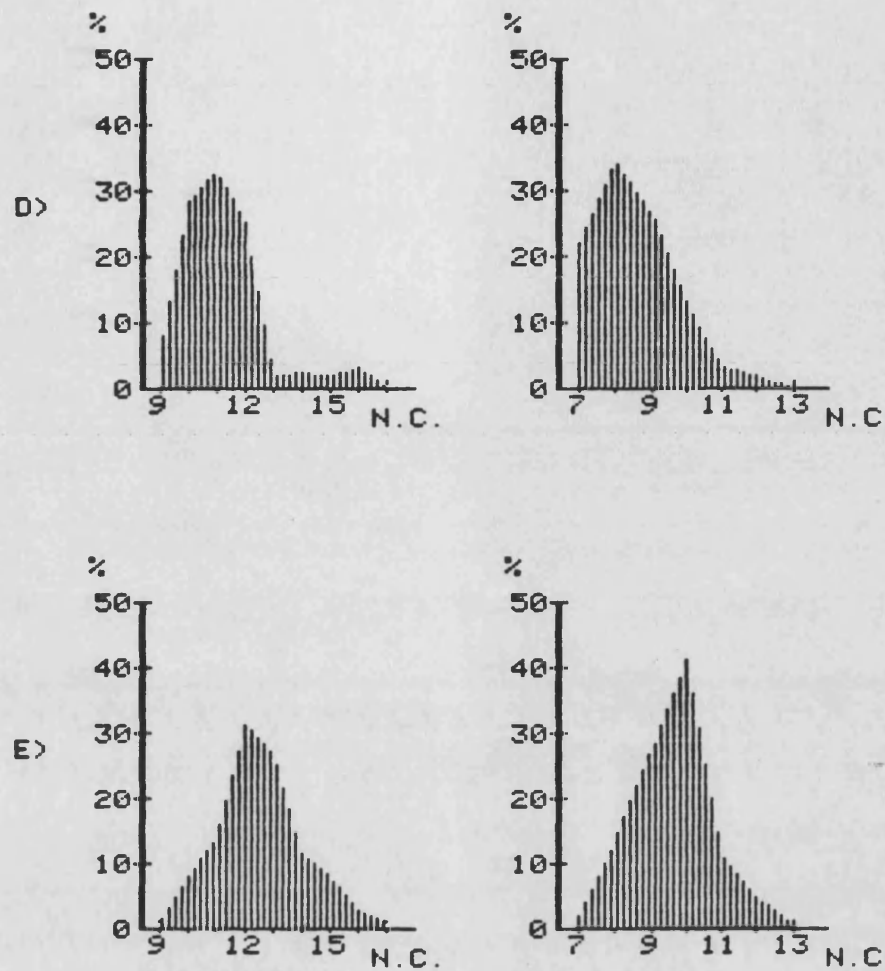
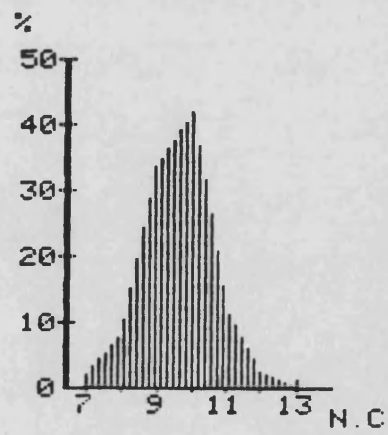
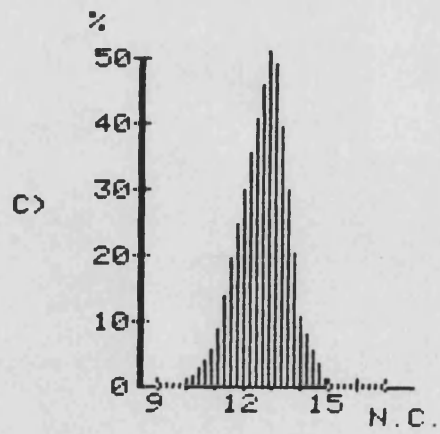
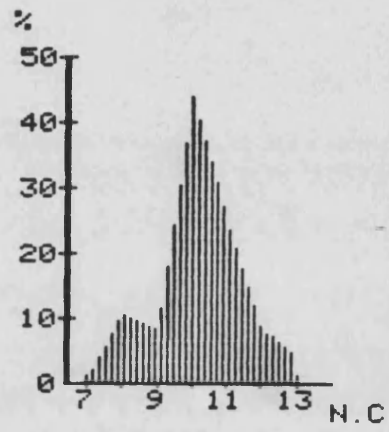
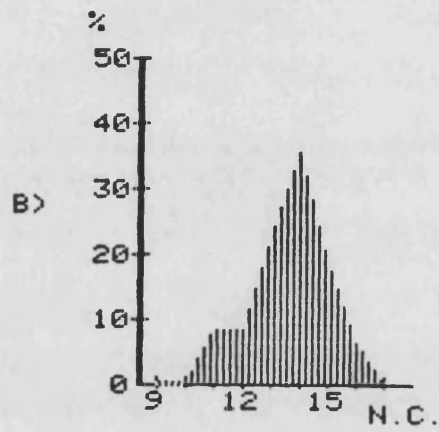
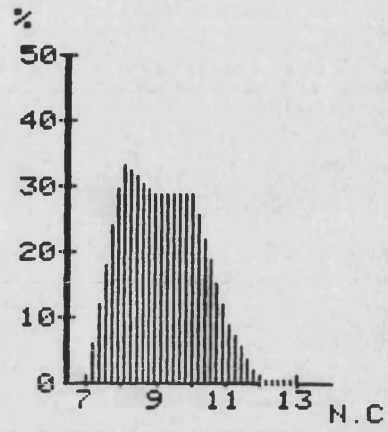
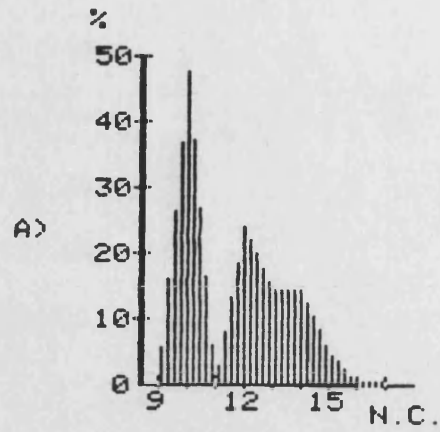


FIGURA 33: DISTRIBUCION DE DIAMETROS EN CELULAS MARCADAS.  
 A) 40 HORAS  
 B) 41 HORAS  
 C) 42 HORAS  
 D) 43 HORAS  
 E) 44 HORAS  
 IZQUIERDA: DIAMETROS CITOPLASMICOS  
 DERECHA: DIAMETROS NUCLEARES



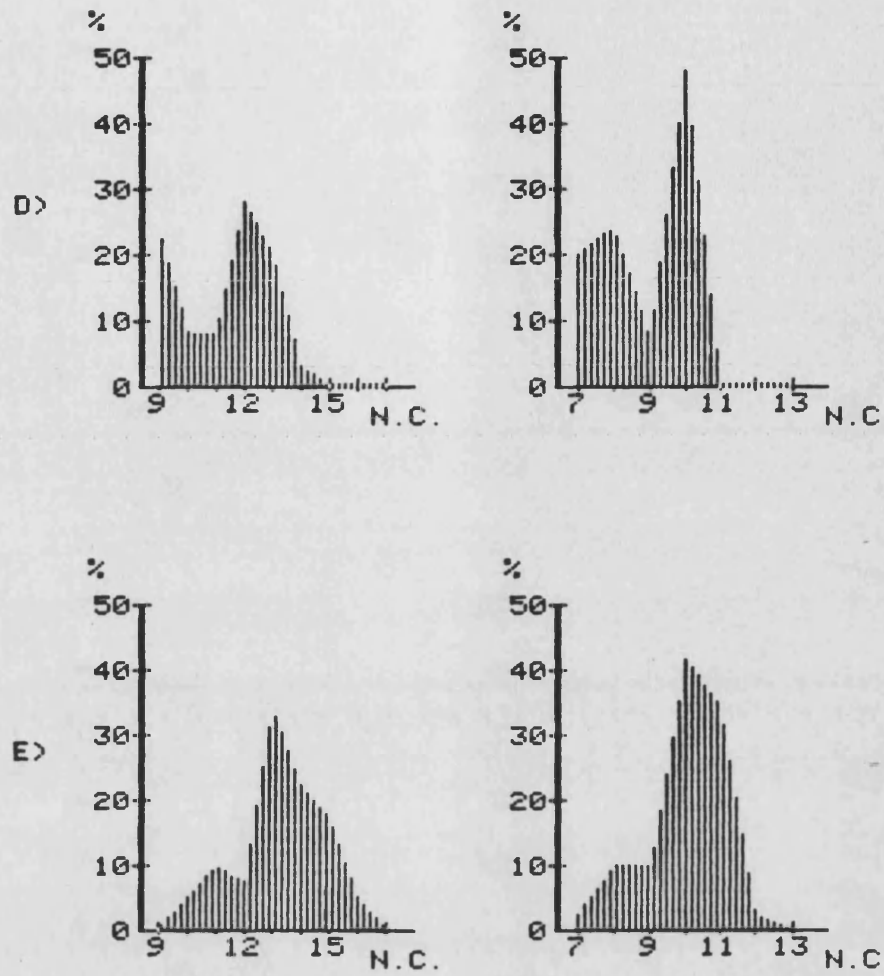


FIGURA 34: DISTRIBUCION DE DIAMETROS EN CELULAS NO MARCADAS.  
 A) 40 HORAS  
 B) 41 HORAS  
 C) 42 HORAS  
 D) 43 HORAS  
 E) 44 HORAS  
 IZQUIERDA: DIAMETROS CITOPLASMICOS  
 DERECHA: DIAMETROS NUCLEARES

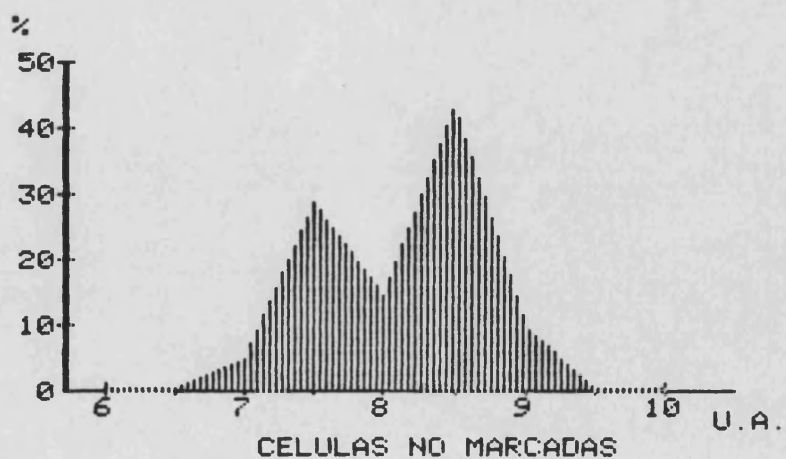
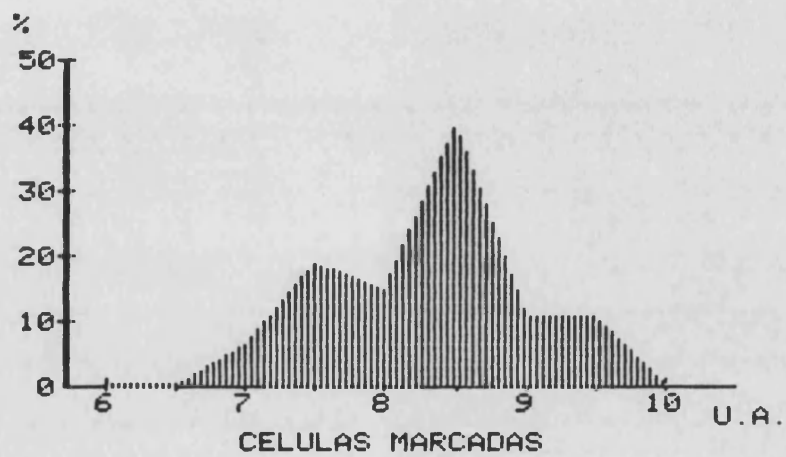
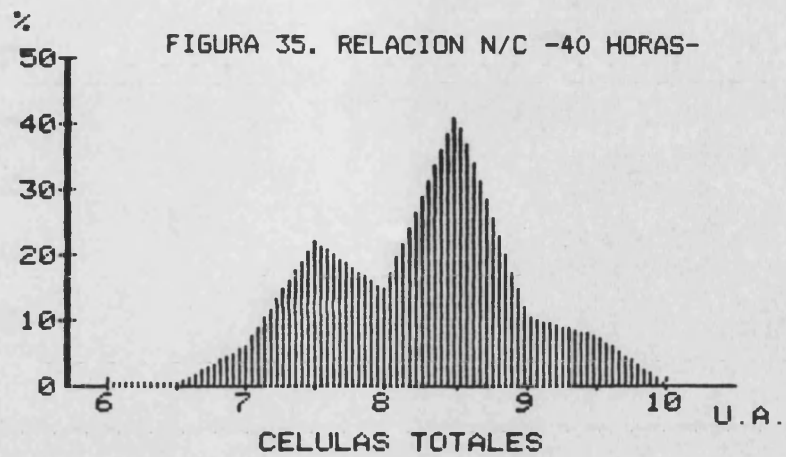


FIGURA 36. RELACION N/C -41 HORAS-

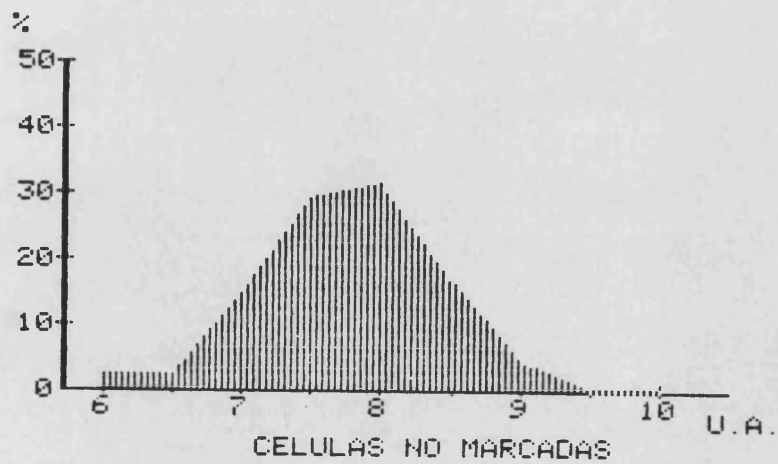
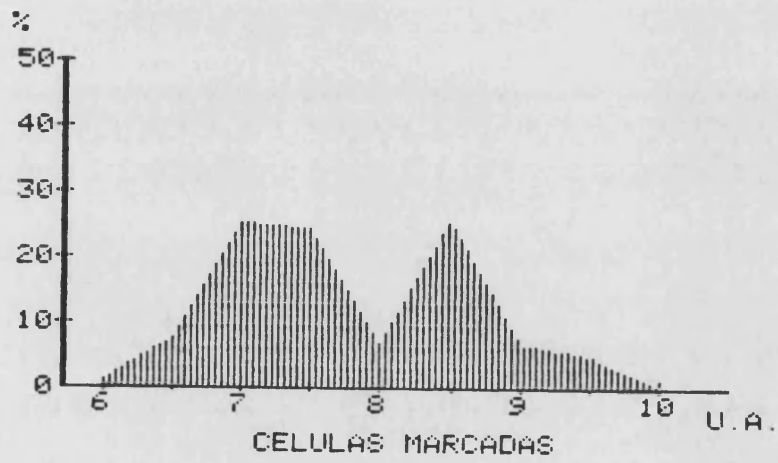
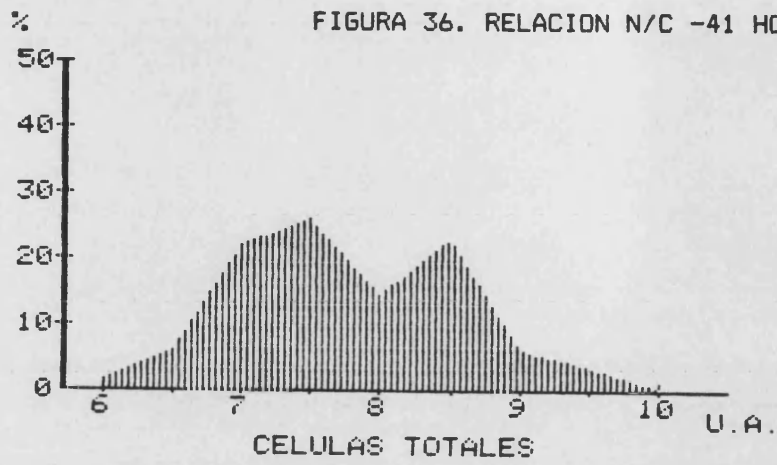




FIGURA 37. RELACION N/C -42 HORAS-

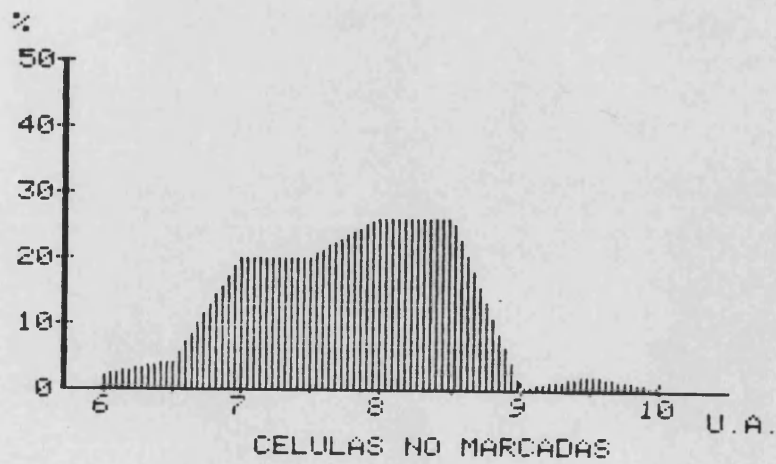
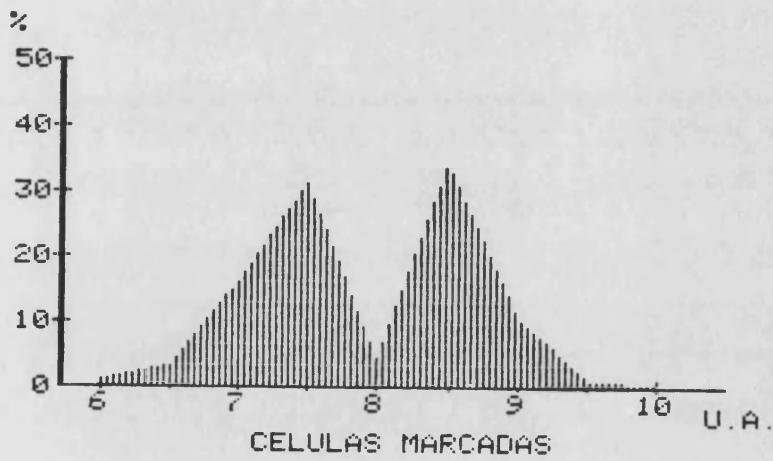
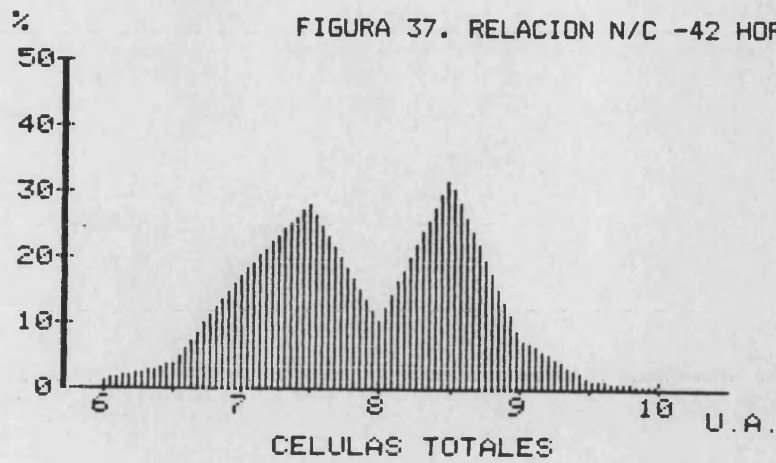


