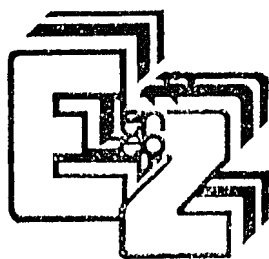




UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
ZARAGOZA



ESTUDIO MORFOLOGICO, BIOQUIMICO E
INMUNOLOGICO DE CELULAS PROVENIENTES
DE SARCOMAS HUMANOS CULTIVADOS
IN VITRO

T E S I S
PARA OBTENER EL TITULO DE :
B I O L O G O
P R E S E N T A N
María de Lourdes Gutiérrez Xicotencatl
Fernando Roger Esquivel Guadarrama
Bernardo Villarreal Ramos



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

RESUMEN

Se cultivaron in vitro 10 biopsias procedentes de sarcomas humanos, obteniéndose únicamente en 5 de los casos líneas celulares (un histiocitoma, 2 osteosarcomas y 2 liposarcomas). Estas líneas exhibieron características propias de células malignas, como son: una alta eficiencia en la obtención de los cultivos primarios, una morfología aberrante, una alta producción de colágeno, fosfatasa ácida y alcalina, así como un número cromosómico de tipo aneuploide. Se utilizaron como punto de comparación en las diferentes pruebas realizadas, cultivos de fibroblastos normales -- tanto de piel humana como reactivos de ganglio. Por otro lado, se presentó una interacción de las células malignas con leucocitos mononucleados de sangre periférica humana normal, observándose -- que dicha interacción aumento en relación directa con el tiempo de doblaje presentado por las células in vitro. Por último, se -- discute la posible interacción de las células malignas y los leucocitos como un mecanismo de reconocimiento de la diferenciación celular, la independencia entre diferenciación y malignidad y se establecen nuevos patrones de crecimiento in vitro tanto para las líneas malignas como para las normales.

I N D I C E

INTRODUCCION

Cultivo de Tejidos Animales -----	1
Diferenciación Celular -----	5
Cancer	
a) Características generales ----	7
b) Sarcomas -----	14
Caracterización de Líneas Celulares	
Malignas Cultivadas <u>in vitro</u> -----	18
METODOLOGIA -----	27
RESULTADOS -----	45
DISCUSION -----	90
CONCLUSIONES -----	106
APENDICES -----	108
BIBLIOGRAFIA -----	118

I N T R O D U C C I O N

Cultivo de Tejidos Animales.

En el siglo XIX (9), en base a los problemas planteados para un mejor estudio embriológico de tejidos animales, se comenzaron a establecer técnicas en las cuales se trataba de prolongar la vida de las células fuera del organismo. Este interés se debía principalmente, a la importancia que se daba al medio ambiente interno - en la regulación de las actividades del tejido vivo: de acuerdo a esto, el ambiente interno no era solamente el producto del metabolismo del tejido, sino que éste reaccionaba con el tejido mismo y regulaba sus actividades, por lo que sería necesario, si se querían estudiar las propiedades fundamentales de las células y de como estas afectaban su ambiente interno, separarlas en sistemas artificiales en los cuales no habría la influencia del organismo.

El primer intento fué realizado en el año de 1885 (89), cuando se mantuvo placa neural de embrión de pollo en una solución salina caliente y se obtuvo que la forma cerrada del tubo neural es una función primaria de las células, y no como se suponía, un efecto directo de la presión mecánica ejercida por las estructuras adyacentes.

En 1907 (38), se desarrolló una técnica que permitía observaciones in vitro de las fibras nerviosas de anfibio. Posteriormente, esta técnica de cultivo fué adaptada a animales poiquilotermos, en donde se descubrieron las ventajas del plasma sanguíneo como medio nutritivo. En 1931 (14), se logró establecer una línea de células

de tejido conectivo de pollo, la cual se mantuvo en multiplicación continua durante 34 años. Este trabajo tuvo el mérito de conservar la esperanza de poder comprender las leyes del crecimiento y diferenciación celular.

En aquel entonces, las soluciones nutritivas para mantener in vitro a células animales, consistían principalmente de suero sanguíneo (72). Después se utilizaron diferentes tipos de fluidos corporales, así como extractos de tejidos. La complejidad de éstos impedía realizar experimentos en los que pudiera observarse el efecto de una sustancia en particular sobre las células, por lo que era indispensable la creación de medios químicamente definidos en base al estudio de los requerimientos esenciales de la célula fuera del organismo. El primer experimento realizado para resolver este problema, se llevó a cabo en el año de 1911 (53), cuando se mantuvo tejido de embrión de pollo en una solución salina suplementada con aminoácidos, polipéptidos y glucosa. Siendo posteriormente descubierto, que el extracto de este tejido contenía además factores de crecimiento (72).

En posteriores experimentos (24), se utilizó un medio basal compuesto de plasma, suero y extracto de embrión de pollo, todos ellos dializados contra una solución de Ringer-glucosa, para remover los componentes de bajo peso molecular. Se observó que este medio no sostenía multiplicación, ni supervivencia celular, pero cuando se le adicionaron nutrientes químicamente definidos obtuvieron un buen crecimiento celular. Fué así como encontraron un método para estudiar a los promotores del crecimiento celular de bajo peso

molecular.

De esta forma se conoció que el medio basal suplementado con sales inorgánicas, glucosa, fructosadifosfato, glutamina, cisteína, glutati6n y otros aminoácidos, era capaz de sostener el crecimiento y reproducci6n celular, lo cual pudo ser confirmado en posteriores trabajos (64, 110).

En 1946 (110), se reportó una soluci6n nutritiva que mantuvo una cantidad considerable de tejido cardiaco de embri6n de pollo - durante algunas semanas, este medio estaba constituido por 20 ingredientes de composici6n conocida. Cuatro a6os mäs tarde (64), fué ideada una soluci6n mäs adecuada que contenía un complemento de -- aminoácidos y vitaminas, así como algunos constituyentes de los áci-- dos nucléicos, algunos metabolitos y factores de crecimiento.

En base a estos medios definidos se logró probar el efecto de un número cada vez mäs grande de sustancias, tanto inorgánicas como orgánicas sobre el desarrollo celular. Con ésto se descubrió lo indispensable de algunas sustancias para el crecimiento celular, - tales como las bases nitrogenadas (purinas y pirimidinas) en la -- formaci6n de los ácidos nucléicos, el ácido asc6rbico y los grupos sulfhidrilos del glutati6n y cisteína para los procesos de óxido-- reducci6n, así como en la conformaci6n de proteínas. También se -- descubrió lo indispensable de los ácidos grasos para la formaci6n de los lípidos y una gran cantidad de factores y enzimas que regulaban el metabolismo celular (72). Sin embargo, no bastaba con la presencia de estas sustancias, sino que era necesario conocer su - concentraci6n óptima para el buen desarrollo celular. Fué así como

se establecieron una serie de medios químicamente definidos (apendice I) a partir de experimentos con diferentes tipos de tejidos. Diversos investigadores establecieron por separado sus propias formulas, empero, todos concordaban en la regulación del pH, que debería tener valores de 6.8 a 7.2. Esto se logró a partir de diferentes sales que actuaban como amortiguadores y que al mismo tiempo proporcionaban los elementos inorgánicos indispensables, tales como sodio, calcio, magnesio y potasio (72). Sin embargo, no fué sino hasta 1955, en trabajos con células de HeLa (21), cuando se desarrolló el primer medio mínimo esencial, el cual era capaz de sostener la proliferación activa de células de mamífero sin ningún tipo de suplemento (apendice I).

Estos medios aunque proporcionaban los elementos básicos para la vida, pueden ser suplementados con sueros, principalmente de caballo y fetal de bovino y en ocasiones de humano, ya que estos contienen importantes promotores del crecimiento celular (hormonas y proteínas), pero es tan compleja su composición que no se ha podido identificar más que un pequeño número de sus elementos y aún menos el papel específico que estos juegan (60, 76).