FIGURA 38. RELACION N/C -43 HORAS-

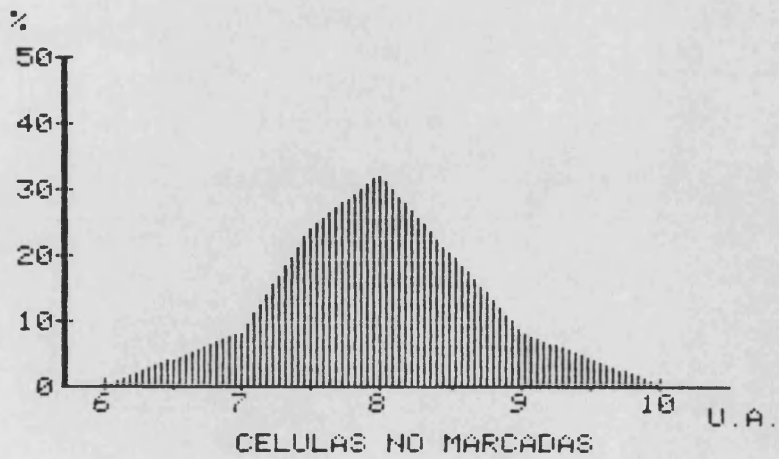
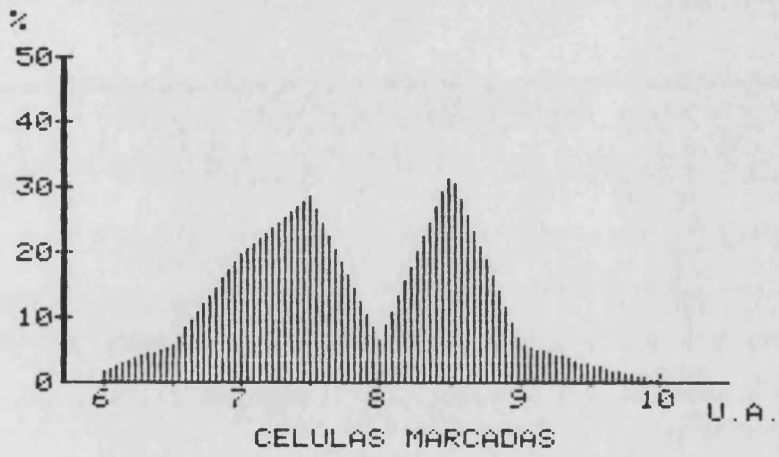
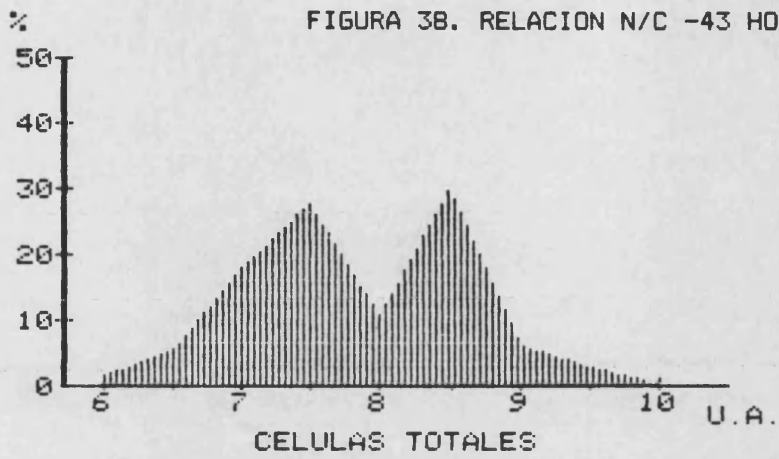
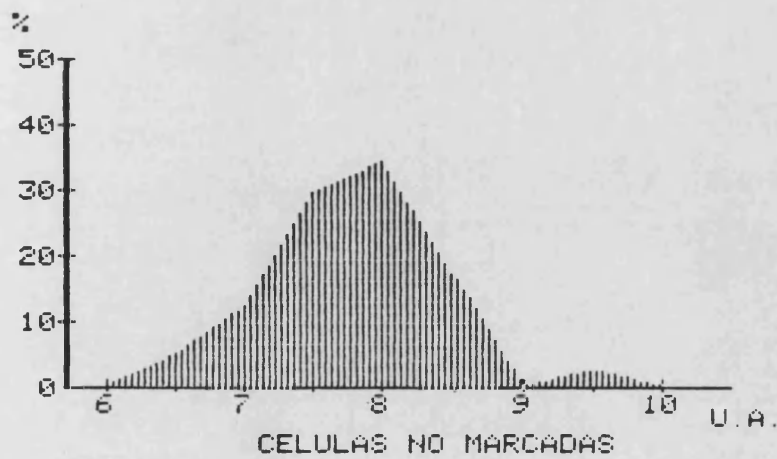
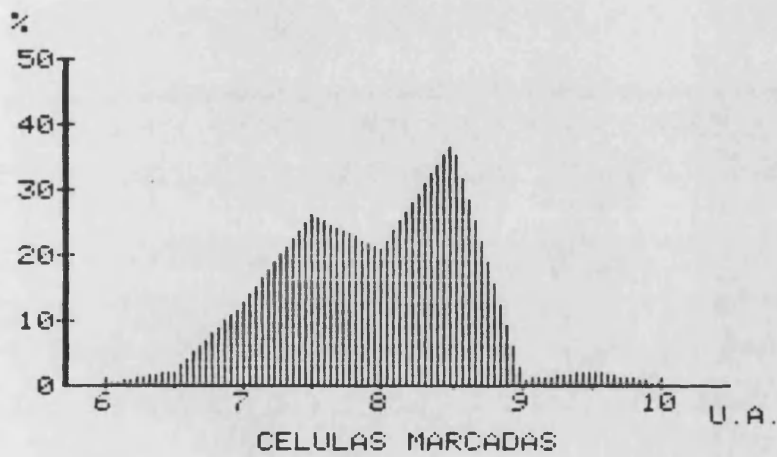
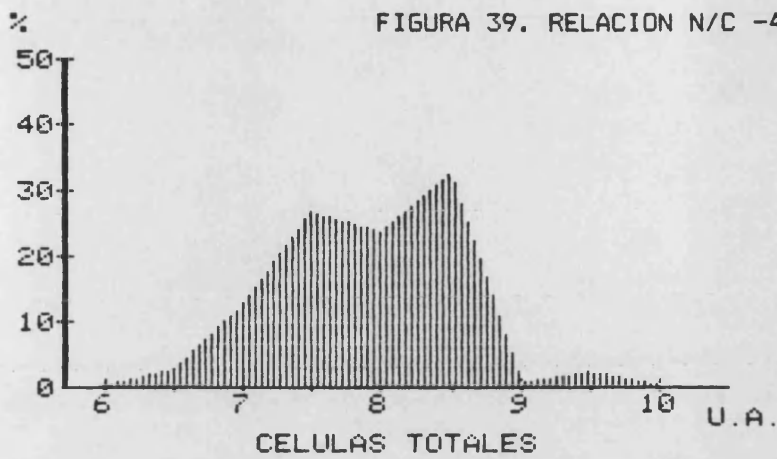


FIGURA 39. RELACION N/C -44 HORAS-



CELULAS TOTALES -40 HORAS-

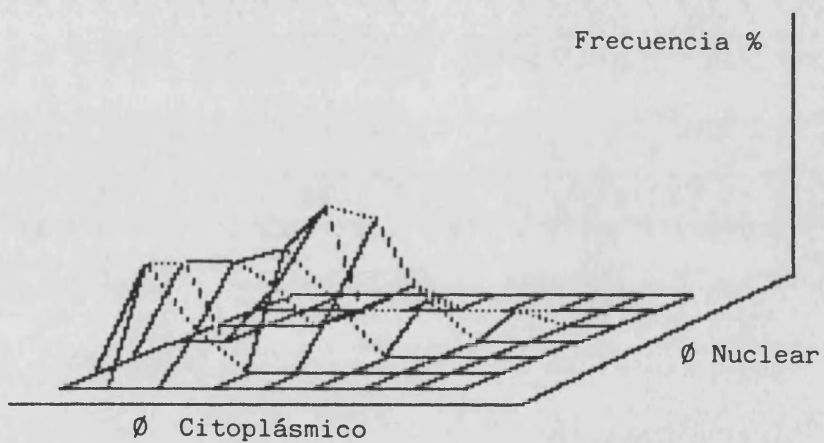
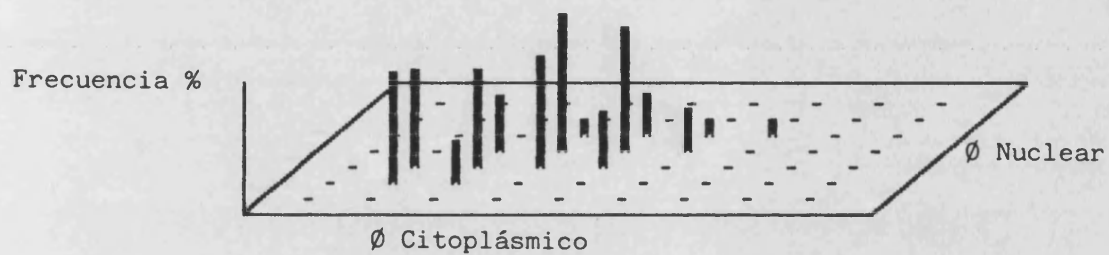


FIGURA 40

CELULAS TOTALES -41 HORAS-

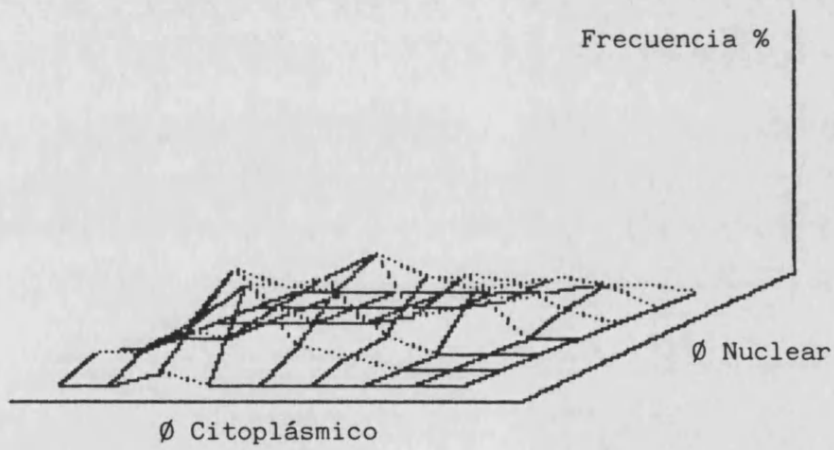


FIGURA 41

CELULAS TOTALES -42 HORAS-

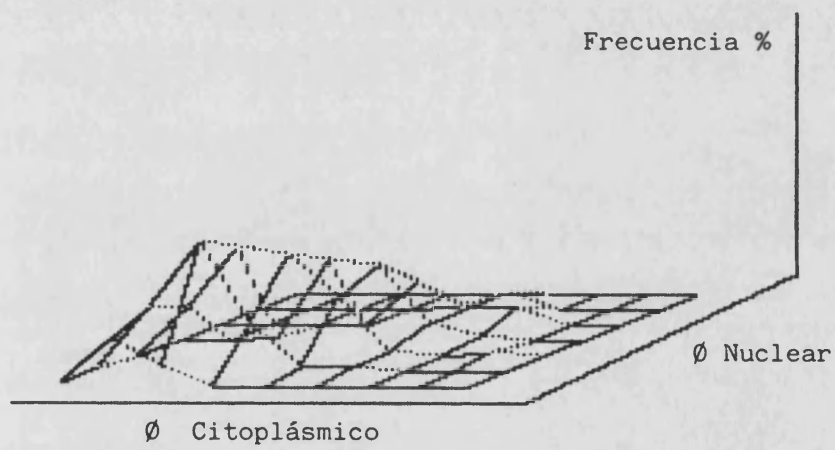


FIGURA 42

CELULAS TOTALES -43 HORAS-

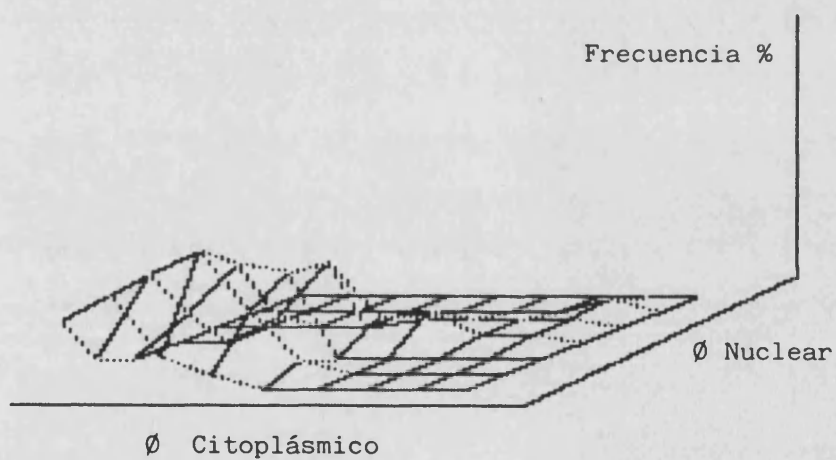
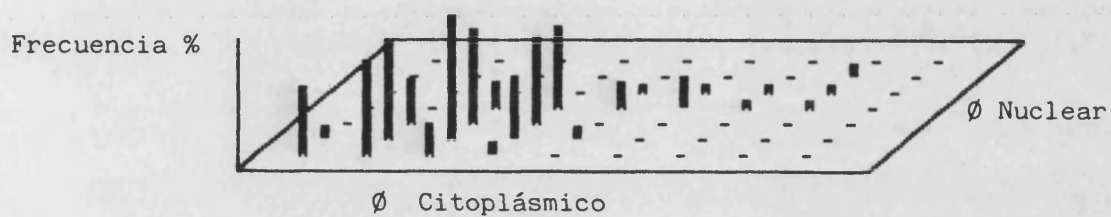


FIGURA 43

CELULAS TOTALES -44 HORAS-

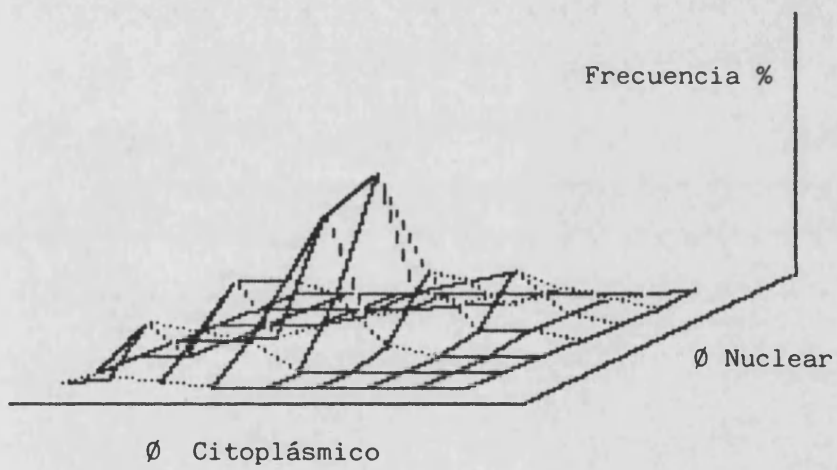
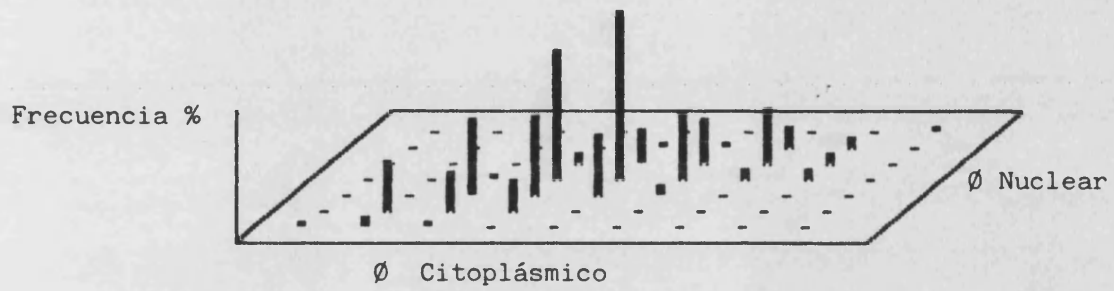


FIGURA 44



CELULAS MARCADAS -40 HORAS-

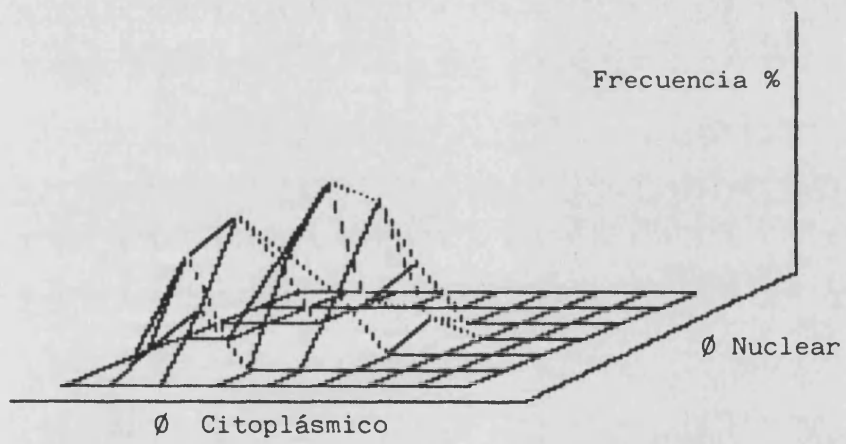
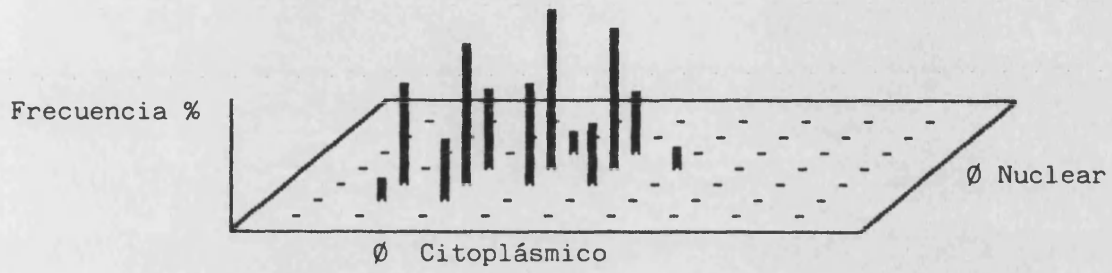


FIGURA 45

CELULAS MARCADAS -41 HORAS-

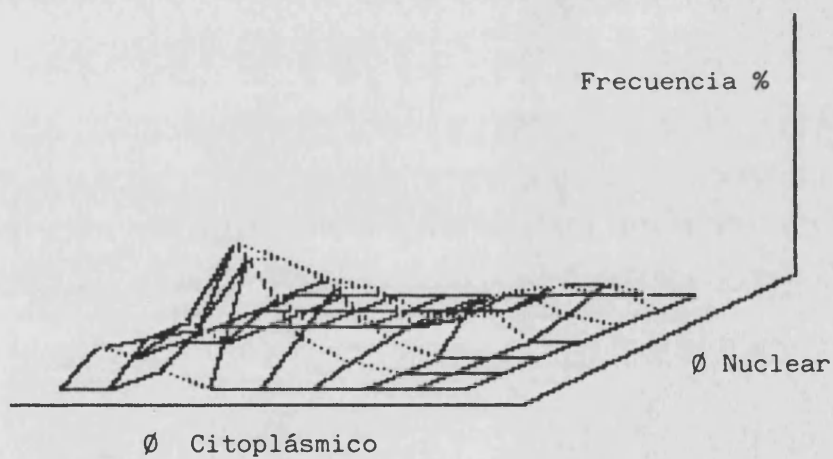
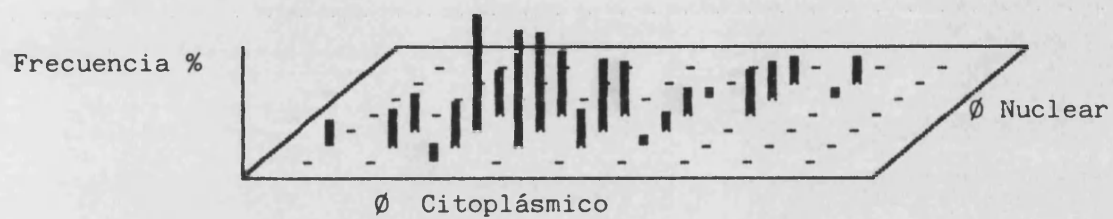


FIGURA 46

CELULAS MARCADAS -42 HORAS-

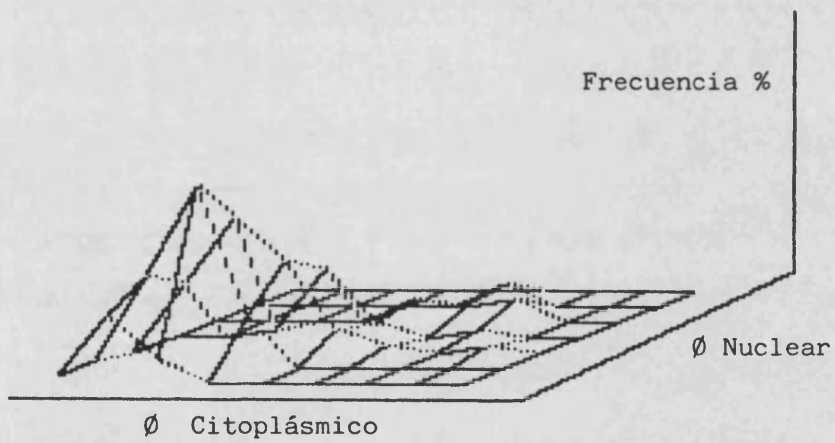
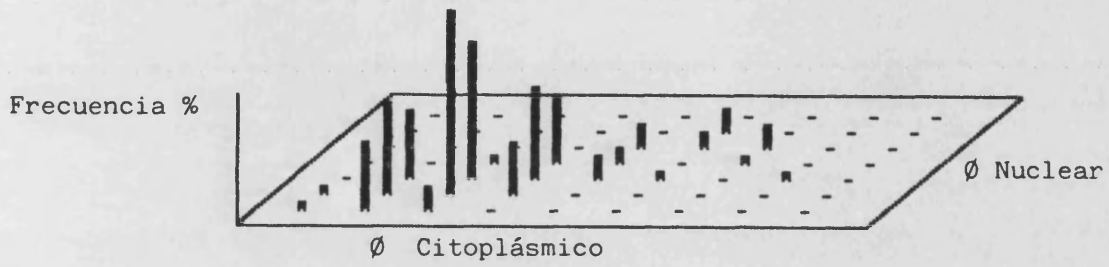


FIGURA 47

CELULAS MARCADAS -43 HORAS-

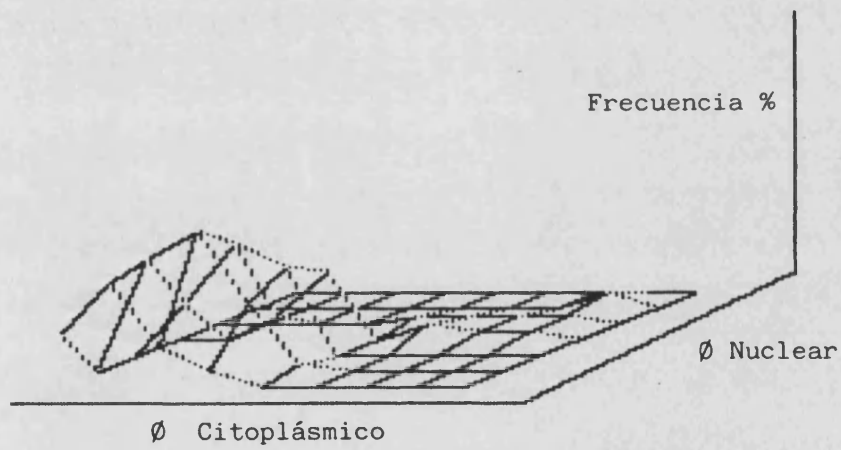
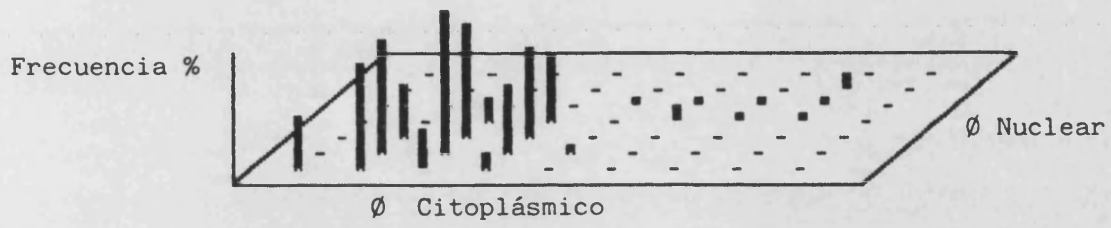


FIGURA 48

CELULAS MARCADAS -44 HORAS-

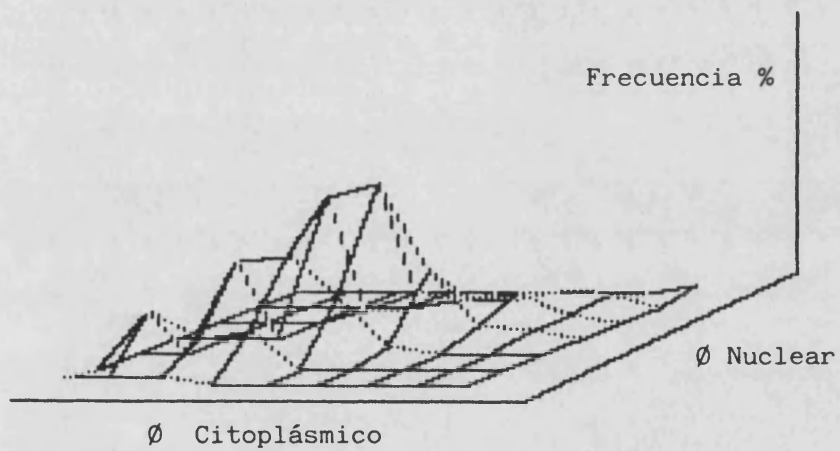
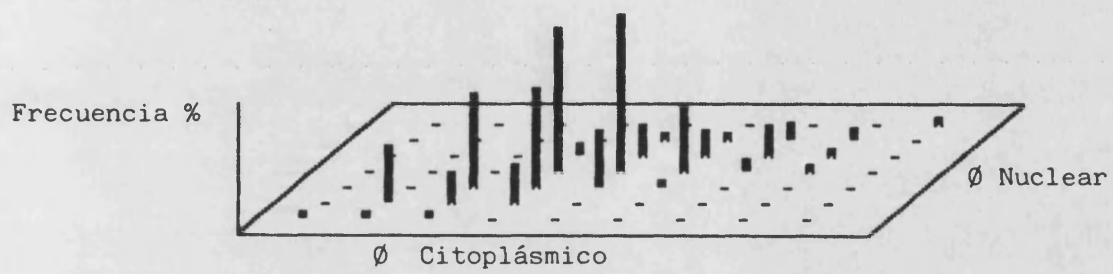


FIGURA 49

CELULAS NO MARCADAS -40 HORAS-

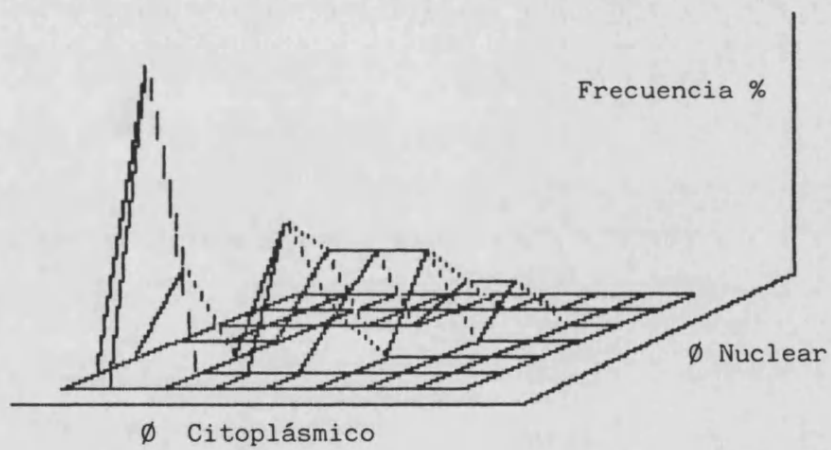
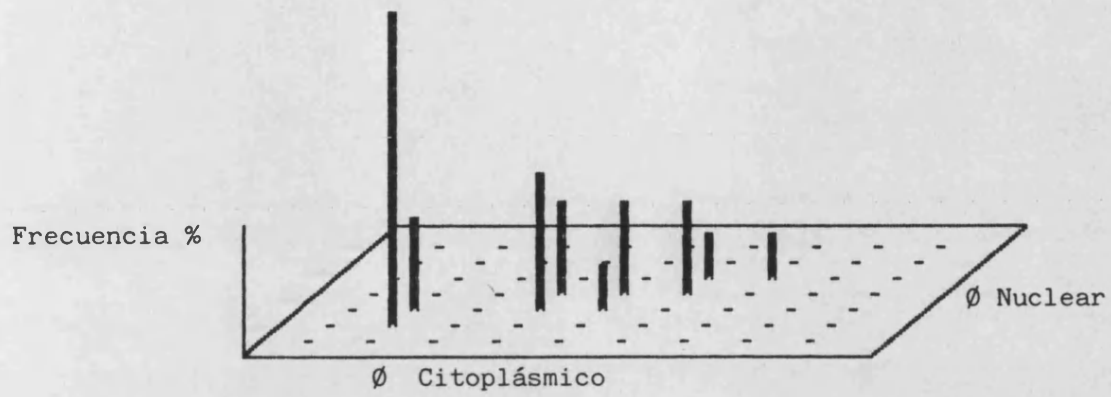


FIGURA 50

CELULAS NO MARCADAS -41 HORAS-

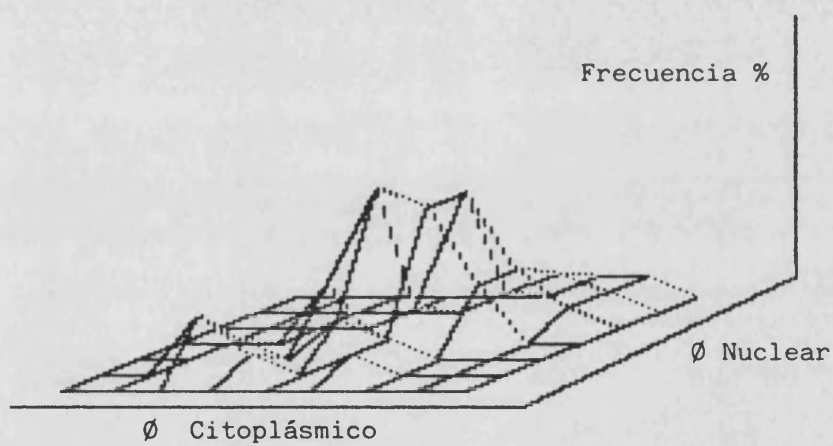
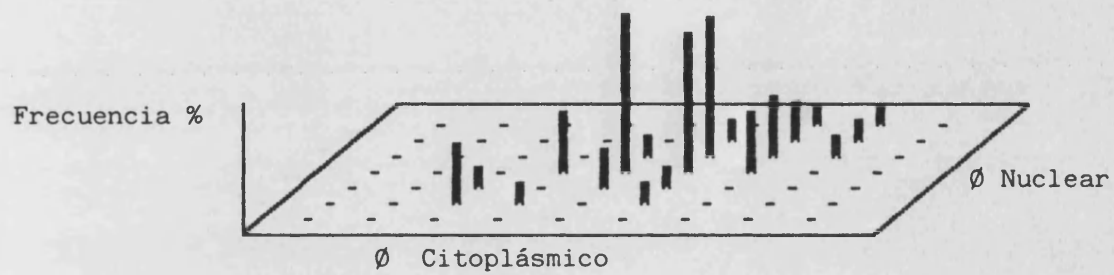


FIGURA 51

CELULAS NO MARCADAS -42 HORAS-

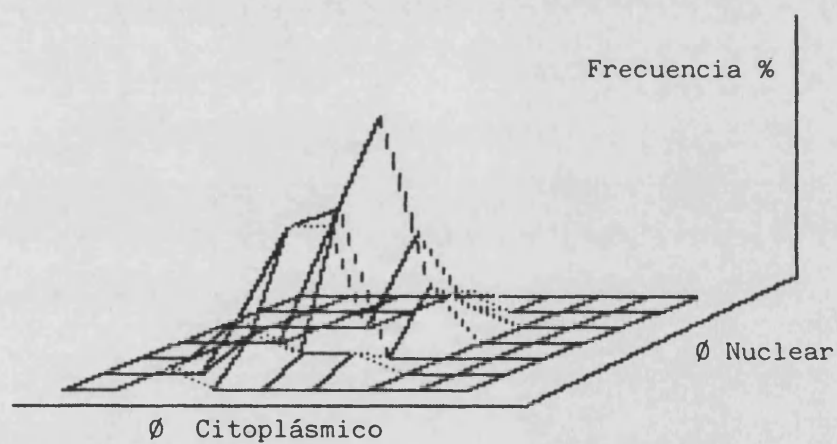
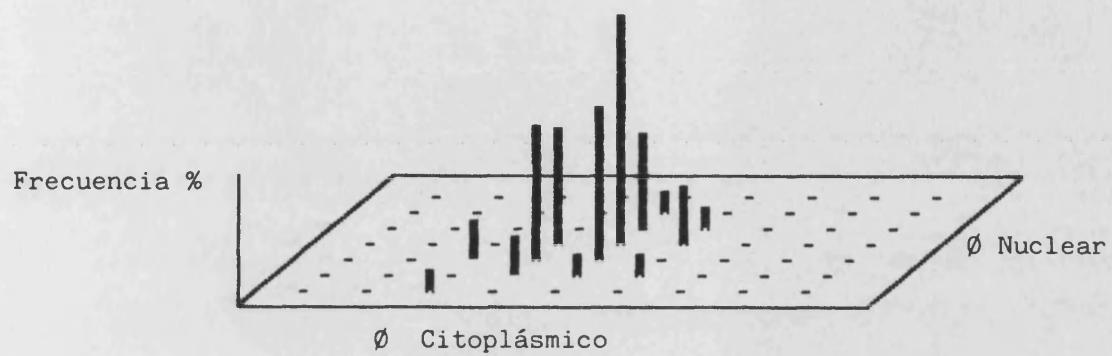


FIGURA 52



CELULAS NO MARCADAS -43 HORAS-

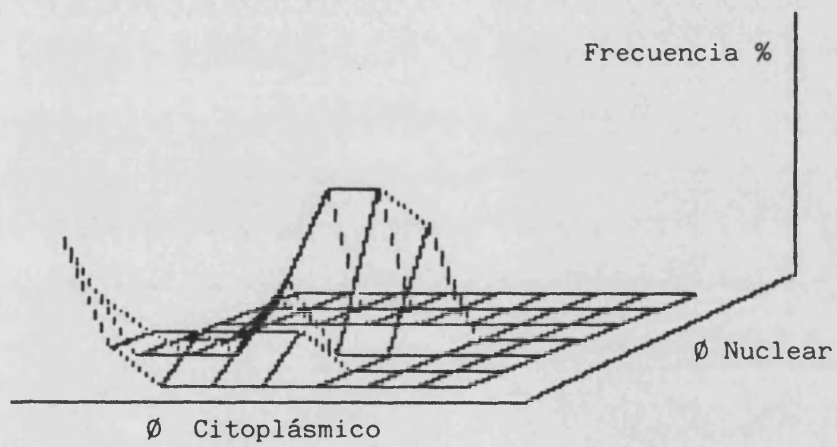
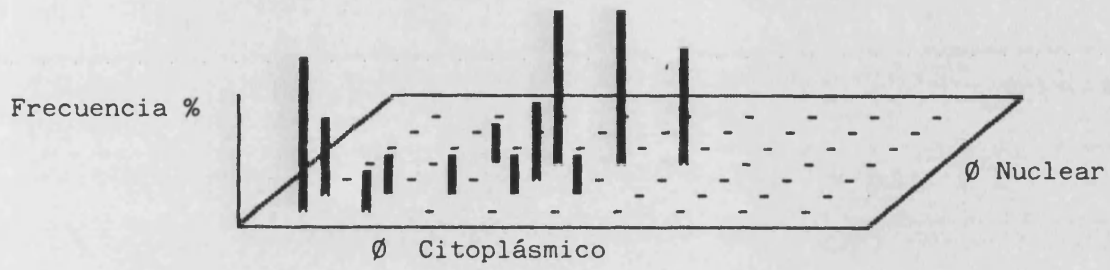


FIGURA 53

CELULAS NO MARCADAS -44 HORAS-

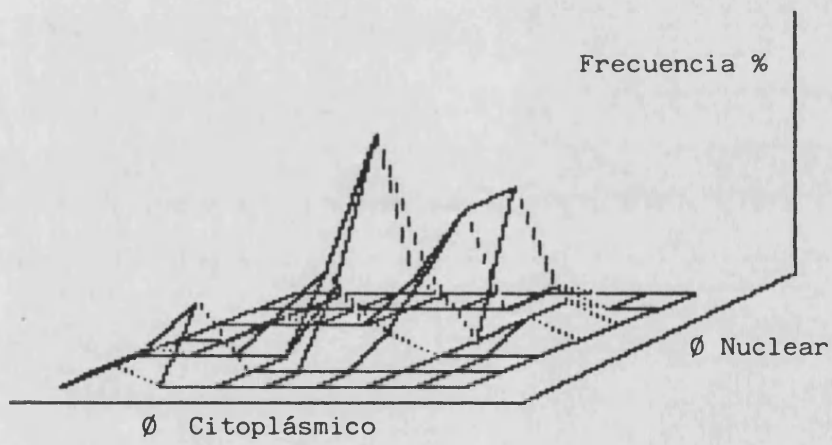
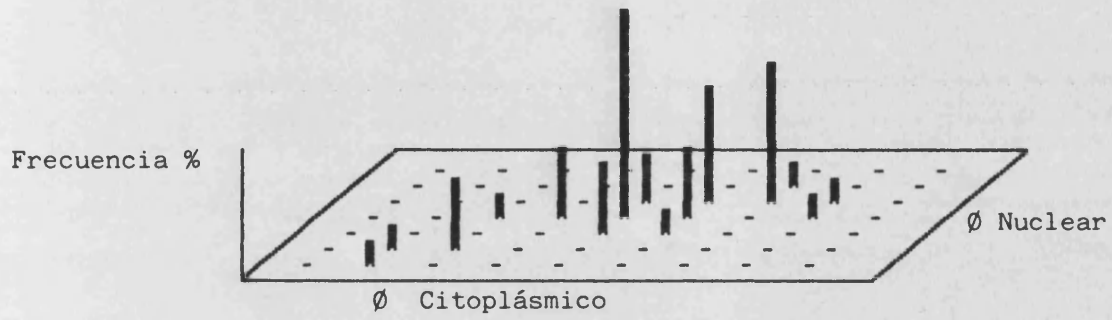
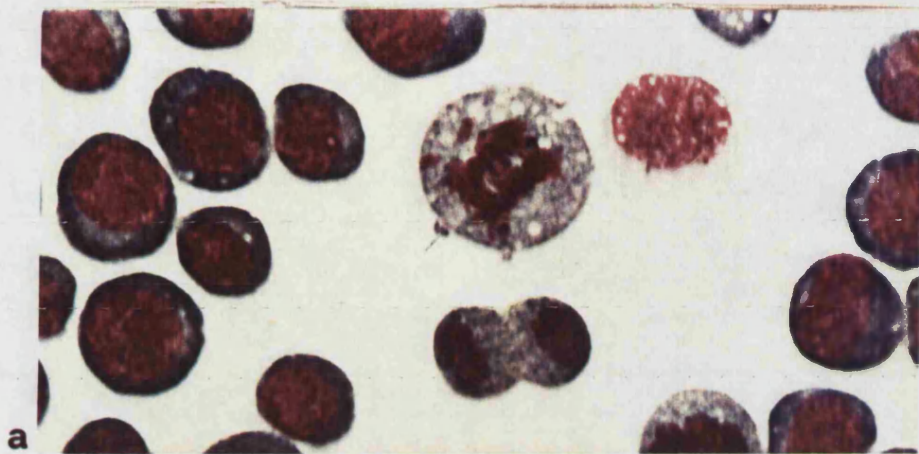
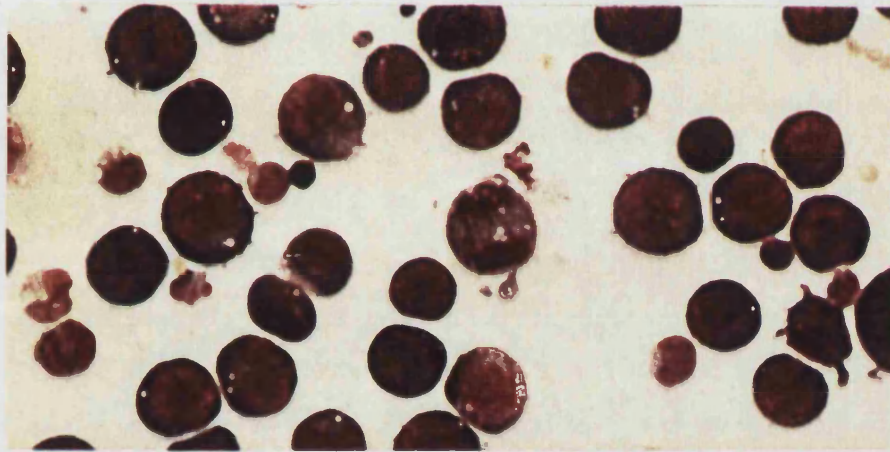


FIGURA 54



a

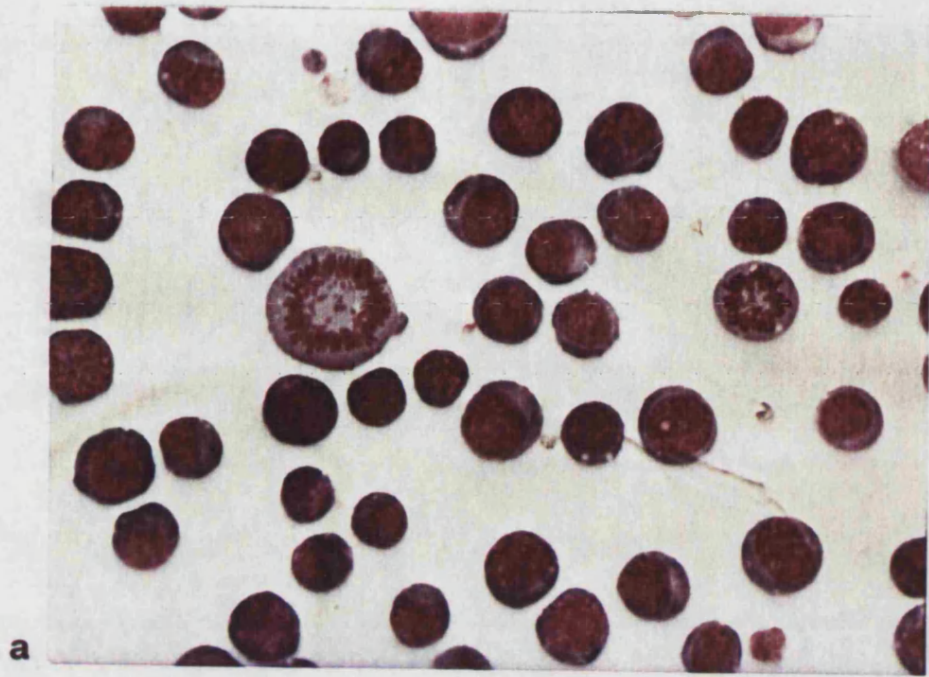


b

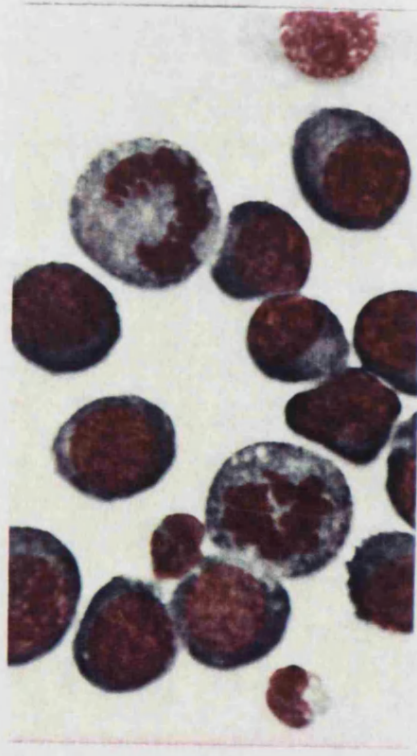


c

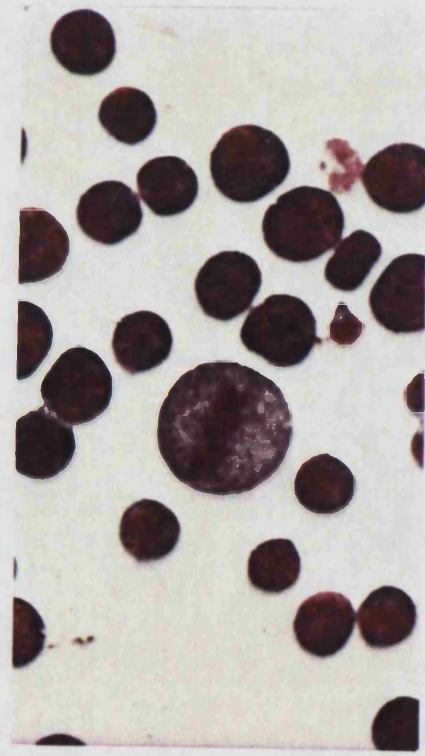
FIGURA 55: a) Anafase con cromosomas no orientados (x2400)  
 b) Anafase con cromosomas estirado (x1500)  
 c) telofase con filamento de conexión y micronucleo (x1500)



a

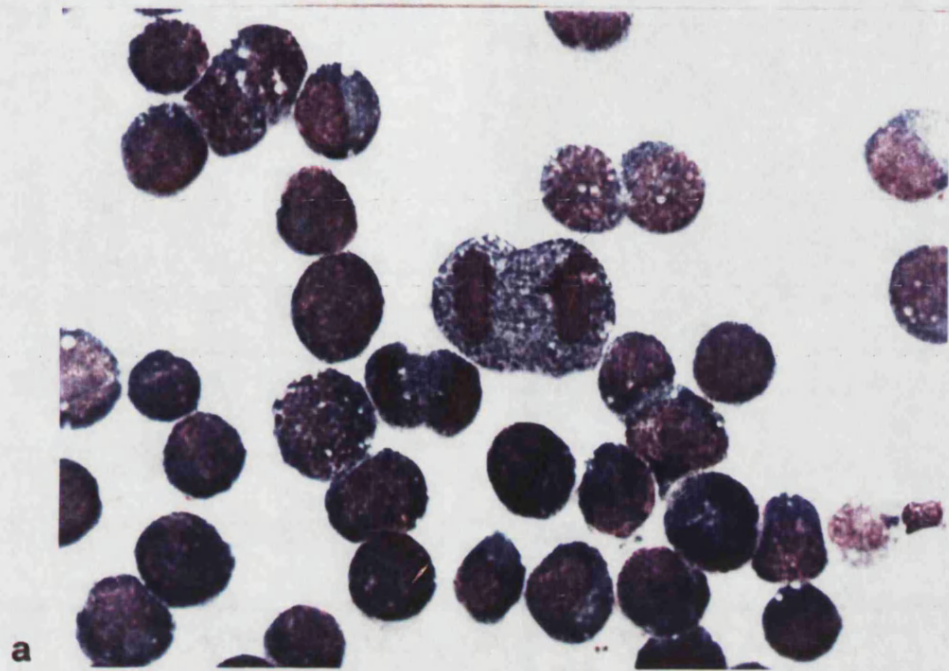


b

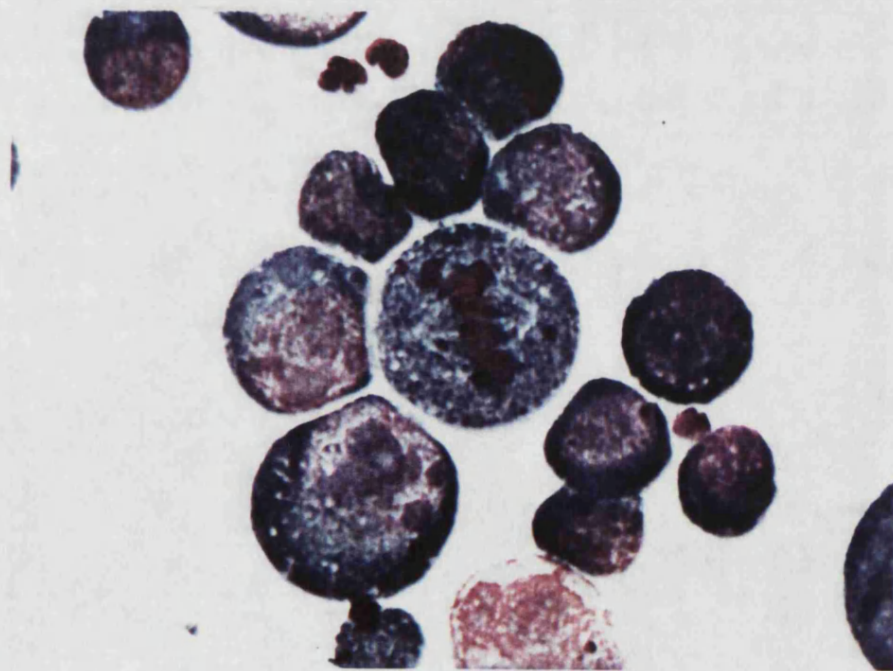


c

FIGURA 56: a) Metafase grande y pequeña (x1500)  
b) Metafases con placas incompletas (x2400)  
c) Metafase normal (x1500)