Obviamente, aunado al desarrollo del cultivo de tejidos, se establecieron las condiciones físicas óptimas para el crecimiento celular, imitando las que se presentan en el organismo de los mamíferos. Para ello se emplea una temperatura de 37°C, una composición atmosférica de bióxido de carbono de 5 a 10% y un ambiente húmedo saturado (96).

Una vez establecidas las condiciones físicas y químicas ópti-

mas para el crecimiento y desarrollo celular, surgió el problema de continuar los cultivos sin necesidad de recurrir a nuevos tejidos, ya que las células detienen su crecimiento al cubrir el sustrato donde se cultivan. Por lo que era necesario evitar que alcanzaran altas densidades, haciéndose indispensable su resiembra hacia otros sustratos. Esto se logró a través de un tratamiento con enzimas proteolíticas como la tripsina, que digiere las proteínas con las que las células se adhieren al fondo del plato (81). Sin embargo, se ha observado que las células no sólo se adhieren por proteínas en el sustrato, sino que también emplean cargas de iones divalentes tales como calcio y magnesio. Para poder anular estas cargas, se emplean soluciones salinas conteniendo ácido etilendiamin-tetra-acético, el cual es un agente quelante que capta iones divalentes (4). De esta manera se facilita la separación de las células del sustrato de cultivo y se evita además un mayor daño en la membrana celular.

Diferenciación Celular.

La diferenciación celular se puede definir como el proceso por el cual se originan diferencias estables entre las células de un organismo (18). Entendiéndose por estabilidad la situación en que aquellas no pueden volver a su estado indiferenciado, perdiéndose generalmente su capacidad reproductora y restringiéndose de esta manera a funciones altamente especializadas (7, 37).

El proceso de diferenciación celular en animales se dá a partir de la gastrulación, etapa embrional en la cual se constituyen

las 3 hojas germinales, a partir de las cuales se van a formar los diferentes tejidos y órganos (18). Sin embargo, persisten células indiferenciadas durante la vida del organismo, que continúan en producción, de tal manera que la población de células diferenciadas es renovada constantemente (36).

De todo lo anterior, surge la siguiente pregunta: ¿Cuales son los factores que determinan la diferenciación celular?. Esta pregunta ha sido parcialmente contestada, como se verá a continuación en los estudios realizados sobre cultivos celulares in vitro.

Factores importantes en la inducción de la diferenciación de las células hematopoyéticas han sido estudiadas en forma extensa recientemente (108), en donde se ha descrito la transformación de los pro-eritroblastos hacia eritrocitos, por el factor inductivo llamado eritropoyetina. Así como la producción de granulocitos y macrófagos, los cuales son formados a partir de una célula precursora común encontrada en la médula ósea. Este último precursor, inicia su proceso de diferenciación al tener contacto con la granulo-poyetina, llamada factor estimulante de colonias, o inductor de macrófagos y granulocitos.

Se ha observado que la diferenciación celular también es debida a factores intrínsecos de la propia célula (113), ya que se encontró que los mioblastos (células precursoras de las fibras musculares) se dividen 2 ó 3 veces en cultivo y a partir de entonces comienzan a agregarse y fusionarse en fibras musculares multinucleadas. También se observó que aunado a este proceso la diferenciación está asociada con la aparición de estriaciones cruzadas y contrac-

tilidad, demostrando que la diferenciación de este tipo celular es un proceso inherente a la misma célula.

También se ha observado que el proceso de diferenciación no es unidireccional (33), pues la conversión de fibroblastos a células adiposas, depende solamente de la continua disponibilidad de una fuente rica en nutrientes, bajo condiciones en las que no es posible la división celular. Este proceso sin embargo, es reversible cuando las condiciones nutricionales no son las adecuadas.

Cáncer.

a) Características Generales.