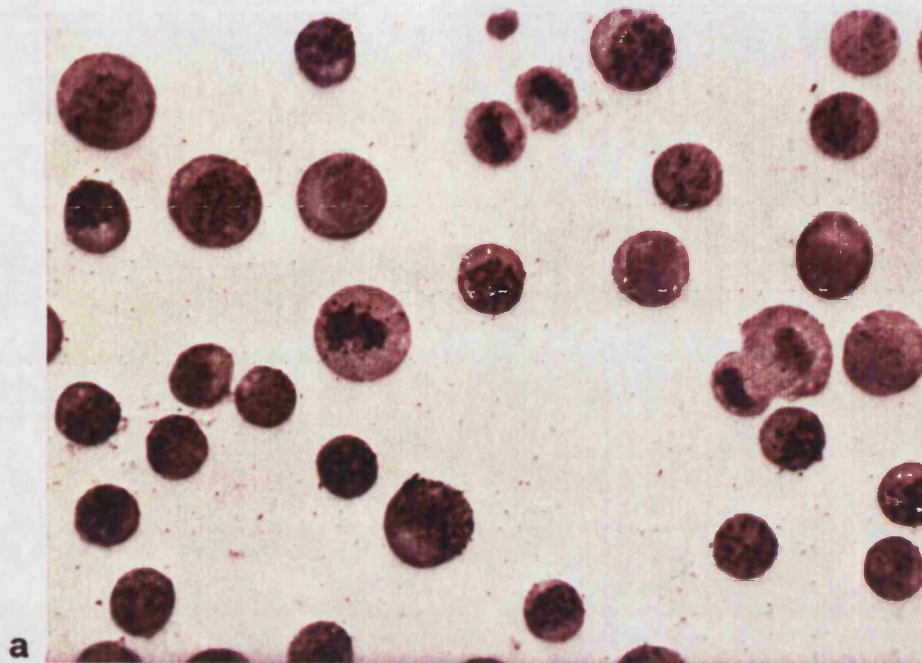


a

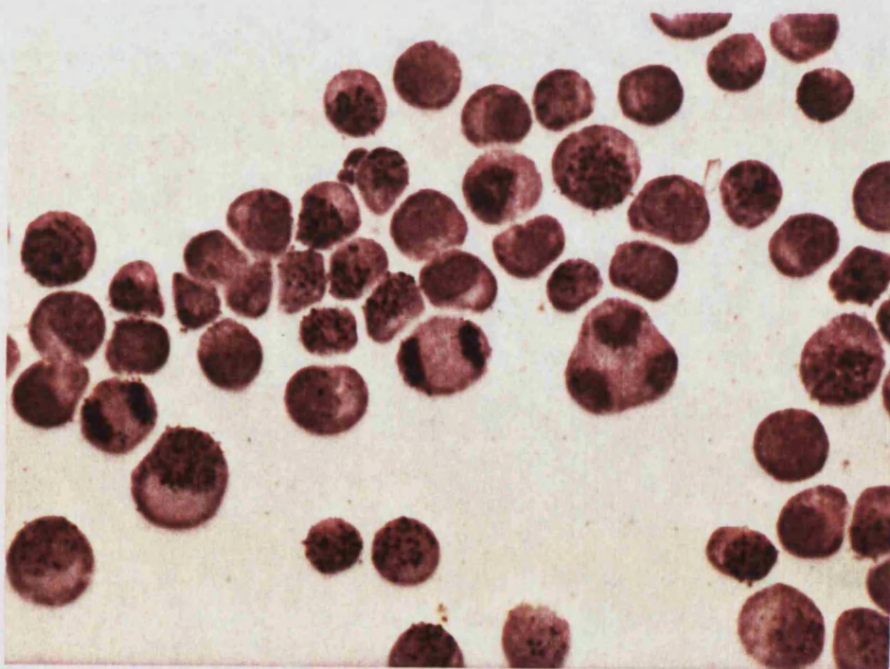


b

FIGURA 57: a) Telofase grande y pequeña (x1500)  
b) Metafase con cromosomas no orientados  
(x2400)



a



b

FIGURA 58: a) Telofase marcada y no marcada (x1500)  
b) Tripolar no marcada (x1500)

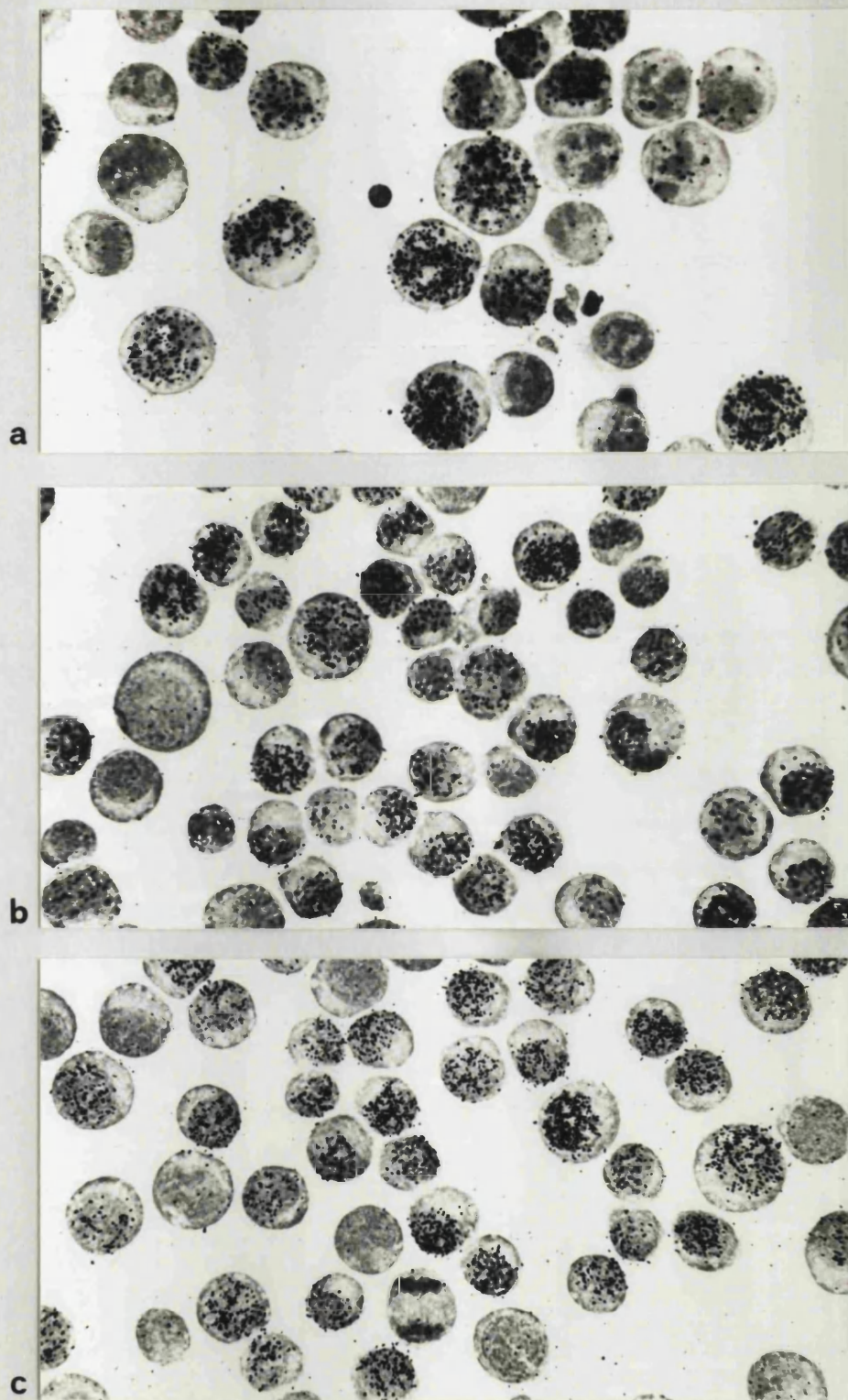


FIGURA 59: a) Celulas marcadas y no marcadas. (x2400)  
b) Profase marcada (x1500)  
c) Profase marcada y anafase no marcada  
(x1500)

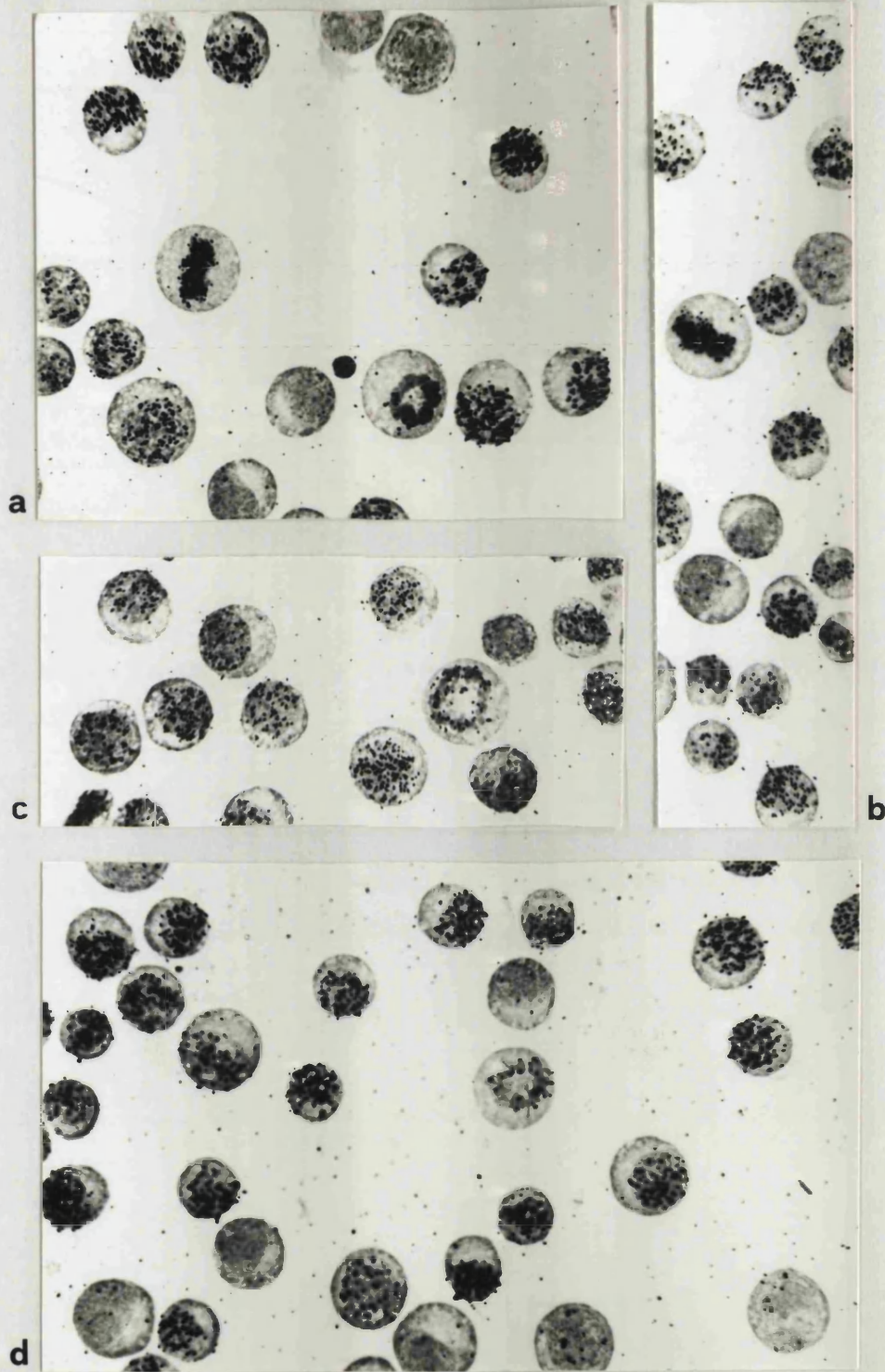


FIGURA 60: a y b) Metafases marcadas vista ecuatorial  
(x1500)  
c y d) Metafases marcadas vista polar (x1500)



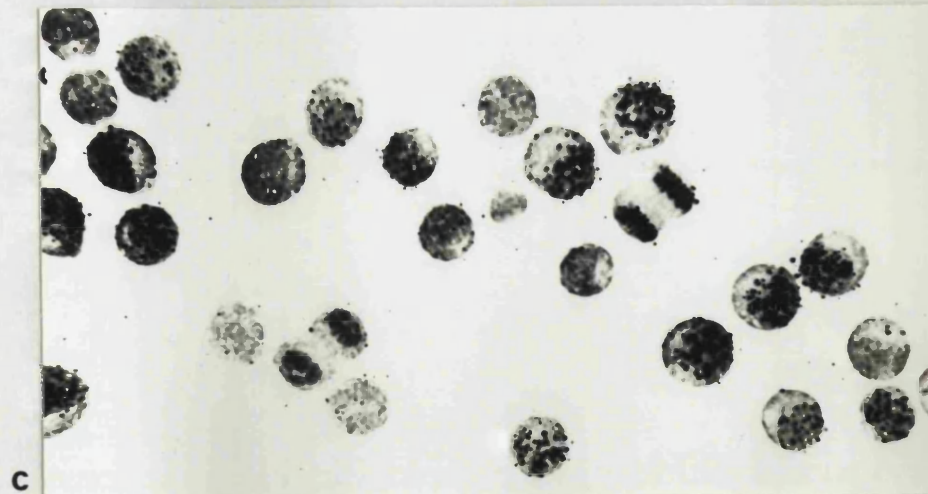
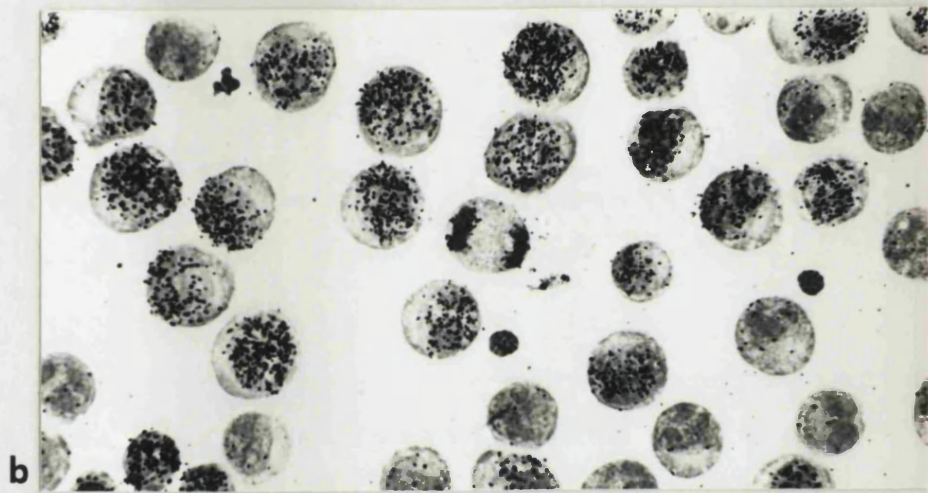
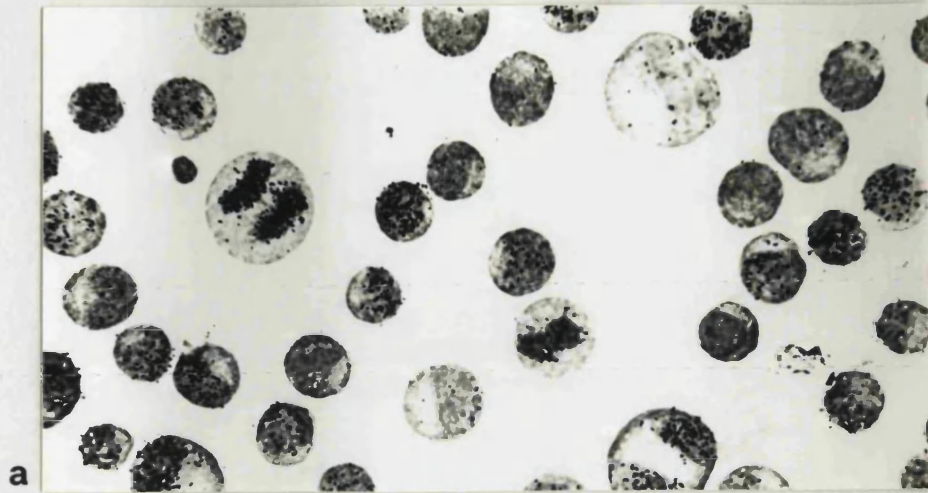


FIGURA 61: a y b) Anafases marcadas (x1500)  
c) Telofase marcada y no marcada (x1500)

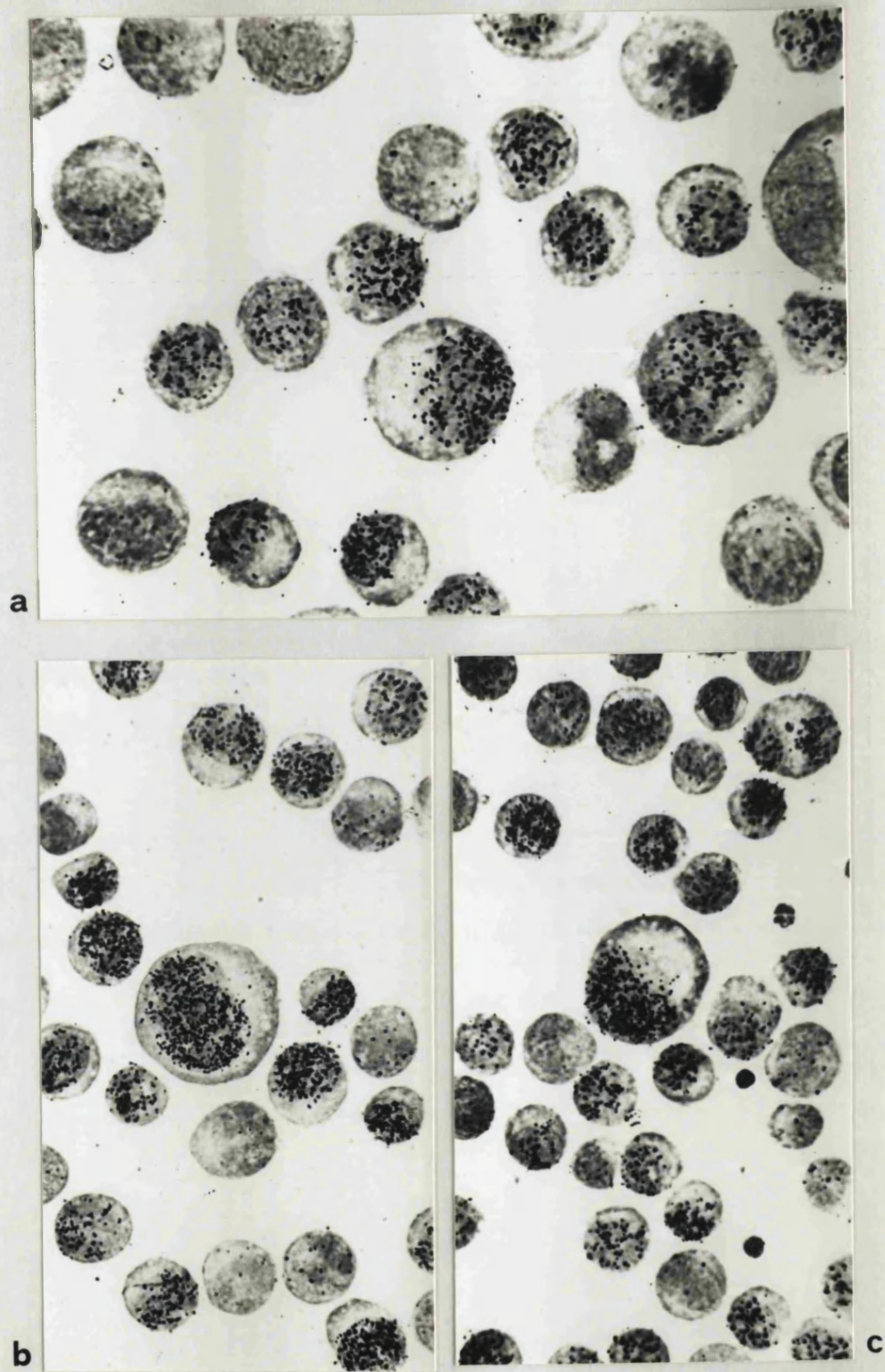
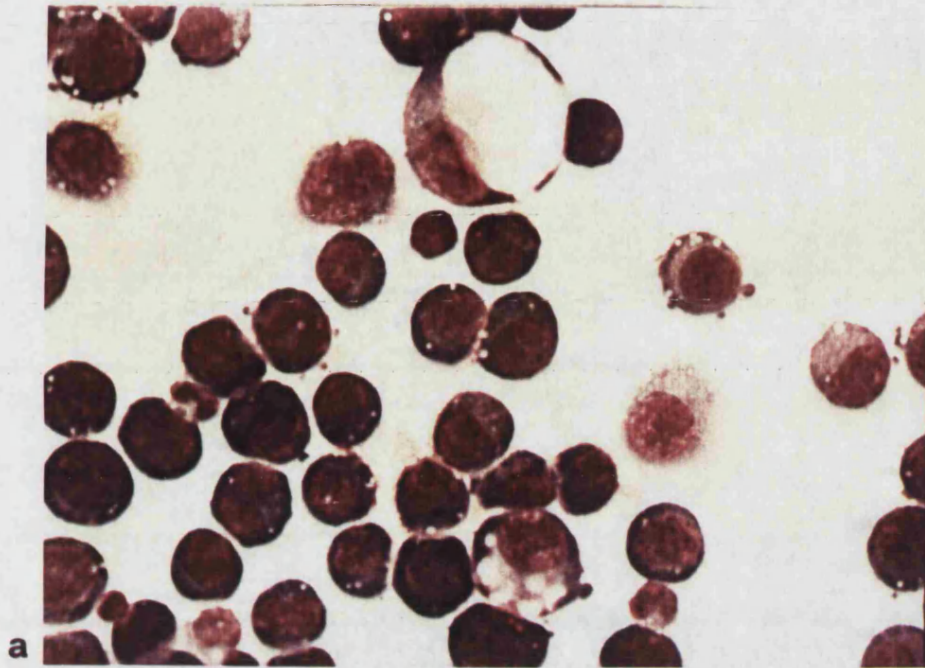
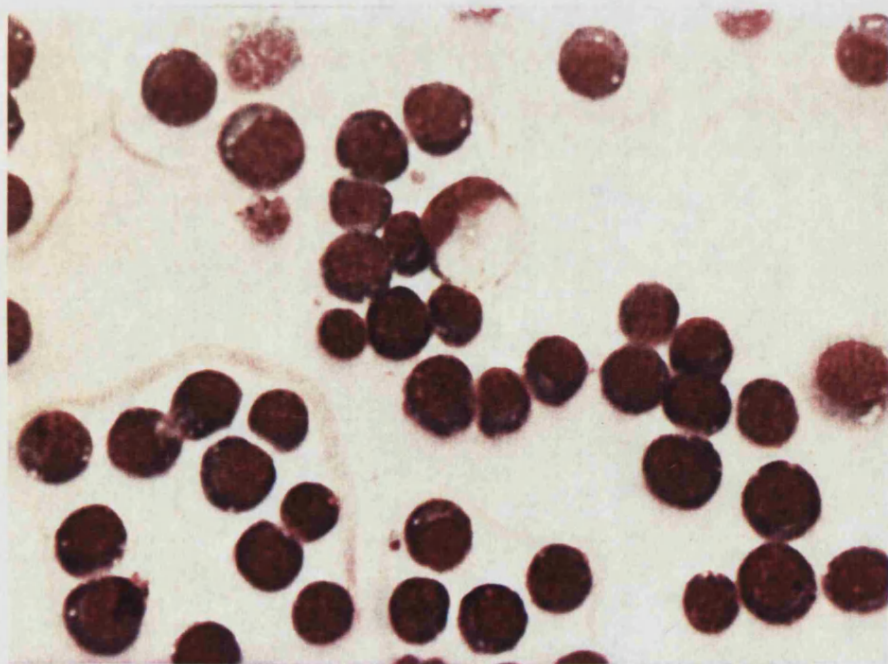