El número de definiciones tan diversas que existen para describir las neoplasias es indicación clara de que ninguna de ellas es satisfactoria. Sin embargo, en este trabajo se considera que una neoplasia es "una neoformación constituida por acumulación anormal de células, cuyo crecimiento excede del de los tejidos normales y es incoordinado con el de los mismos" (74). Asimismo, las neoplasias se dividen en 2 grandes grupos: benignas y malignas, siendo estas últimas llamadas comunmente cáncer.

Los tumores benignos están caracterizados por una estructura que es frecuentemente típica del tejido de origen, con células bien diferenciadas y crecimiento lento. Las figuras mitóticas son infrecuentes y las que se observan son usualmente normales. Su crecimiento es en forma de masas localizadas y expansibles rodeadas de una membrana fibrosa llamada cápsula. En contraste, los tumores malignos presentan comunmente células indiferenciadas con un alto por--

centaje de divisiones, en donde se observan muchos cromosomas anormales. No presentan una encapsulación, caracterizándose por crecimiento infiltrativo y erosivo, originando inclusive con el tiempo el establecimiento de colonias en partes distantes de su lugar de origen. Este último proceso de colonización se conoce como metástasis, o crecimiento tumoral secundario, causando en la mayoría de los casos la muerte del organismo (19, 86).

Las células cancerosas exhiben características especiales como son entre otras; el escape de los mecanismos de control del organismo, el aumento en el potencial de crecimiento, alteración de las membranas celulares, aparición de nuevos antígenos y antígenos de superficie, aparición de anomalías cariotípicas, así como el desarrollo de transformaciones morfológicas y bioquímicas (86). Sin embargo, aunque las células malignas son indiscutiblemente células alteradas, los cambios pueden ser muy sutiles, de manera que estas tienen aspecto casi idéntico al de los equivalentes del tejido normal, o la modificación es muy grande, en medida tal que pierden toda semejanza con las células de origen (desdiferenciación) (86). -- Asimismo, las propiedades alteradas de una población de células cancerosas puede cambiar de tiempo en tiempo, dando lugar a diferentes estadios en el desarrollo del tumor, a lo que se conoce como evolución neoplásica (107).

Las alteraciones funcionales de la célula maligna, tienden a ser paralelas a las alteraciones morfológicas. Las células tumorales bien diferenciadas pueden conservar todas las facultades especializadas de las células de los tejidos originales. Por ejemplo -

los tumores de células de islotes, que provienen de las células β , pueden elaborar insulina (86) y las células tumorales óseas mejor diferenciadas fabrican matriz ósea (35, 86). En contraste con estas células funcionalmente bien diferenciadas, están la mayor parte de las células malignas, escasamente diferenciadas, que no tienen función especializada residual y actúan solo como "fábricas" ingobernadas de sustancias celulares, estas células se dividen y destruyen por invasividad todo tejido en su camino. Ahora bien, es importante mencionar que en ambos tipos de tumores, no sólo se presentan las células neoplásicas, sino también aparecen células fibroblásticas que pueden ser de tipo reactivo, o no reactivo que quedaron incluidas dentro de la masa tumoral por invasividad de ésta (46, 107).

Conforme las células de algunos tumores se tornan menos diferenciadas, pierden algo de su especificidad bioquímica y tienden a converger en un cuadro enzimático propio (78). En otras palabras las células malignas llegan a parecerse más entre sí, que a las células normales que les dieron origen. Esto también es aplicable a las características morfológicas, puesto que las células que han perdido toda semejanza con las células normales exhiben en la mayoría de los casos, una morfología común cuyas principales características son las siguientes: pleomorfismo celular y nuclear; cociente núcleo-citoplasma 1:1 e incluso 1:2 en lugar del normal 1:4; núcleo picnótico (dada la gran acumulación de cromatina, la cual se arregla en acumulaciones toscas en la membrana nuclear, destacándose el contorno del núcleo), núcleos grandes en ocasiones múltiples y presencia de células gigantes multinucleadas (86). Por

otro lado, estas células pueden tener también un proceso de diferenciación patológico en el transcurso de su evolución, como se demuestra con el hecho de que adquieren secreciones de proteínas específicamente embrionarias y producción de hormonas ectópicas características, que no presentan en sus estados normales de diferenciación (86, 107).

La diferenciación de las células cancerosas suele ser índice útil de su nivel de malignidad y de su grado de proliferación. En general, cuanto mayor sea la diferenciación, más lentamente crecerá la neoplasia y a la inversa. una desdiferenciación más intensa se acompaña de crecimiento más rápido. En base a esta idea, se han realizado clasificaciones de las neoplasias malignas en las cuales se relaciona el grado de diferenciación de las células con la malignidad, siendo más maligno un tumor cuando sus células se encuentran muy indiferenciadas y viceversa (86). Sin embargo, esta clasificación no es del todo exacta, ya que se ha comprobado que algunos tumores bien diferenciados crecen con rapidez sorprendente y que las lesiones no diferenciadas pueden crecer lentamente (61). Esto hace necesario estudios más profundos sobre la relación que existe entre diferenciación de las células y su grado de malignidad, con el fin de realizar una clasificación de las neoplasias malignas más acorde con su comportamiento y su pronóstico en el individuo.

Hasta ahora, hemos descrito en forma general, las características que presentan las células cancerosas y las diferentes etapas de su desarrollo en el organismo. Sin embargo, aún quedan preguntas por contestar, ¿Cuales son los factores etiológicos que producen

los tumores malignos? , y ¿Por medio de que mecanismo este, o estos factores etiológicos transforman las células normales en malignas?. En la actualidad, la primera pregunta se ha respondido parcialmente, ya que se han descubierto varios agentes de naturaleza diferente, que actúan como carcinógenos en las células normales, estos -- agentes se pueden clasificar de la siguiente manera: los químicos (como son hidrocarburos policíclicos, los colorantes azóicos, las aflotoxinas y la 2-β-naftilamina), los agentes virales (entre los que se encuentran ciertos virus del tipo de los papovirus y adenovirus), los físicos (entre los que aparecen las radiaciones y los ionizantes), humorales (tanto las hormonas como los estrogénicos y la prolactina) y por último las mutaciones somáticas espontáneas - (que agrupa a factores no identificados). En lo que respecta a la segunda pregunta, ésta aún no ha sido contestada, ya que aunque -- hay muchas causas comprobadas de cáncer, no se conoce a ciencia -- cierta, los mecanismos por los cuales actúan y tampoco ha sido posible postular un mecanismo correspondiente para cada agente etiológico conocido. Por este motivo, la patogénia debe de explicarse de una manera general, tomando en cuenta que muchos factores pueden desencadenar las transformaciones (86, 107).

Las teorías más aceptadas para explicar el mecanismo de la -- transformación maligna son: la teoría de la alteración genética y la teoría de la supresión de la retroalimentación. La primera teoría propone que los agentes carcinógenos actúan modificando patéticamente el genoma, los cuales producen trastornos manifiestos del cariotipo (aneuploidías, hipoploidías e hiperploidías), o incluso trastornos epigenéticos. Estos trastornos a nivel del genoma se ve

rían aumentados a través de las sucesivas generaciones, a causa de mutaciones espontáneas, adquiriendo de esta manera las células malignas una nueva capacidad de síntesis de proteínas, lo cual alteraría irreversiblemente su expresión fenotípica (86). Por el contrario, la teoría de la supresión de la retroalimentación, supone que los trastornos genéticos y epigenéticos de las células cancerosas, no les conduce a la adquisición de una nueva capacidad para la síntesis de proteínas, sino más bien esta modificación se refiere a la pérdida de la facultad de la célula para la regulación de sus funciones normales (95, 107). Ahora bien, en la actualidad no se ha podido precisar si los cambios que conducen a la transformación maligna se origina en una sola célula (origen monoclonal), o si ocurre simultáneamente en muchas células adyacentes (origen policlonal). Sin embargo, la mayor parte de las pruebas experimentales y clínicas apoyan más fuertemente a la teoría de un origen policlonal del cáncer (36, 86).