FIGURA 62: a) Marcado. Aspecto general (x2400)  
b y c) Celulas de gran tamaño marcadas (x1500)



a



b

FIGURA 63: a y b) Celulas vacuoladas (x1500)

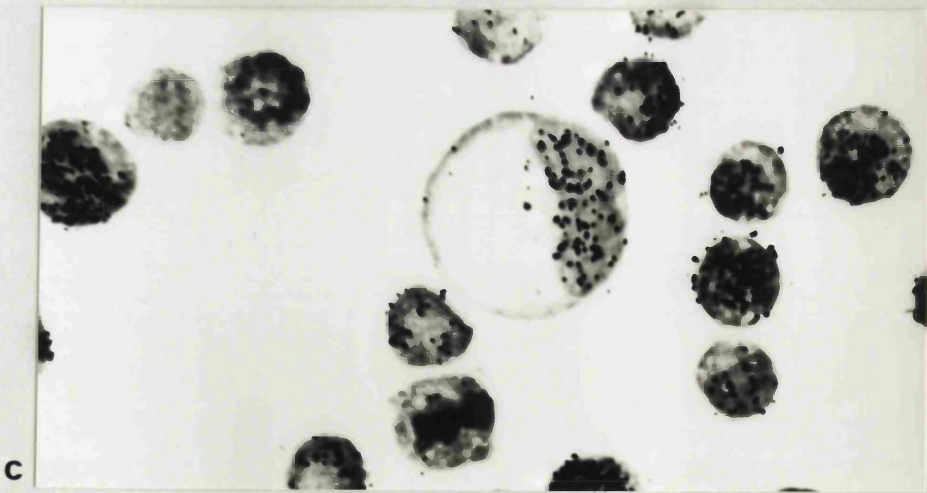
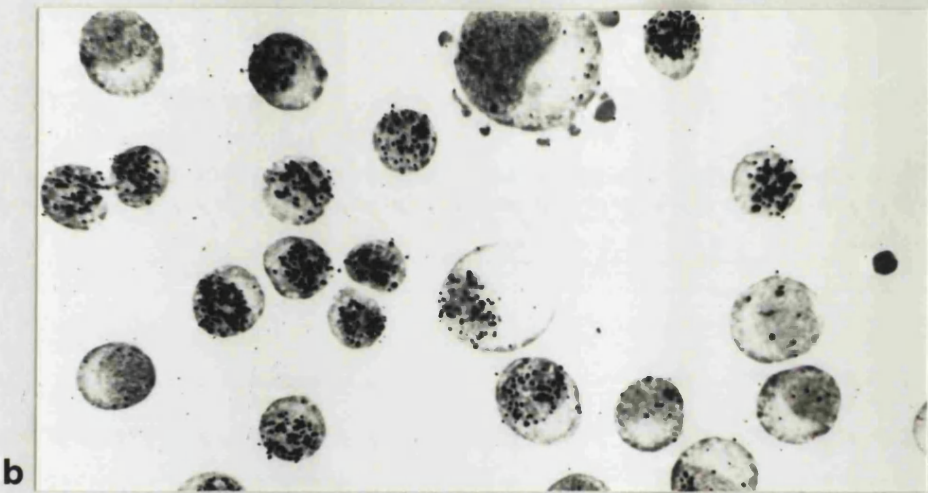
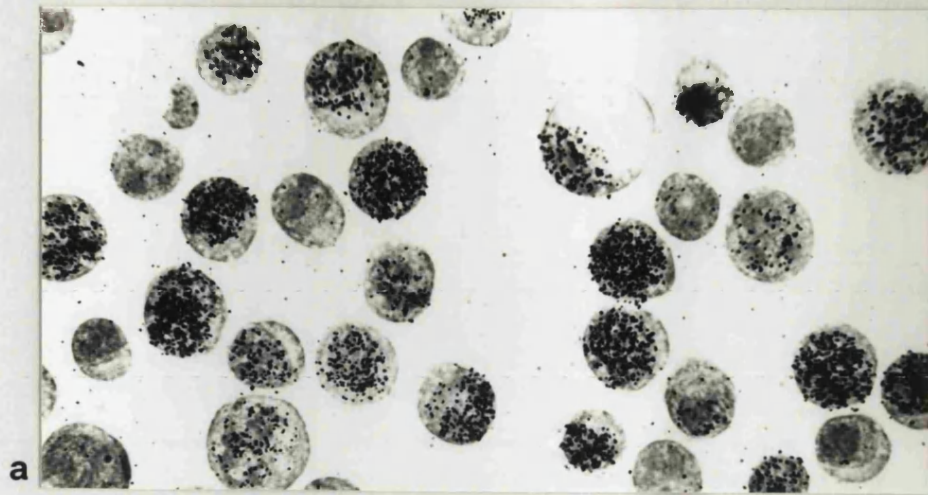


FIGURA 64: a, b y c) Celulas vacuoladas marcadas (x1500)

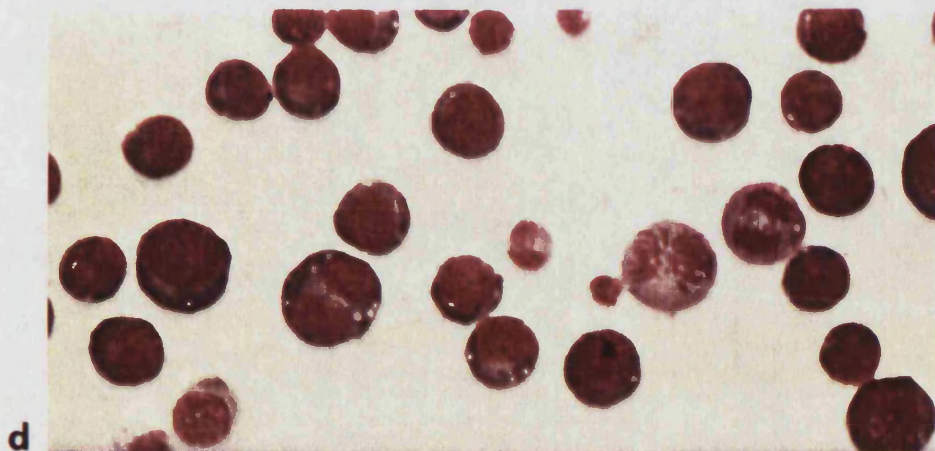
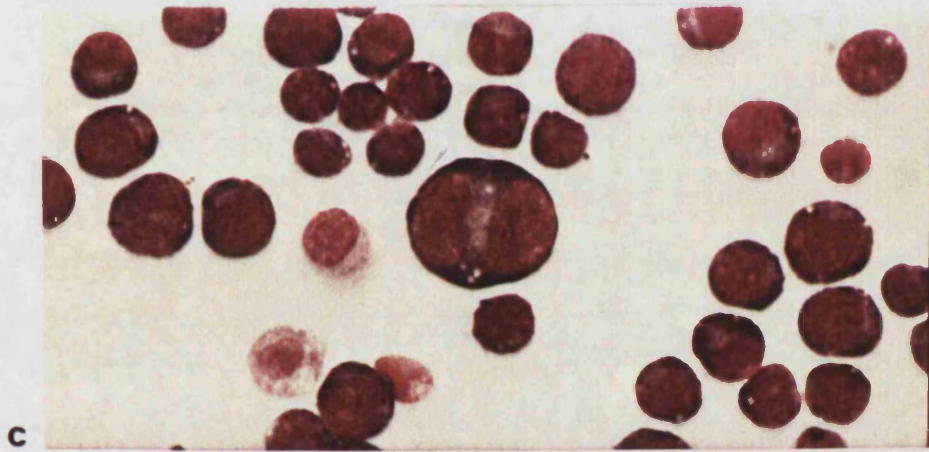
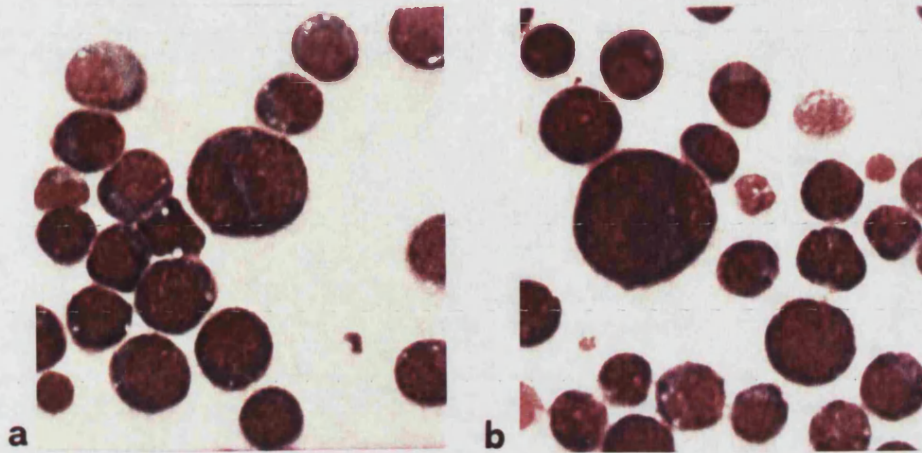
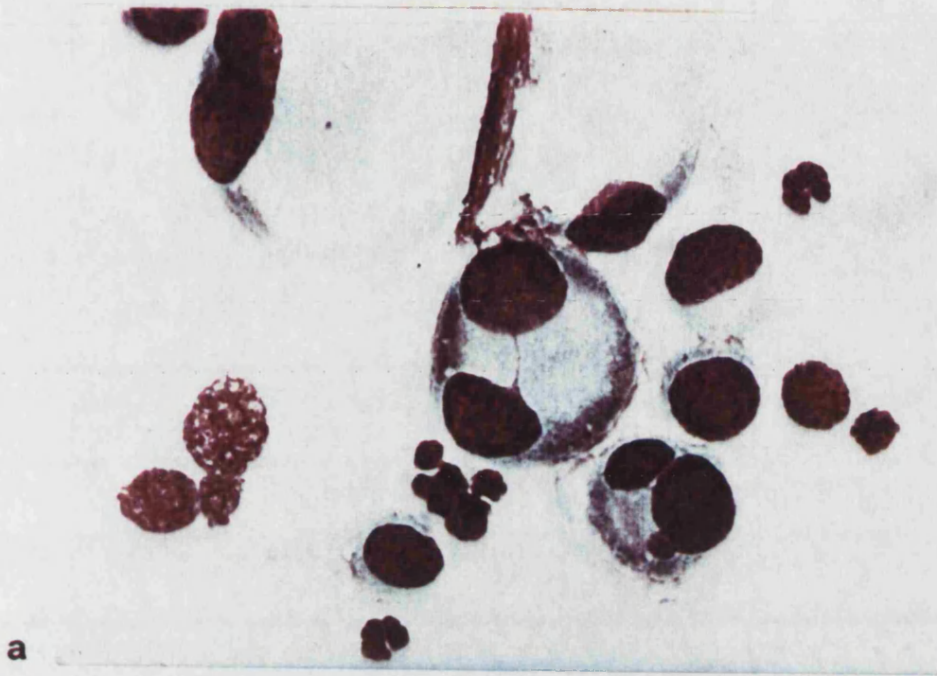
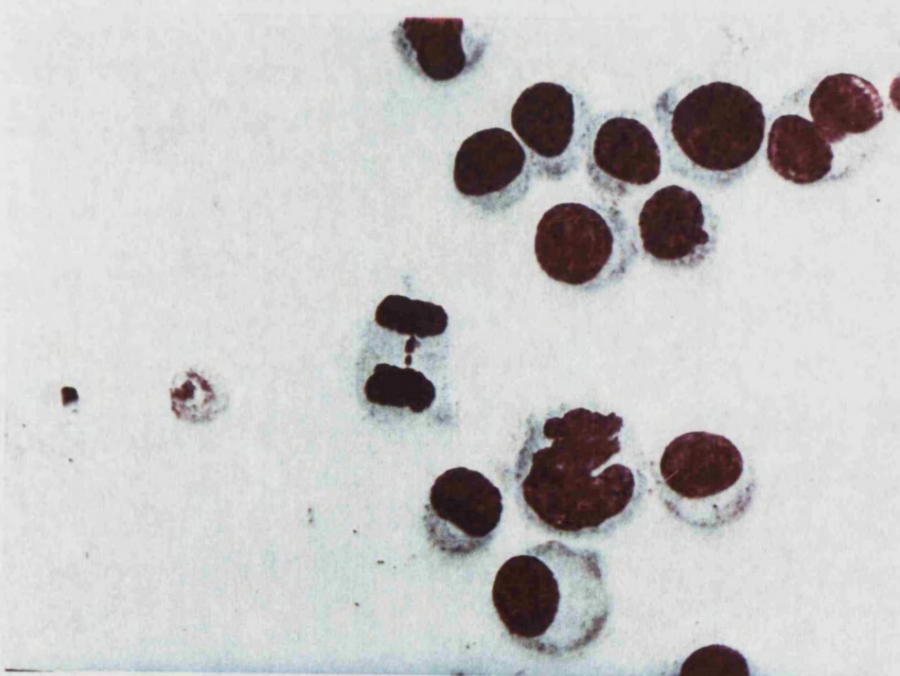


FIGURA 65: a, b, c y d) Celulas binucleadas de distinto tamaño (x1500)

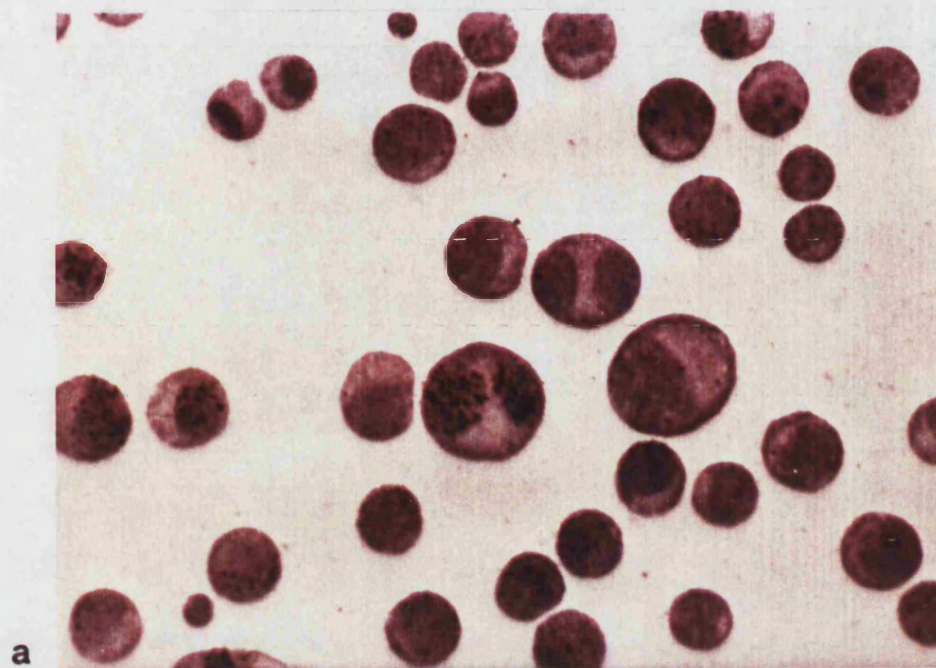


a

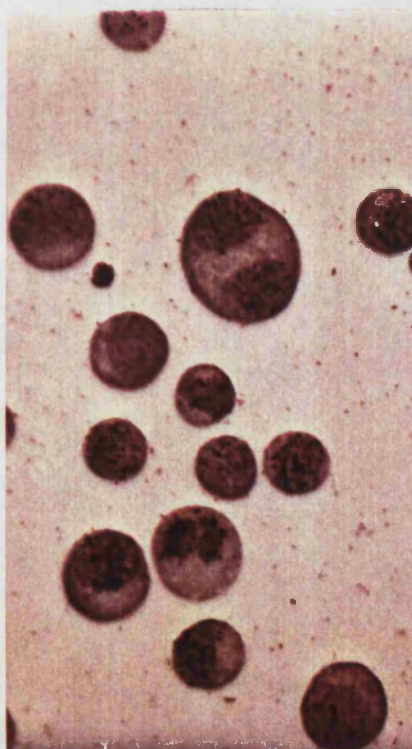


b

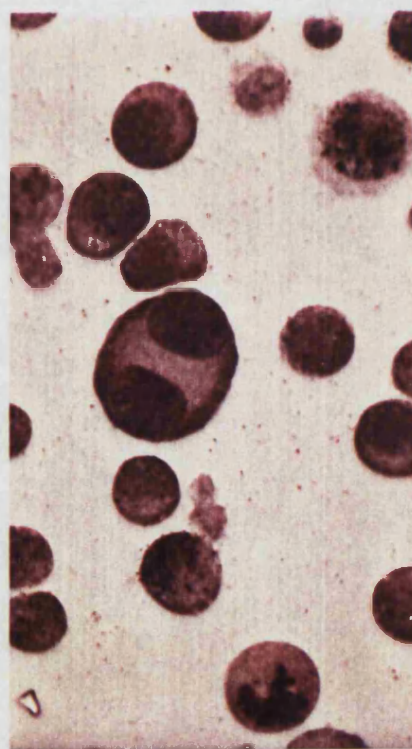
FIGURA 66: a) Binucleada con filamento de conexion (x2000)  
b) Telofase con filamento de conexion (x2000)



a



b



c

FIGURA 67: a, b y c) Celulas binucleadas marcadas y no marcadas (x1500)

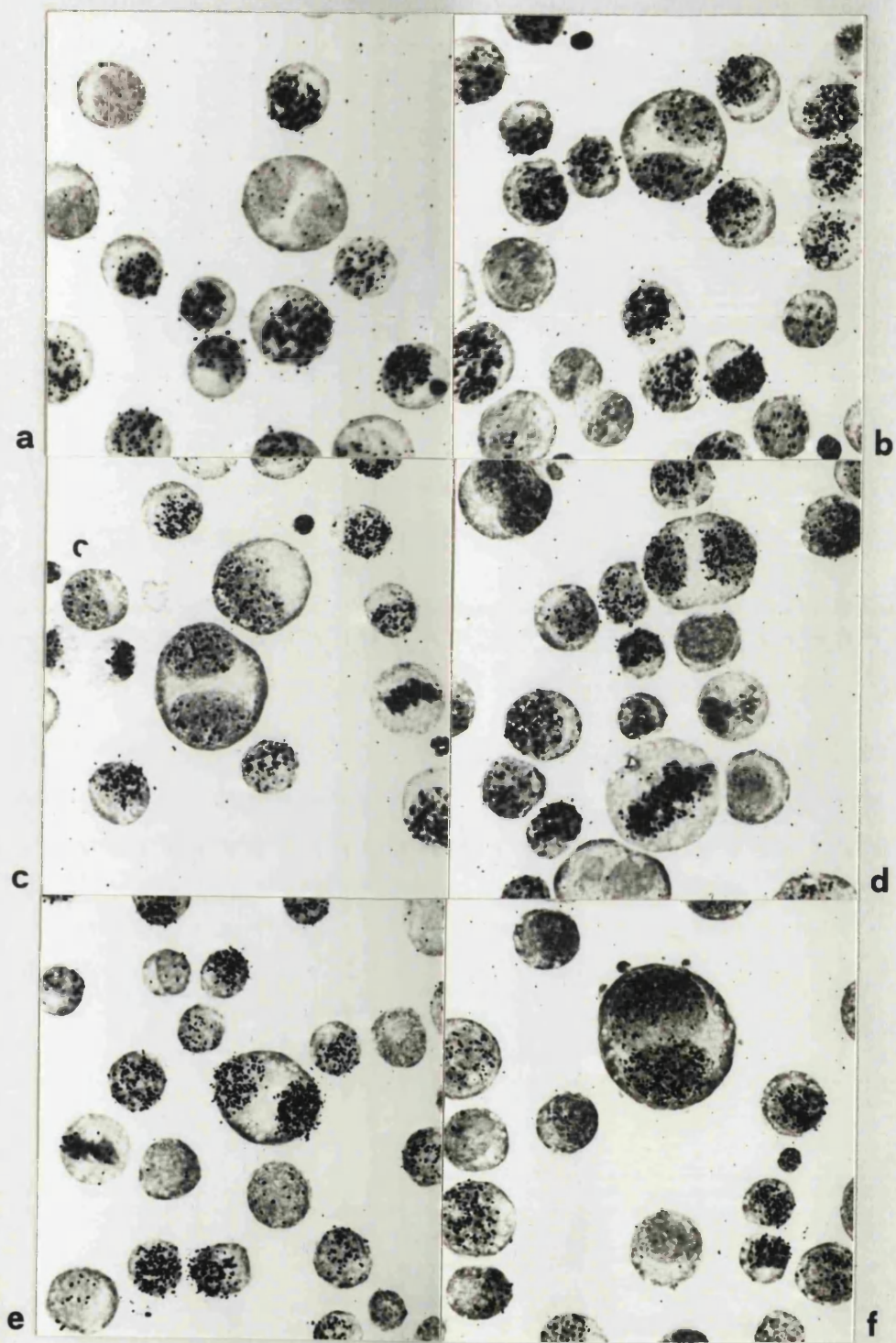


FIGURA 68: Distintos tipos de células binucleadas y marcado. (x1500)