La transformación maligna de una célula, no implica en sí el posterior desarrollo de un tumor canceroso, ya que la célula una vez transformada tiene que enfrentarse a infinidad de factores medio ambientales adversos, que obstaculizarán en forma importante su proliferación, siendo principalmente uno de estos factores el sistema inmune del organismo. Los primeros indicios que sugieren el papel preponderante que juega el sistema inmune en la defensa del organismo contra el desarrollo de procesos malignos, datan de 1959, cuando se encontró que la presencia de linfocitos en cierto tipo de tumores es de buen pronóstico para el paciente, ya que estos pueden retardar el desarrollo tumoral primario, o inclusive inhibir

el desarrollo de posibles metástasis, mientras que en los casos -- que no hay infiltración de linfocitos en los tumores, es de mal -- pronóstico (27).

A partir de estas observaciones, se han estudiado las características inmunológicas que presentan las células malignas, desarrollando así modelos experimentales tanto in vivo como in vitro, de tal suerte que se ha descubierto la presencia de neoantígenos - de membrana característicos de las células tumorales, los cuales - permiten el reconocimiento y ataque de éstas por parte de las células inmunocompetentes. Esto ha llevado a la postulación de la teoría de la "vigilancia inmunológica" (27, 47), la cual supone que - siempre se están desarrollando células malignas en el organismo y que las células T están patrullando continuamente al huésped, buscando y destruyendo este tipo de células, antes de que se conviertan en tumores clínicamente detectables. Sin embargo, en esta teoría - no se explica como es que el sistema inmune falla y permite de esta manera la proliferación de las células neoplásicas. Por lo que se han propuesto teorías como la de los factores bloqueadores del suero, la cual propone, que estos factores impiden la lisis de las células transformadas, ya sea cubriendo los sitios antigénicos, o formando complejos antígeno-anticuerpo impidiendo así el ataque, - por parte de las células inmunocompetentes, así como la teoría de la inmuno-estimulación, la cual postula, que una respuesta inmune a niveles inadecuados para promover la regresión del tumor, puede ayudar más bien al crecimiento de éste (47,50).

Las células que adoptan el papel principal en la defensa del

organismo contra las neoplasias malignas, son las del tipo linfocítico, las cuales despliegan una amplia gama de actividades en el ataque de las células cancerosas. Así, los linfocitos B fabrican anticuerpos específicos contra los neoantígenos de las células malignas gracias a la estimulación que reciben por parte de los linfocitos T, o los macrófagos. De la misma manera, los linfocitos T pueden actuar en procesos de citotoxicidad, sin intermediarios, al igual que los linfocitos asesinos (Killer, K), o los asesinos naturales (Natural Killer, NK) (116).

b) Sarcomas.

En general se acepta que el desarrollo de tumores malignos se puede dividir en 2 categorías, de acuerdo a su procedencia, o a sus células de origen, ya que si éstas son epiteliales se denominan carcinomas y si las células son no epiteliales, o mesenquimales se denominan sarcomas (35,36,74).

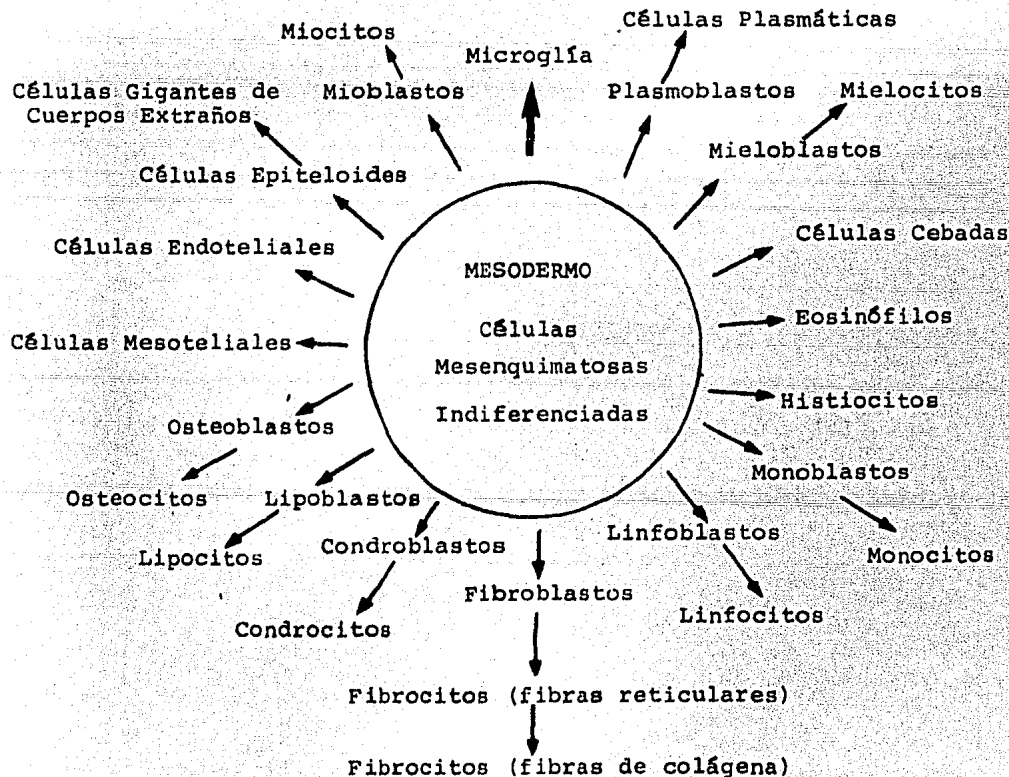
El tejido mesenquimatoso, que procede del mesodermo embrionario, cumple en el cuerpo humano importantísimas funciones como son entre otras, las de sostén y conformación de los demás tejidos y la de protección contra agresiones del medio ambiente externo (sistema inmunitario) (36).

El mesodermo, que está compuesto de células mesenquimatosas, da origen a 2 tipos de tejidos, el epitelio y el tejido conectivo, caracterizado este último, principalmente por células tales como fibroblastos, células adiposas, cebadas y macrófagos entre otras (7,35) (Fig. 1).

Existe cierta controversia sobre las rutas de diferenciación celular, debido a que diversos autores han propuesto que los cami-

F I G U R A No. 1

PROBABLE DIFERENCIACION DE LAS CELULAS MESENQUIMATOSAS EMBRIONARIAS



nos de diferenciación seguidos por los diferentes tipos celulares hacia su especialización, no es estrictamente lineal, sino que -- existe una potencialidad de transformación de un tipo celular a -- otro (36).

La poca claridad en cuanto al conocimiento de las rutas de diferenciación seguidas por las células de origen mesenquimal, aunado al comportamiento anárquico que presentan éstas células en su estado maligno, hace por demás difícil el poder clasificar a los sarcomas en forma precisa (35,71). Ahora bien, dentro de la misma nomenclatura de los sarcomas existen muchos puntos oscuros, por -- ejemplo, el nombre que se le da a los tumores benignos se compone por el tipo histológico de las células agregando el sufijo -oma . Asimismo, los tumores malignos procedentes de células mesenquima--les se denominan, al igual que en los tumores benignos, por el tipo histológico de las células, pero en este caso agregando el sufijo -sarcoma . Sin embargo, algunas veces esta regla no es respetada, pues existen sarcomas a los que se les da el nombre de la persona que los describió, como en el caso del sarcoma de Kaposi y -sarcoma de Ewin entre otros, o incluso al tipo histológico se le -- agrega el sufijo -oma como en el caso del Schwannoma, e histiocitoma fibroso maligno (35,86).

Entre los múltiples intentos que se han hecho para la clasificación de los diferentes sarcomas (19,35,86), en el presente trabajo se utilizó la clasificación hecha por Robbins (86) (Tabla 1), por considerarse la más clara.