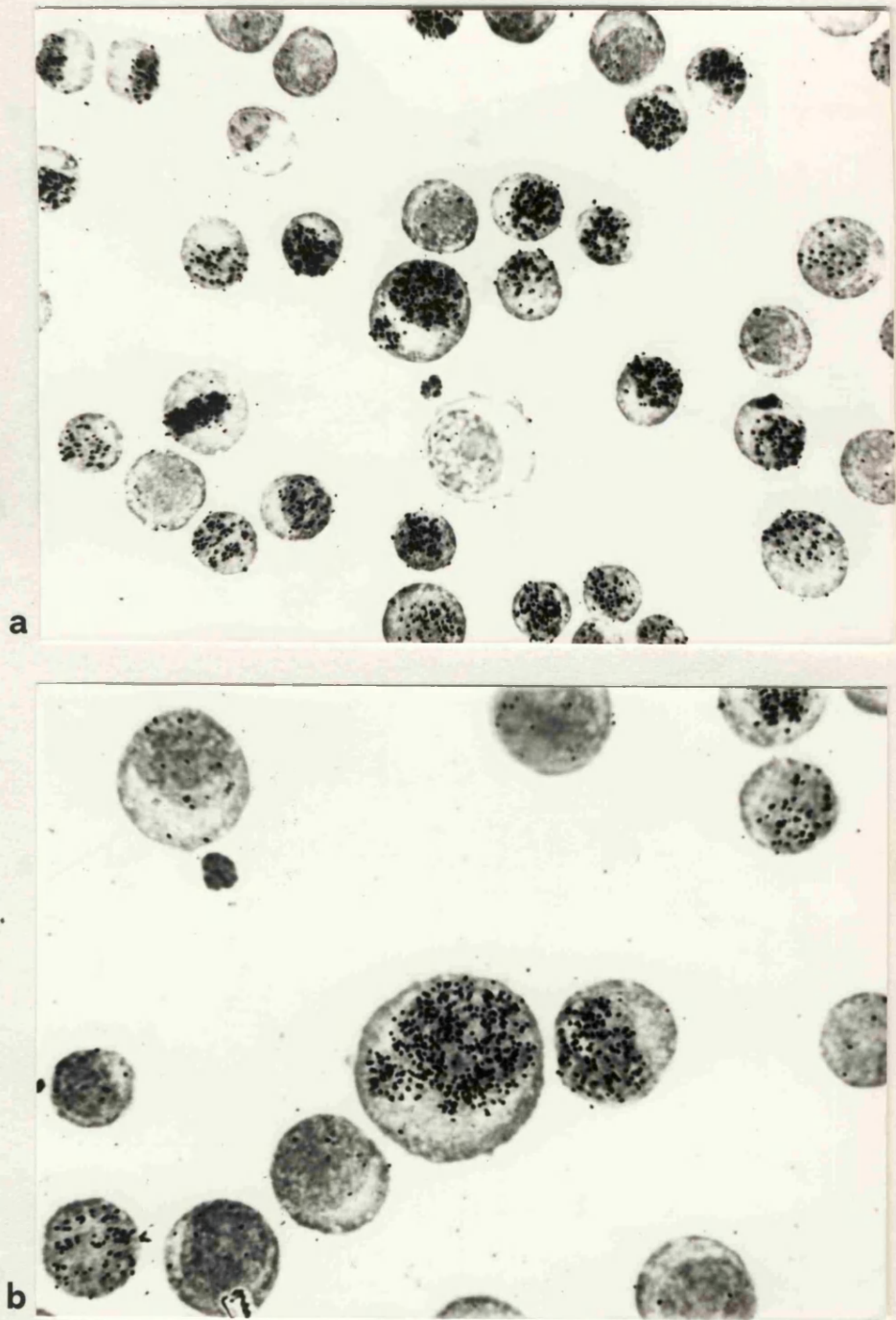


FIGURA 69: Micronucleos en células marcadas. a) (x1500).  
b) (x2400)

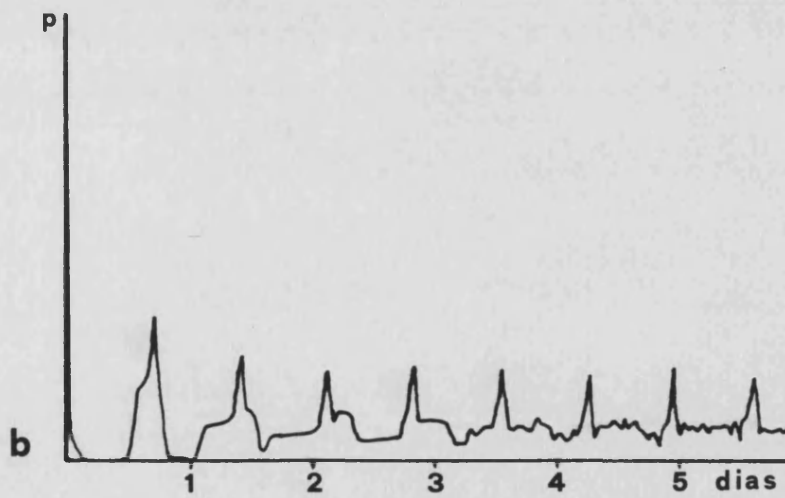
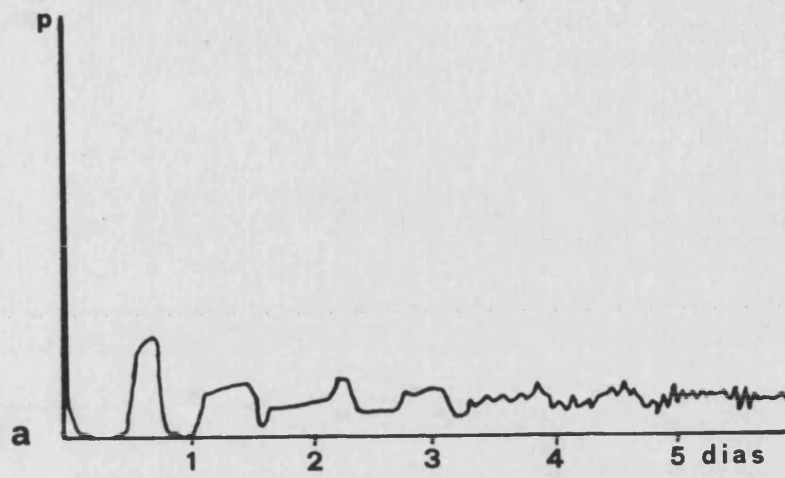


FIGURA 70: a) 24 curvas sin ponderacion.

b) Con ponderacion de la curva de 18 horas.

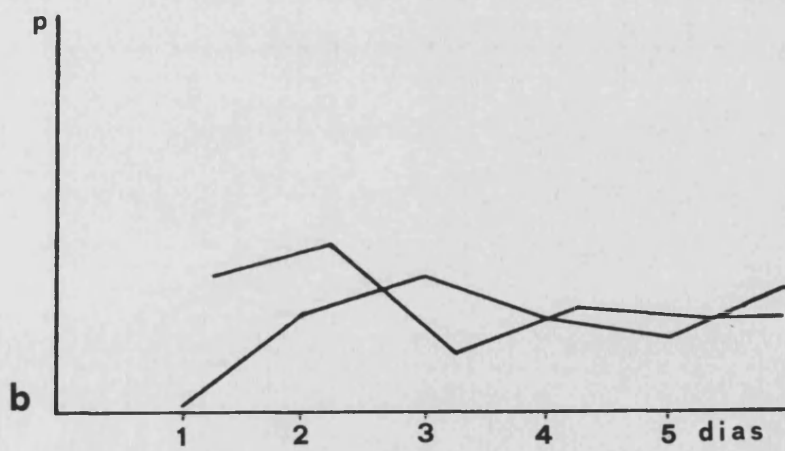
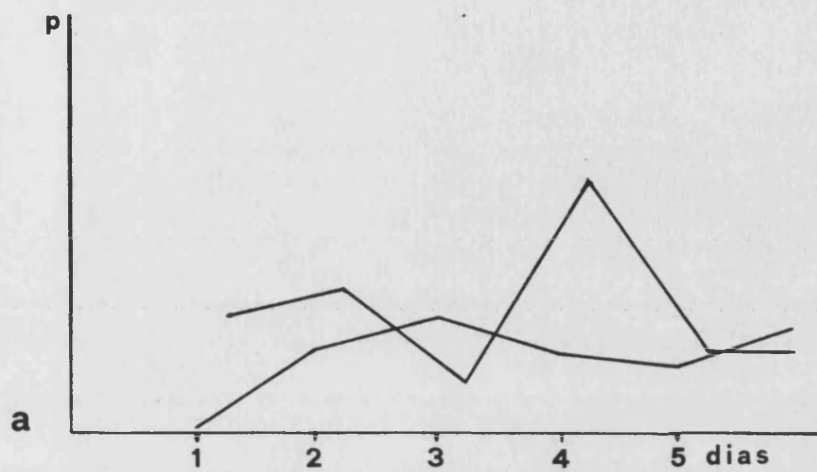


FIGURA 71: a) Toma de muestras cada 24 horas.

Fonderacion.

b) Idem sin ponderacion.

## BIBLIOGRAFIA

- ANDERSSON, G. & AGRELL, I. (1972) Cytoplasmatic and Nuclear Growth during the Proliferation of Ehrlich Ascites Tumour Cells in Mice. Virchows Arch. B Cell Path. 11,1-10.
- ANDERSSON, G. & HEBY, O. (1977) Kinetics of cell proliferation and polyamine synthesis during Ehrlich ascites tumour growth. Cancer Res. 37,4361-4366.
- BASERGA, R. (1966) Cytokinetic analysis of tumor growth. Proc. Nat. Acad. Sciences 56,1735-1742.
- BASERGA, R. (1968) Biochemistry of the cell cycle: a review. Cell Tissue Kinet. 1,167-191.
- BEN-ZE'EV, A. & RAZ, A. (1981) Multinucleation and inhibition of cytokinesis in suspended cells: reversal upon reattachment a substrate. Cell 26,107-115.
- BERGER, C.A. & WITKUS, E.R. (1962) Cytological effects of 5-Fluorouracil. Exp. Cell Res. 27,364-350.
- BOHM, N. & NOLTEMEYER, N. (1981) Development of binuclearity and DNA-polyploidization in the growing mouse liver. Histochem. 72,55-61.
- BRASCH, K. (1980) Endopolyploidy in vertebrate liver: and

- evolutionary perspective. Cell Biol Int. Rep. 4,217-225.
- BRENNAN, H.J., VAITKEVICIUS, V.K. & REBUCK, J.W. (1960) Megaloblastic anemia associated with inhibition of Thymidine synthesis. Observations during 5-Fluorouracil treatment. Blood 16,1535-1545.
- BRONK, B.V. (1979) An approximation method for estimating cell loss from a growing tumor. Biochim. Biophys. Acta 588,241-245.
- BULLOUGH, W.S (1965) Mitotic and functional homeostasis: A speculative review. Cancer Res. 25,1683-1727.
- CONNOLLY, K.M. (1982) Host interaction in the effects of 5-Fluorouracil on Ehrlich ascites tumor cells. Cancer Res. 42,4927-4935.
- DIGERNES, V. & BOLUND, L. (1979) The ploidy classes of adult mouse liver cells. A methodological study with flow cytometry and cell sorting. Virchows Arch. B Cell Path. 32,1-10.
- DETHELEFSEN, L.A., PREWITT, J.M.S. & MENDELSON, M.L. (1968) Analysis of tumor growth curves. J. Nat. Cancer Inst. 40,389-405.
- DOMBERNOWSKY, P., BICHEL, P. & HARTMANN, N.R. (1973) Cytoquintic analysis of de JB-1 ascites tumour at different stages of growth. Cell Tissue Kinet. 6,347-357.
- EHRlich, P. Y APOLANT, H. (1905) Beobachtungen uber maligne Mausetumoren. Berl. Klin. Wchnschr.

42,871-874 (Tomado de Stewart et al. 1959).

EPIFANOVA, O.I. & TERSKIKH, V.V. (1969) On the resting periods in the cell life cycle. Cell Tissue Kinet. 2,75-93.

FOMINA, M.M., MINENKOVA, E.A., POROSHENKO, G.G & EVSEENKO, L.S. (1978) Polymorphism of tumor cell populations and selective processes: I. Subpopulations of tumor cells of Ehrlich-I. Ch. Ph. ascites strain. Tsitologiya 20,563-569.

FOMINA, M.M., MINENKOVA, E.A., EVSSENKO, L.S. & POROSHENKO, G.G. (1979a) Polymorphism of a population of tumor cells and selective processes: II. Changes in the quantitative ratio of 2 tumor cell subpopulations of the Ehrlich-IKhF mouse ascites strain affected by the cell-free ascitic fluid and its fractions. Tsitologiya 20,1401-1406.

FOMINA, M.M., MINENKOVA, E.A., LANKIN, V.Z. & POROSHENKO, G.G. (1979b) Polymorphism of the tumor cell population and selective processes: III. Changes in the proportion of tumor cell subpopulations of the Ehrlich ascites strain under the action of glucose or sodium succinate. Tsitologiya 21,953-958.

FRINDEL, E., VALLERON, A.J., VASSORT, F. & TUBIANA, M. (1969) Proliferation kinetics of an experimental ascites tumor of the mouse. Cell Tissue Kinet. 2,51-65.

-183-

GHOSH, S. & PAWELETZ, N. (1984) Nuclear asynchrony in

- multinucleate rat kangaroo cells. *Europ. J. Cell Biol.* 35,304-311.
- GOESSENS, G. & LEPOINT, A. (1974) The fine structure of the nucleolus during interphase and mitosis in Ehrlich tumor cells cultivated in vivo. *Exp. Cell Res.* 87,63-72.
- GOLDIE, H. & FELIX, M. (1951) Growth characteristics of the tumor cells transferred serially in the peritoneal fluid of the mouse. *Cancer Res.* 11,73-80.
- GRAHAM, C.F. (1966) The regulation of DNA synthesis and mitosis in multinucleate frog eggs. *J. Cell Sci.* 1,363-368.
- HAUSCHKA, T.S. (1953) Methods of conditioning the graft in tumor transplantation. *J. Nat. Cancer Inst.* 14,723-739.
- HORAKOVA, K., FUSKOVA, A. & CEGLEDYOVA, N. (1976) Sacharose density gradient separation of Ehrlich ascites carcinoma and L-5178Y tumor cells in different cell cycle phases. *Neoplasma* 23,499-505.
- HOWARD, A. & PELC, S.R. (1953) Synthesis of desoxyribonucleic acid in normal and irradiated cells and its relation to chromosome breakage. *Heredity, Suppl.* 6,261-266.
- KALINSNIK, M., VRASPIR-PORENTA, O., LOGONDER-MILINSEK, M. ZORC, M. & PAJNTAR, M. (1979) Stress and Ehrlich ascites tumor in the mouse. *Neoplasma* 26,483-492.
- KAZ'MIN, S.D. & COLOSOV, E.V. (1979) Lactate



- dehydrogenase and malate dehydrogenase isozymes at different stages of the mitotic cycle of Ehrlich tumor cells. Vop. Oncol. (Leningr.) 25,60-64.
- KAZ'MIN, S.D. & SHERBAN, S.D. (1980) Synthesis of nuclear and cytoplasmic proteins in synchronized cells of Ehrlich tumor. Biokhimiya 45,28-34.
- KIM, M. & WOO, K. (1975) Kinetic analysis of cell size and DNA content distributions during tumor cell proliferation: E.A.T. study. Cell Tissue Kinet. 8,197-218.
- KLEIN, G. (1951) Comparative studies of the mouse tumors with respect to their capacity for growth as "Ascites Tumor" and their average N.A. content per cell. Exp. Cell Res. 2,518-573.
- LALA, P.K. & PATT, H.M. (1966) Cytokinetic analysis of tumor growth. Proc. Natl. Acad. Sciences 56,1735-1742.
- LALA, P.K. & PATT, H.M. (1968) A characterization of the boundary between the cycling and resting states in ascites tumor cells. Cell Tissue Kinet. 1,137-146.
- LALA, P.K. (1972a) Age-specific changes in the proliferation of Ehrlich ascites tumor cells growth as solid tumors. Cancer Res. 32,628-636.
- LALA, P.K. (1972b) Influence of local environment on the growth parameters of the Ehrlich ascites tumor. Europ. J. Cancer 8,197-204.
- LALA, P.K. (1972c) DNA-Synthesis time of bone marrow

- cells in healthy and ascites tumor-bearing mice.  
Cell Tissue Kinet. 5,79-85.
- LALA, P.K. (1974) Dynamics of leucocyte migration into  
the mouse ascites tumor. Cell Tissue Kinet.  
7,293-304.
- LALA, P.K., SANTER, V. & RAHIL, K.S. (1980) Spontaneous  
fusion between Ehrlich ascites tumor cells and host  
cells in vivo: Kinetics of hybridization and  
concurrent changes in the histocompatibility profile  
of the tumor after propagation in different host  
strain. Europ. J. Cancer 16,487-510.
- LALA, P.K., TERRIN, M., LIND, C. & KAIZER, L. (1978)  
Hemopoietic redistribution in tumor-bearing mice.  
Exp. Hematol. 6,283-298.
- LAZO, P.A. & SOLS, A. (1980) Pyruvate dehydrogenase  
complex of ascites tumor. Activation by AMP and  
other properties potential significance in metabolic  
regulation. Biochem. J. 190,701-705.
- LEDERER, B. & SANDRITTER, W. (1967) A cytophotometric  
study of DNA and protein content during interphase  
growth of an Ehrlich ascites tumor. Europ. J. Cancer  
3,21-24.
- LEEMAN, U., RUCH, F. & STRAULI, P. (1968)  
Characterization of the nuclei of Ehrlich ascites  
carcinoma by means of quantitative cytochemistry.  
Acta Cytol. 12,381-394.
- LEPOINT, A. (1975) Selection par centrifugation des

- cellules tumorales d'Ehrlich en phaser de presyntese  
du point de vue del ADN. Bull. Asoc. Anat.  
59,203-206.
- LEPOINT, A. (1977) Selection of Ehrlich tumor cells in  
different phases of the cell cycle by Ficoll  
gradient centrifugation. Virchows Arch. B Cell Path.  
25,53-60.
- LEPOINT, A. & GOESSENS, G. (1982) Quantitative analysis  
of Ehrlich tumour cell nucleoli during interphase.  
Exp. Cell Res. 137,456-459.
- LEVAN, A. & LEVAN, G. (1980) The induction of host cell  
mitoses in a trnasplatable ascites tumor.  
Cytogenet. Cell Genet. 26,76-84.
- MINKEL, D.T., DOLHUN, P.J., CALHOUN, B.L., SARYAN, L.A. &  
PETERING, D.H. (1979) Zinc deficiency and growth al  
Ehrlich asacites tumor. Cancer Res. 39,2451-2456.
- MUNDKUR, B. (1967) The submicroscopic basophile structure  
of chromosomes in Ehrlich ascites tumor cells.  
Cancer Res. 27,686-702.
- PATT, H.M & QUASTLER, H. (1963) Radiation effects on cell  
renewal and related systems. Physiol. Rev.  
43,357-401.
- PAPACONSTANTINOU, J. (1967) Molecular aspects of lens  
cell differentiation. Science 156,338-339.
- PAWELETZ, N. (1971) Elektronenmikroskopische  
Untersuchungen an Unterlinien des Ehrlichischen  
Mause-Ascites-Tumors. Cytobiologie 4,103-115.

- PEEL, S. & FLETCHER, P. (1969) Changes occurring during the growth of Ehrlich ascites cells "in vivo". Europ. J. Cancer 5,581-589.
- PELLICER, J.A.; PERTUSA, J. & VIVES, F. (1984) Potentiation of binucleated cell number by 5-Fluorouracil (5-FU) in Ehrlich ascites tumor. In European Study Group for Cell Proliferation. 13th. Meeting. Munich, October 1984.
- PERTUSA, J., VIVES, F. & PELLICER, J.A. (1982) Modelos computerizados de la variacion de los distintos tiempos de ciclo celular de un tumor ascitico de Ehrlich hipertriploide, en los primeros dias de implantacion. I. Variaciones en el indice mitosico. Rev. Esp. Oncol. 29,463-471.
- PERTUSA, J., PELLICER, J.A. & VIVES, F. (1984) Quantitative study of mitosis in E.A.T. hypertriploid using different types of sampling. In European Study Group for Cell Proliferation. 13th. Meeting. Munich, October 1984.
- PRESCOTT, D.M. & GOLDSTEIN, L. (1967) Nuclear-cytoplasmic interaction in DNA synthesis. Science 155,469-470.
- ROBERTS, D.C & COLE, G.E. (1970) The viability and capacity for further division, following tripolar mitosis, of cells of a murine ascites carcinoma "in vitro". Int. J. Cancer 5,238-243.
- RODOVA, M.A., MIKHAILOVA, G.R & NOVOHATSKII, A.S. (1980) Marker chromosomes of murine tumor cell lines. Vopr.

- Onkol. (Leningr.) 26,54-57.
- ROMANOV, Y.A. & STEPANENKO, V.A. (1980) Circadian changes in mitotic activity and DNA synthesis in hypertriploid and hypotetraploid strains of Ehrlich ascites tumor. Byull. Eksp. Biol. Med. 89,187-189.
- ROTHBARTH, K., MAIER, G. & WERNER, D. (1981) Cell density dependent DNA replication in Ehrlich ascites tumor cells. Cancer Letters 12,53-60.
- ROTI ROTI, J.L. & OKADA, S. (1973) A mathematical model of the cell cycle of L5178Y. Cell Tissue Kinet. 6,111-124.
- SARYAN, L.A., MINKEL, D.T., DOLHUN, P., CALHOUN, B., WIELGUS, S., SCHALLER, M. & PETERING, D. (1979) Effects of zinc deficiency on cellular processes and morphology in E.A.T. cells. Cancer Res. 39,2457-2465.
- SCHIFFER, L.M & MARKOE, A.M. (1974) Cytokinetic stability of an Ehrlich ascites tumor. Cell Tissue Kinet. 7,305-308.
- SCHIFFER, L.M., NELSON, J.S.R., DILETTUSO, B., MIGLIORATO, D. & RANDOLPF, W. (1973) Cytokinetics of the S-180 ascites tumor system. Cell Tissue Kinet. 6,165-172.
- SELBY, C.C., BIESELE, J.J y GREY, C.E. (1956) Electron microscope studies of ascites tumor cells. Ann. New York Acad. Sci. 63,748-773.
- SEVERIN, E., MEIER, E.M. & WILLERS, R. (1984) Flow

- cytometric analysis of mouse hepatocyte ploidy. I. Preparative and mathematical protocol. *Cell Tissue Res.* 238,643-647.
- SEVERIN, E., WILLERS, R. & BETTECKEN, T. (1984) Flow cytometric analysis of mouse hepatocyte ploidy. II. The development of polyploidy pattern in four mice strains with different life spans. *Cell Tissue Res.* 238,649-652.
- STEEL, G.G. (1968) Cell loss from experimental tumours. *Cell Tissue Kinet.* 1,193-207.
- STEWART, H.L., SNELL, K.C., DUNHAM, L.J. y SCHLYEN, S.M. (1959) Tumors of undetermined site of origin and undifferentiated histologic pattern. Transplantable and transmissible tumors of animals. *Atlas of tumor pathology. Sec. XII Fas.* 40,317-324.
- SUNGUROV, A.YU., ZHUJKOV, A.G. & AVRAMENKO, T.M. (1983) A study of optical characteristics of Ehrlich ascites carcinoma cells separated by sedimentation rate. *Studia Biophysica.* 98,111-118.
- SUTUO, S. (1981) The mechanisms of endoreduplication. *Cancer Gen. Cytogen.* 3,317-325.
- TANNOCK, F.I. (1969) A comparison of cell proliferation parameters in solid and ascites Ehrlich tumor. *Cancer Res.* 29,1527-1534.
- TONG, T. & CHEN, M. (1979) Cancer-suppressive activity of biological fluids. *Sci. Sin.* 22,835-844.
- TSAI, T.H., ROBERT E.B. & LAWRENCE E.S. (1979) Circadian

influence on the immunization of mice with live BCG and subsequent challenge with Ehrlich ascites carcinoma. *Chronobiologia* 6,187-202.

VINCENT, P.C. & NICHOLLS, A. (1967) Comparison of the growth of the Ehrlich ascites tumor in male and female mice. *Cancer Res.* 27,1058-1065.

VIVES, F. (1984) Crecimiento "in vivo" de una cepa de tumor ascitico de Ehrlich hipertriploide en los primeros dias de implantacion. Tesis de Licenciatura. Valencia Noviembre, 1984.

WIEBEL, F. & BASERGA, R. (1968) Cell proliferation in newly transplanted E.A.T. cells. *Cell Tissue Kinet.* 1,273-280.

WOOD, K.B., WIIG, K.M. & BRENKUS, L.M. (1975) Variation of cell kinetic parameters in relation to the growth rate of the Ehrlich ascites tumor. *Cell Tissue Kinet.* 8,387-390.

WOOD, R. (1970) Tumor lipids: identification of sterol ester species in Ehrlich ascites cells. *Cancer Res.* 30,151-154.

YOSHIDA, T. (1952) Studies on an ascitic (reticuloendothelial cell?) sarcoma of the rat. *J. Nat. Cancer Inst.* 12,947-969.

**APENDICE**



TABLA I

Dia	Duracion del Ciclo celular	Factor crecim.	Referencia Autores
	18		Edwards et al. 1960
4	18		Baserga 1966
	18-38		Lennartz y Maurer 1974
1	8		Lala y Patt 1966
4	17		
7	22		
1	16	0.77	Lala y Patt 1968
7	44	0.59	
0	21.5		Wiebel y Baserga 1968
5	47		
2	12	0.9-1.0	Tannock 1969
6	44	0.9-1.0	
10	83	0.6-1.0	
4	16		Bentura 1971
7	43.3		Andersson y Heby 1977
10	76		

TABLA II. DATOS EXPERIMENTO E1

DIA	P. RATON(*)	P. TUMOR(*)	DENSIDAD(#)	IM(&)	ICB(&)
1	25.6 ± 1.3	0.4 ± 0.1	145.0 ± 10.1	22.5 ± 1.1	2.3 ± 0.9
2	26.9 ± 1.8	0.6 ± 0.1	191.2 ± 15.0	11.5 ± 0.9	3.7 ± 0.7
3	27.7 ± 1.1	0.8 ± 0.2	183.6 ± 10.4	15.3 ± 1.5	7.3 ± 0.6
4	29.1 ± 0.9	2.0 ± 0.9	211.0 ± 13.8	16.8 ± 1.1	9.5 ± 0.8
5	29.7 ± 0.8	3.6 ± 0.4	119.0 ± 12.2	24.8 ± 1.7	12.3 ± 0.5
6	30.5 ± 2.0	4.1 ± 0.5	117.6 ± 11.3	19.0 ± 0.7	19.0 ± 1.6

\* en gramos.

# en no. celulas x 2000/mm<sup>3</sup>

& en tantos por mil

TABLA III. DATOS EXPERIMENTO E2

DIA/H	P. RATON(*)	P. TUMOR(*)	DENSIDAD(#)	IM(&)	ICB(&)
1	25.6 ± 0.8	0.3 ± 0.1	103.6 ± 10.3	30.9 ± 1.0	2.6 ± 0.4
1/6	24.6 ± 1.1	0.2 ± 0.1	101.0 ± 9.0	30.5 ± 1.5	3.7 ± 0.8
2	25.5 ± 0.7	0.2 ± 0.1	114.4 ± 10.3	31.4 ± 2.1	2.3 ± 0.4
2/6	25.1 ± 1.6	0.6 ± 0.1	143.0 ± 11.2	18.6 ± 0.7	3.9 ± 0.4
3	27.3 ± 1.3	1.4 ± 0.2	169.8 ± 10.2	28.7 ± 1.7	4.0 ± 0.9
3/6	26.3 ± 1.4	1.4 ± 0.1	175.8 ± 8.5	19.3 ± 1.1	3.5 ± 0.7
4	27.7 ± 0.8	1.8 ± 0.4	136.0 ± 12.1	18.2 ± 1.3	4.9 ± 0.7
4/6	27.1 ± 1.3	2.0 ± 0.3	131.6 ± 11.2	21.6 ± 1.4	4.6 ± 0.9
5	28.8 ± 1.2	3.6 ± 0.2	137.6 ± 10.7	21.0 ± 1.2	9.3 ± 0.4
5/6	28.8 ± 1.5	3.8 ± 0.4	131.2 ± 10.2	16.8 ± 0.7	9.7 ± 0.8
6	29.7 ± 0.6	4.9 ± 0.2	115.0 ± 9.0	16.1 ± 0.5	8.8 ± 0.4

\* en gramos.

# en no. celulas x 2000/mm<sup>3</sup>

& en tantos por mil

TABLA IV. DATOS EXPERIMENTO E3

DIA/H	P. RATON (*)	P. TUMOR (*)	DENSIDAD (#)	IM (&)	ICB (&)
1	25.7 ± 1.0	0.1 ± 0.1	92.0 ± 5.1	57.7 ± 2.1	4.6 ± 0.1
1/6	25.1 ± 0.9	0.1 ± 0.1	104.7 ± 6.2	36.3 ± 0.8	5.6 ± 0.8
2	25.6 ± 0.4	0.5 ± 0.1	146.4 ± 10.4	38.5 ± 1.0	0.5 ± 0.5
2/6	24.9 ± 0.6	0.5 ± 0.1	170.1 ± 11.2	31.0 ± 1.2	3.5 ± 0.7
3	26.8 ± 0.6	0.6 ± 0.1	182.3 ± 11.2	26.5 ± 1.2	4.0 ± 0.9
3/6	26.2 ± 0.8	0.8 ± 0.2	198.4 ± 10.5	16.5 ± 0.5	6.0 ± 0.6
4	28.0 ± 1.1	0.8 ± 0.1	207.7 ± 12.4	35.0 ± 2.1	8.5 ± 0.4
4/6	28.0 ± 0.5	1.2 ± 0.2	127.2 ± 9.4	26.0 ± 1.5	7.0 ± 0.4
5	29.3 ± 0.6	3.5 ± 0.2	143.5 ± 10.1	16.5 ± 0.7	7.5 ± 0.9
5/6	28.2 ± 0.8	3.8 ± 0.3	154.4 ± 11.7	25.0 ± 1.0	10.0 ± 0.2
6	29.3 ± 1.2	4.3 ± 0.2	90.2 ± 8.2	20.0 ± 0.7	11.5 ± 0.4
6/6	28.4 ± 0.8	4.4 ± 0.1	51.0 ± 2.2	24.3 ± 0.5	10.5 ± 1.1
7	31.3 ± 0.6	5.4 ± 0.3	95.6 ± 6.4	18.5 ± 0.8	15.0 ± 0.7

\* en gramos.

# en no. celulas x 2000/mm<sup>3</sup>

& en tantos por mil

TABLA V. DATOS EXPERIMENTO S1

HORA	P. RATON(*)	P. TUMOR(*)	DENSIDAD(#)	IM(&)	ICB(&)
40	25.7 ± 1.2	0.2 ± 0.1	165.3 ± 9.2	50.3 ± 1.5	4.3 ± 0.5
41	25.8 ± 0.7	0.2 ± 0.1	94.92 ± 8.8	50.0 ± 2.5	5.6 ± 0.7
42	25.5 ± 1.1	0.7 ± 0.1	70.92 ± 6.6	34.5 ± 1.0	3.0 ± 0.4
43	26.2 ± 1.3	0.4 ± 0.2	75.24 ± 5.8	45.0 ± 1.7	2.0 ± 0.3
44	25.0 ± 0.9	0.5 ± 0.1	110.6 ± 8.2	37.0 ± 2.1	3.0 ± 0.4

\* en gramos.

# en no. celulas x 2000/mm<sup>3</sup>

& en tantos por mil

TABLA VI. DATOS EXPERIMENTO S2

MIN.	P.RATON(*)	P.TUMOR(*)	DENSIDAD(#)	IM(&)	ICB(&)
15	32.4 ± 0.5	2.4 ± 0.3	156.5 ± 11.4	29.0 ± 0.4	4.0 ± 0.2
30	30.5 ± 0.9	1.7 ± 0.4	248.0 ± 15.5	36.0 ± 1.2	3.0 ± 0.5
45	29.2 ± 1.0	2.9 ± 0.4	177.2 ± 10.7	33.0 ± 1.1	4.0 ± 0.4
60	25.8 ± 0.5	2.7 ± 0.5	132.5 ± 10.2	32.0 ± 0.9	8.0 ± 0.5
75	31.1 ± 0.9	1.9 ± 0.6	226.0 ± 14.1	21.0 ± 1.5	10.0 ± 0.8

\* en gramos.

# en no. celulas x 2000/mm<sup>3</sup>

& en tantos por mil

TABLA VII. RELACION N/C. 40 HORAS

CLASE	MARCADAS	NO MARCADAS	TOTALES (%)
0.60	0.0	0.0	0.0
0.65	0.0	0.0	0.0
0.70	6.2	4.8	5.8
0.75	18.7	28.6	21.7
0.80	14.6	14.3	14.5
0.85	39.6	42.8	40.6
0.90	10.4	9.5	10.1
0.95	10.4	0.0	7.2

TABLA VIII. RELACION N/C. 41 HORAS

CLASE	MARCADAS	NO MARCADAS	TOTALES (%)
0.60	0.9	2.1	1.3
0.65	7.4	2.1	5.8
0.70	25.0	14.6	21.8
0.75	24.1	29.2	25.6
0.80	6.5	31.2	14.1
0.85	25.0	16.7	22.4
0.90	6.5	4.2	5.8
0.95	4.6	0.0	3.2



TABLA IX. RELACION N/C. 42 HORAS

CLASE	MARCADAS	NO MARCADAS	TOTALES (%)
0.60	0.8	2.0	1.1
0.65	3.2	4.0	3.4
0.70	16.0	20.0	17.1
0.75	31.2	20.0	28.0
0.80	4.0	26.0	10.3
0.85	33.6	26.0	31.4
0.90	10.4	0.0	7.4
0.95	0.8	2.0	1.1

TABLA X. RELACION N/C. 43 HORAS

CLASE	MARCADAS	NO MARCADAS	TOTALES (%)
0.60	1.6	0.0	1.3
0.65	5.5	4.8	5.2
0.70	19.5	8.0	17.6
0.75	28.1	24.0	27.4
0.80	6.2	32.0	10.4
0.85	31.2	20.0	29.4
0.90	5.5	8.0	5.9
0.95	2.3	4.0	2.6

TABLA XI. RELACION N/C. 44 HORAS

CLASE	MARCADAS	NO MARCADAS	TOTALES (%)
0.60	0.0	0.0	0.0
0.65	2.0	4.9	2.6
0.70	12.6	12.2	12.5
0.75	25.3	29.3	26.6
0.80	20.5	34.1	23.4
0.85	36.4	17.1	32.3
0.90	0.6	0.0	0.5
0.95	2.0	2.4	2.1

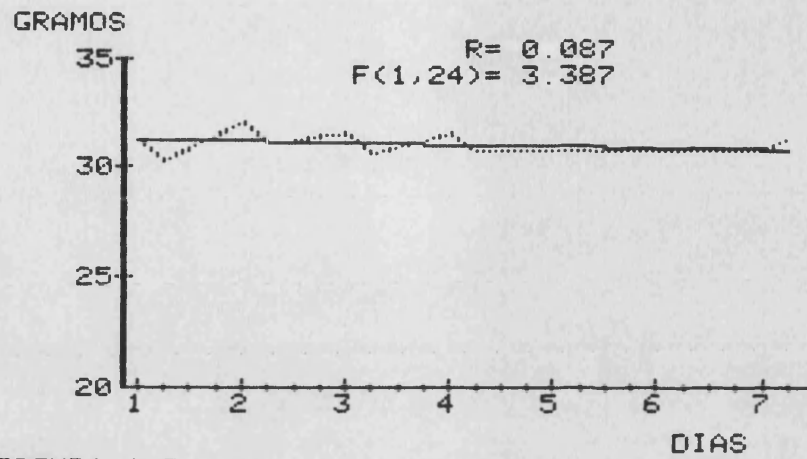


FIGURA 1.R

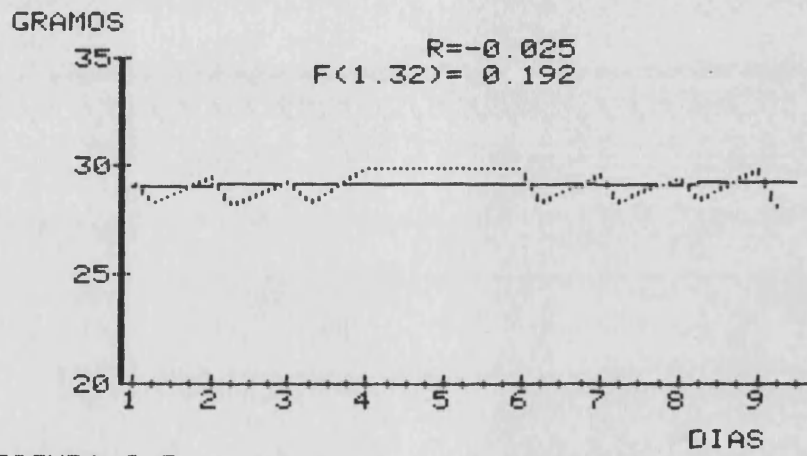


FIGURA 2.R

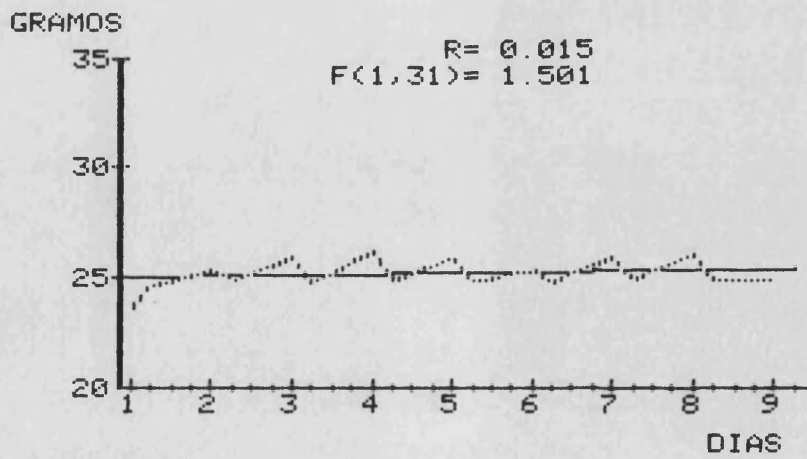


FIGURA 3.R

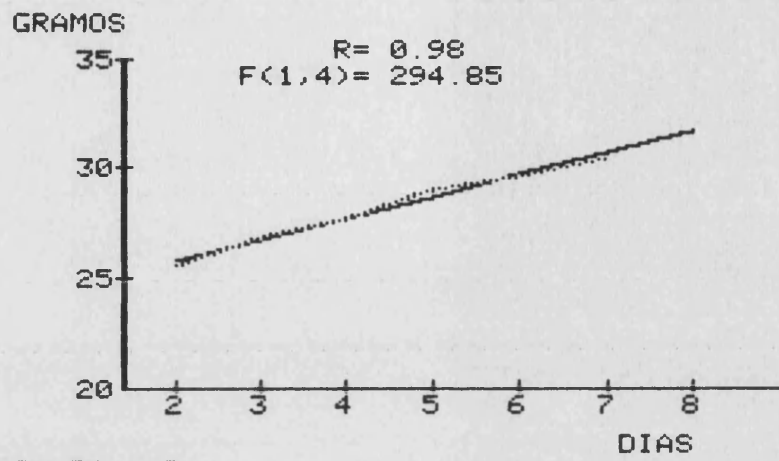


FIGURA 4.R

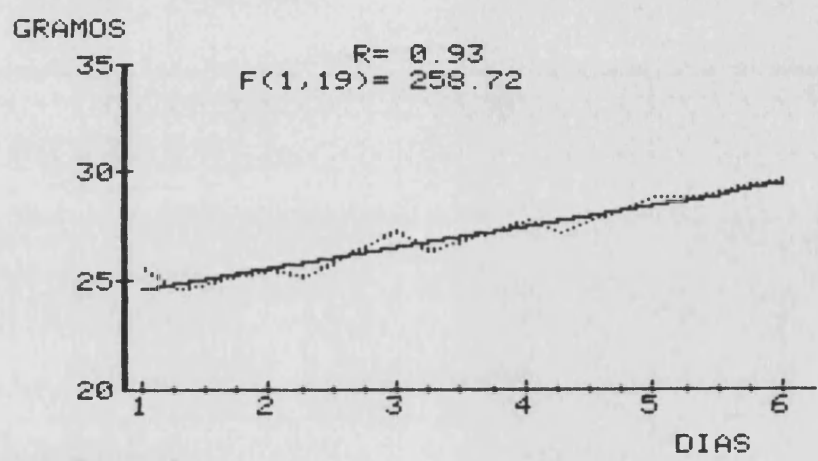


FIGURA 5.R

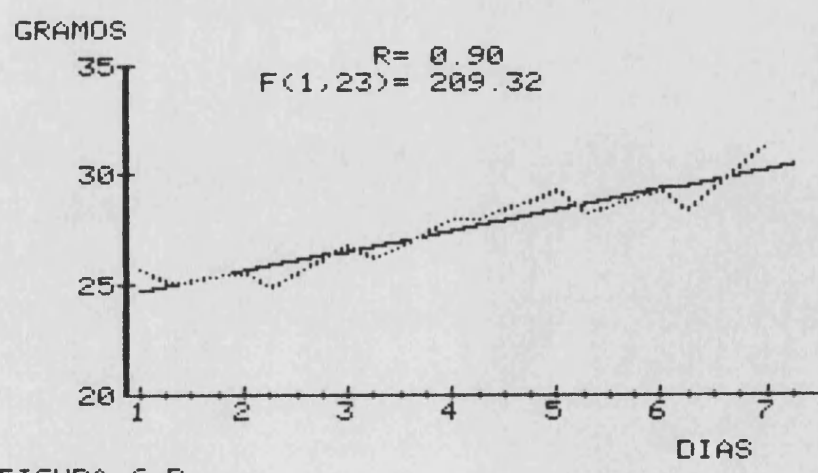


FIGURA 6.R

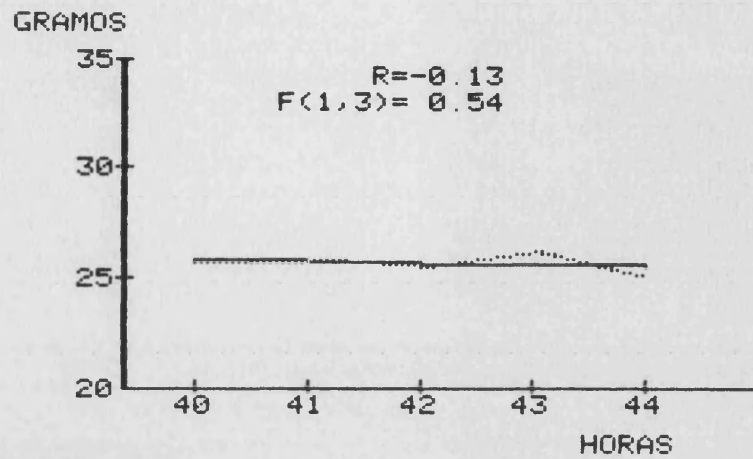


FIGURA 7.R

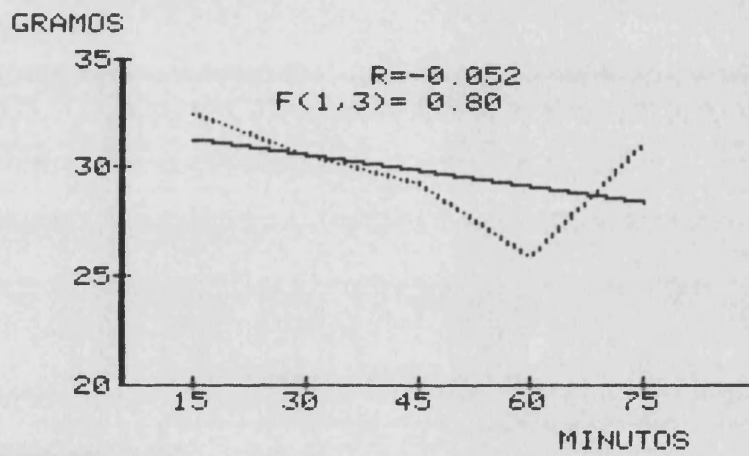


FIGURA 8.R

PESO DE LOS RATONES PORTADORES

FIGURA	EXPERIMENTO
4	E1
5	E2
6	E3
7	S1
8	S2

REGRESION LINEAL

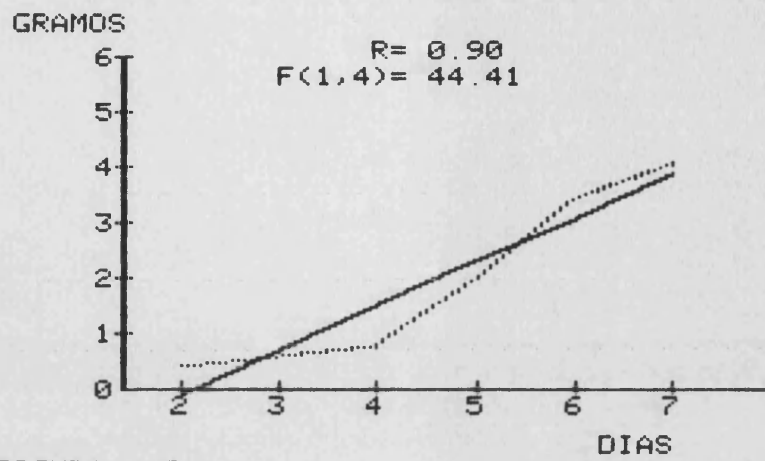


FIGURA 9.R

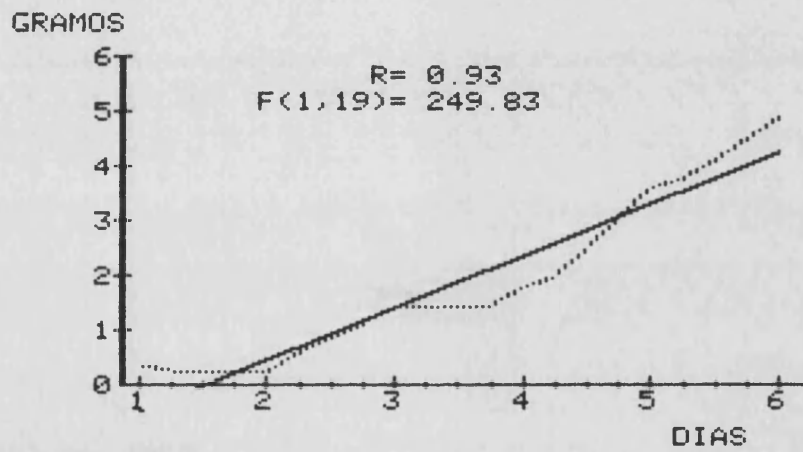


FIGURA 10.R

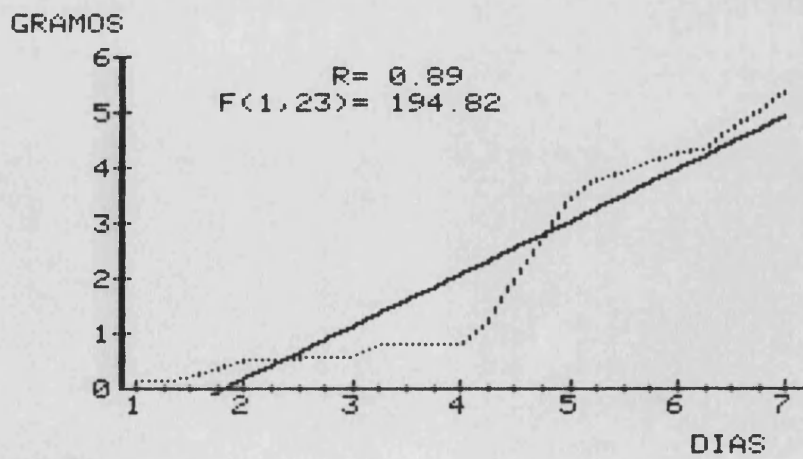


FIGURA 11.R

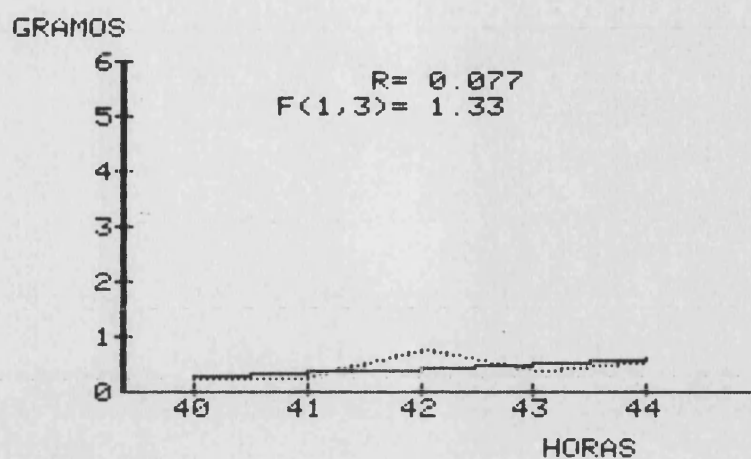


FIGURA 12.R

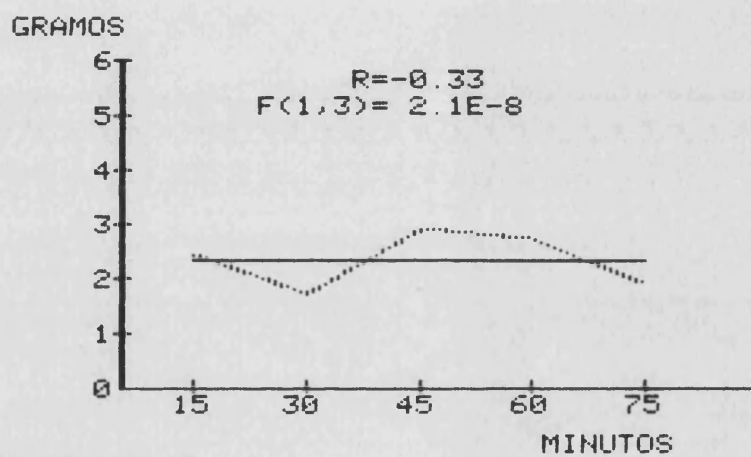


FIGURA 13.R

PESO DEL TUMOR

FIGURA	EXPERIMENTO
9	E1
10	E2
11	E3
12	S1
13	S2

REGRESION LINEAL



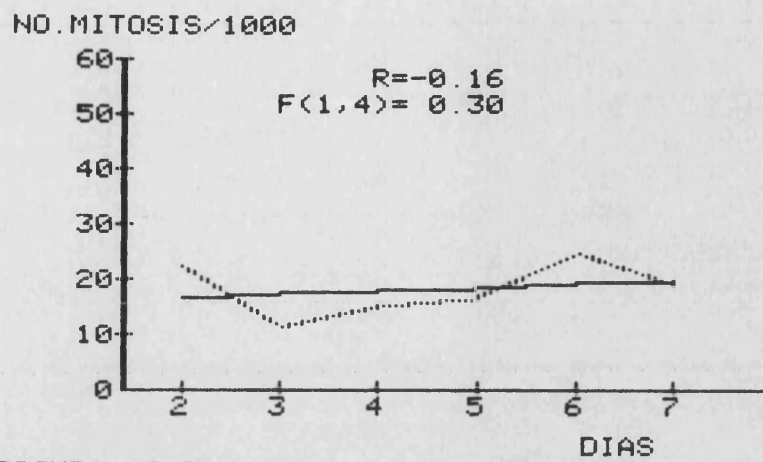


FIGURA 19.R

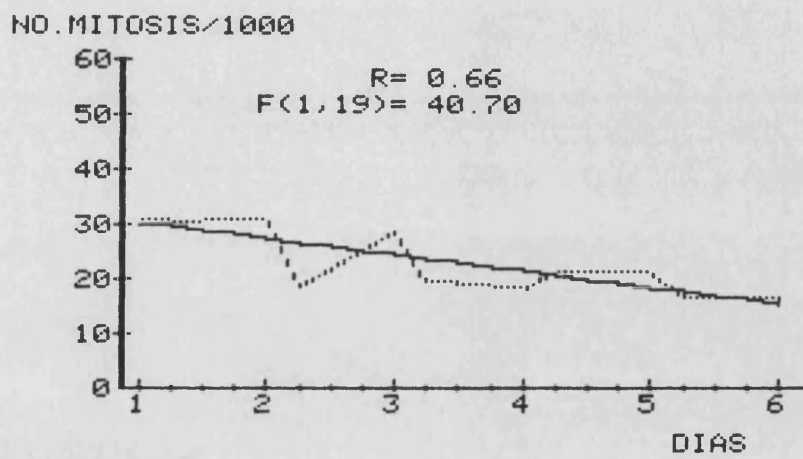


FIGURA 20.R

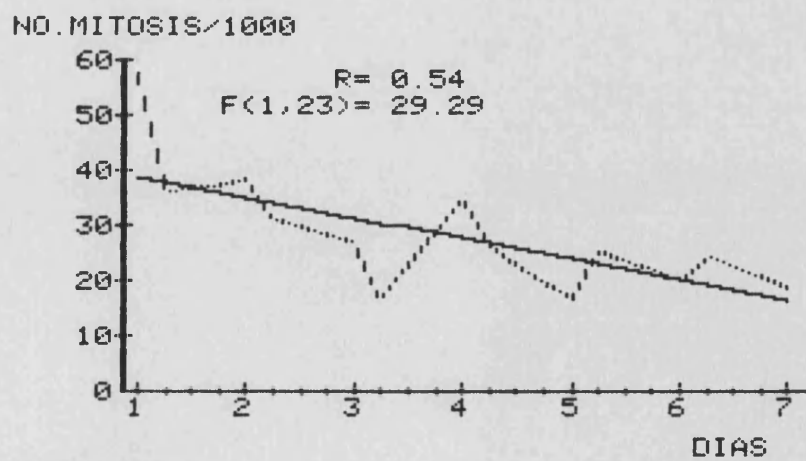


FIGURA 21.R

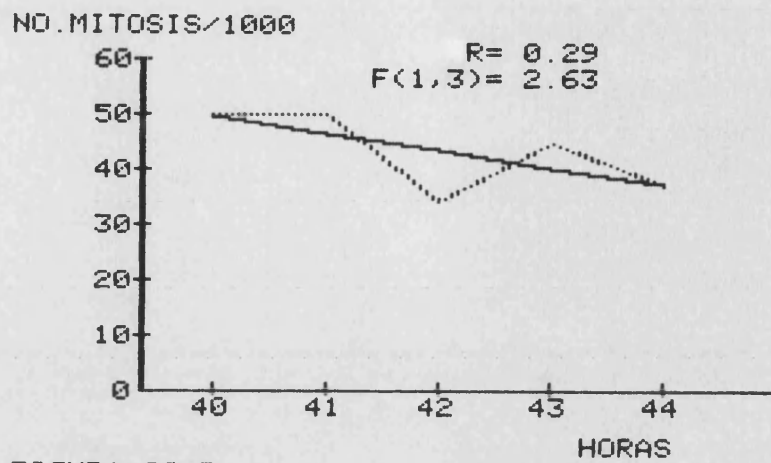


FIGURA 22.R

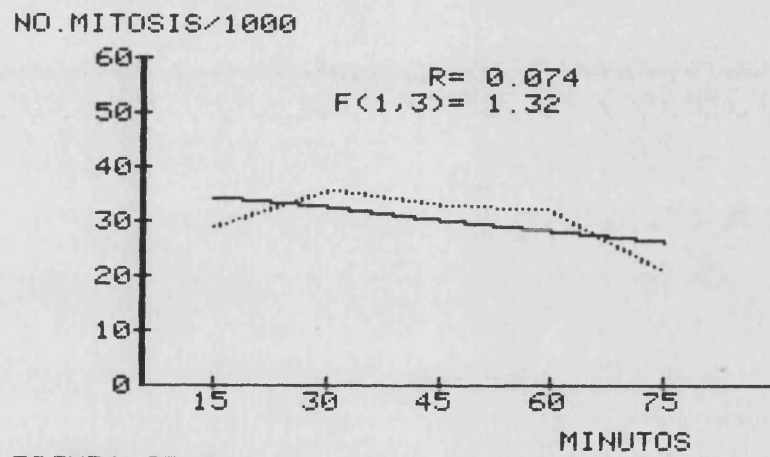


FIGURA 23.R

INDICE MITOSICO

FIGURA	EXPERIMENTO
19	E1
20	E2
21	E3
22	S1
23	S2

REGRESION LINEAL

NO. CEL. BIN/1000

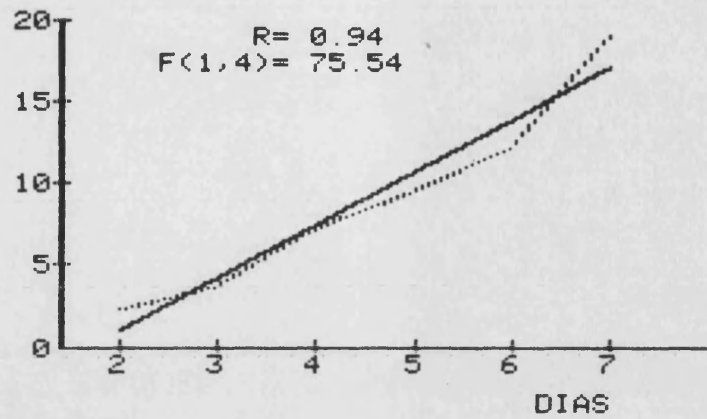


FIGURA 24.R

NO. CEL. BIN/1000

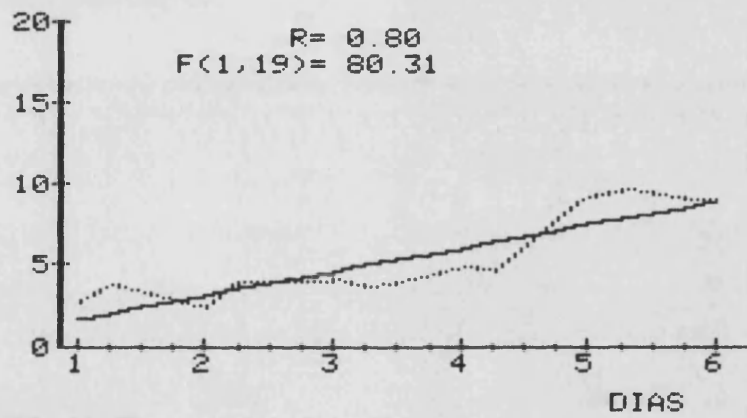


FIGURA 25.R

NO. CEL. BIN/1000

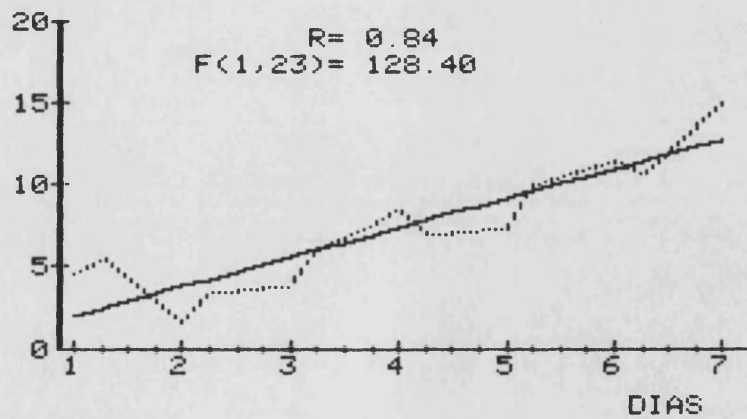


FIGURA 26.R

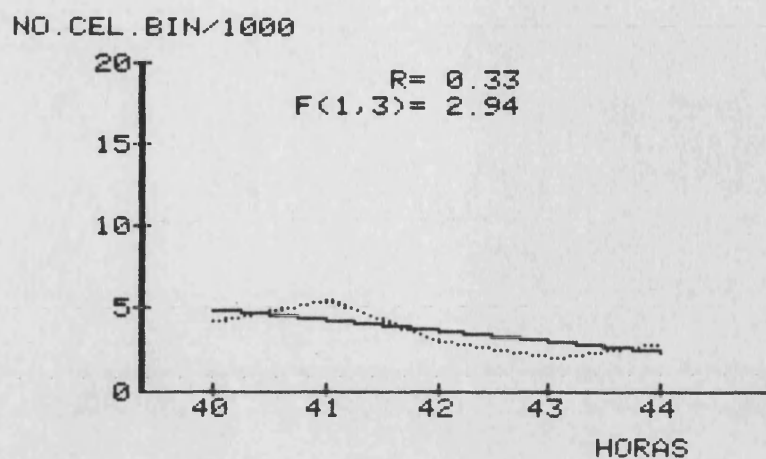


FIGURA 27.R

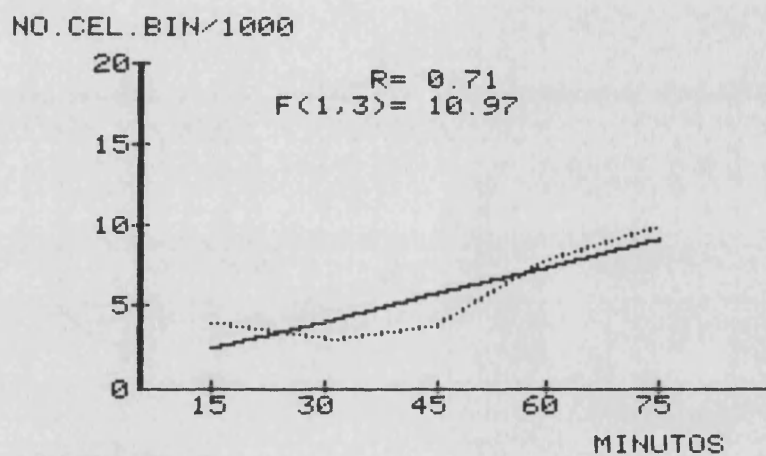


FIGURA 28.R

INDICE DE CELULAS BINUCLEADAS

FIGURA	EXPERIMENTO
24	E1
25	E2
26	E3
27	S1
28	S2

REGRESION LINEAL

% MITOSIS MARCADAS

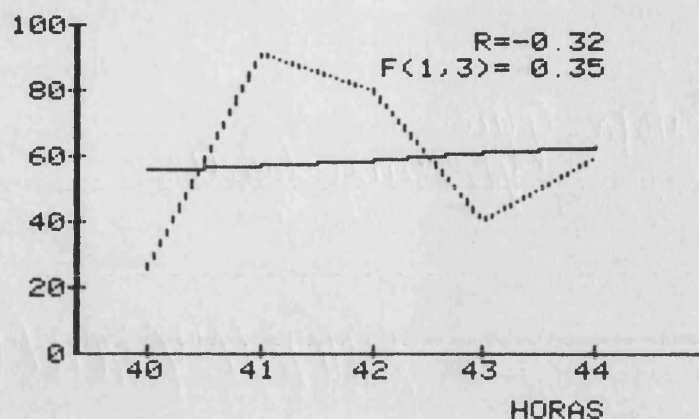


FIGURA 29.R

% CEL. MARCADAS

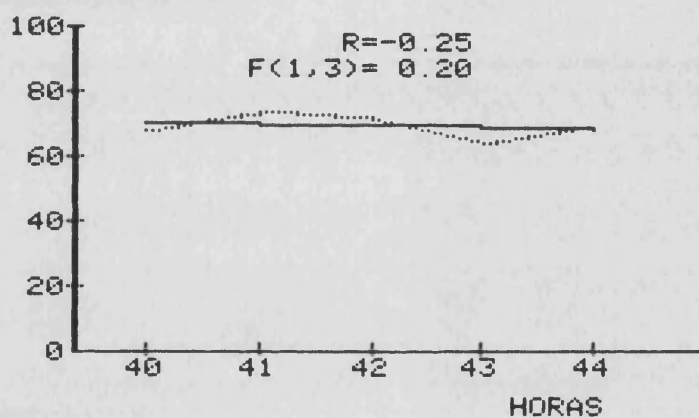


FIGURA 30.R

% CEL. BIN. MARCADAS

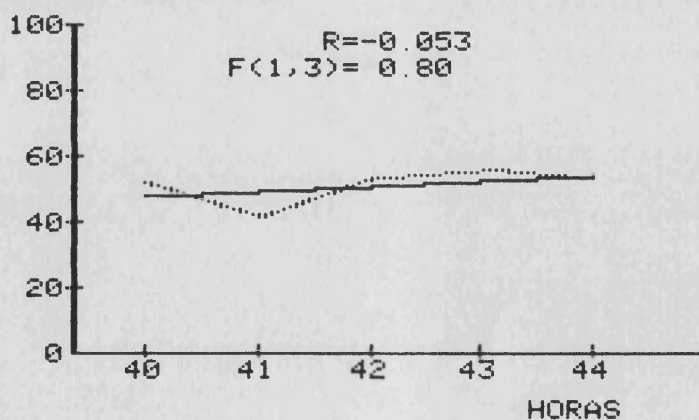


FIGURA 31.R

Reunido el Tribunal que suscribe, en el día de la fecha, acuerdo otorgar, por unanimidad, a esta Tesis doctoral de

D. José Perceja Grau  
la calificación de Apt. "cum laude"

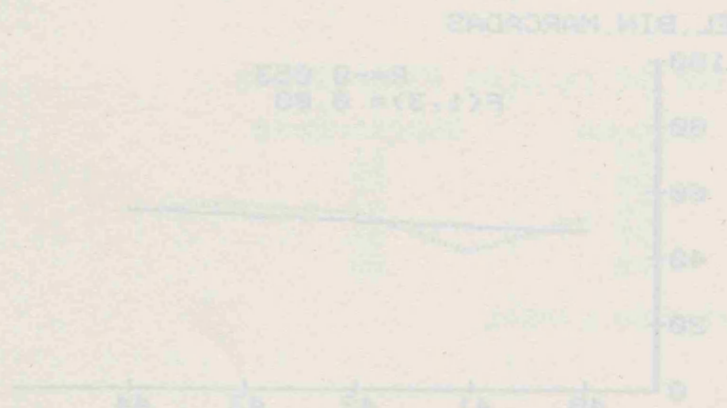
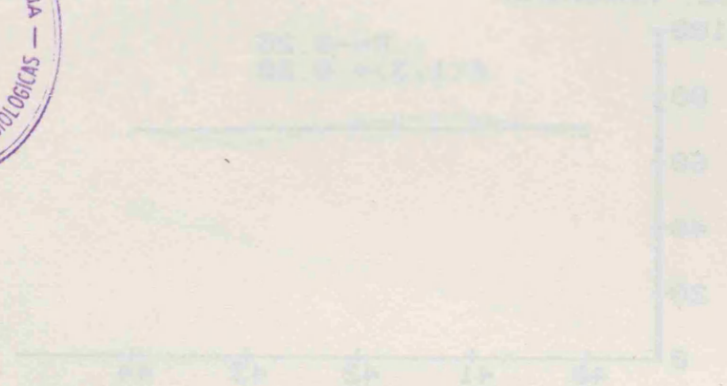
Valencia, a 5 de DICIEMBRE de 1985

El Secretario,

El Presidente

*[Handwritten signature]*

*[Handwritten signature]*



*[Faint rectangular stamp]*