T A B L A No. 1

CLASIFICACION DE LOS SARCOMAS SEGUN ROBBINS (86).

TEJIDOS DE ORIGEN	CRECIMIENTO MALIGNO
1) Sencillos (compuestos de células neoplásicas de un solo tipo)	
A) TUMORES DE ORIGEN MESENQUIMATOSO	SARCOMAS
a) TEJIDO CONECTIVO	
- Tejido fibroso	Fibrosarcoma
- Tejido mixomatoso	Mixosarcoma
- Tejido adiposo	Liposarcoma
- Cartilago	Condrosarcoma
- Hueso	Sarcoma osteógeno
- Tejido notocordal	Cordosarcoma
b) TEJIDO ENDOTELIAL Y AFINES	
- Vasos sanguíneos	Angiosarcoma Endoteliosarcoma (Sarcoma de Kaposi)
- Vasos linfáticos	Linfangiosarcoma Linfangoendoteliosarcoma
- Sinovia	Sinoviosarcoma
- Mesotelio	Mesoteliosarcoma
- V. sanguíneos de médula ósea(?)	Tumor de Ewing(?) (endoteliosarcoma)
c) CELULAS SANGUINEAS	
- Células hematopoyéticas	Leucemia granulocítica Leucemia monocítica
- Tejido linfoide	Linfomas malignos Leucemia linfocítica Plasmocitoma (mieloma)
- Sistema reticuloendotelial	Linfoma tipo histiocítico Enfermedad de Hodgkin(?)
d) MUSCULOS	
- Músculo liso	Liomiomasarcoma
- Músculo estriado	Rabdomiosarcoma

Caracterización de las Líneas Celulares Malignas Cultivadas in vitro.

Como resultado del perfeccionamiento de las técnicas de cultivo de tejidos, se ha podido llevar a cabo el mantenimiento indefinido in vitro de células malignas procedentes de tumores tanto de animales como de humanos (líneas celulares) (40). De esta forma, - las líneas celulares malignas se han convertido en una excelente - herramienta para el estudio de la citología, biología y terapéutica del cáncer (94,103). Además, estas células son también importantes, porque sufren procesos de desdiferenciación y en muchos de los casos exhiben características morfológicas y funcionales semejante a la de sus precursores normales (108).

La primera línea celular obtenida de un tumor maligno, fué de nomada de HeLa, la cual provino de un carcinoma cérvico-uterino, obtenido en el año de 1951 (28). Estas células se han conservado - hasta la fecha, efectuándose trabajos que han permitido ahondar en los procesos de diferenciación celular in vitro. Este fué el prime ro de una serie de trabajos que permitió la creación de líneas malignas provenientes tanto de carcinomas, como de sarcomas (97). De safortunadamente, el establecimiento de las líneas celulares humanas in vitro ha sido algo que pocas veces se ha logrado, por ejemplo en el American Type Culture Collection (97), se encuentran des critas 31 líneas celulares provenientes de tumores malignos, 14 de carcinomas y 17 de sarcomas. Asimismo, otros artículos especializa dos (29,32,94), reportan que solo se han establecido 80 líneas celulares provenientes de tumores malignos, 20 de sarcomas y 60 de - carcinomas. Dentro de las líneas celulares obtenidas a partir de -

sarcomas humanos, se encuentran las provenientes de sarcomas osteogénicos (44,49,94), liposarcomas (10,63,65), sarcomas de células gigantes (1), sarcomas de células sinoviales (75), sarcoma neurogénico (103), fibrosarcoma (58, 82), rhabdomyosarcoma (15), condrosarcoma (17), leiomyosarcoma (25), sarcoma de Ewing (20) y sarcoma de Kaposi (30).

El hecho de que existan mayor número de líneas celulares provenientes de carcinomas humanos que de sarcomas, no se debe a una mayor capacidad de proliferación in vitro de las células epiteliales malignas --ya que al igual que las células epiteliales normales, éstas tienen poca capacidad para sobrevivir y multiplicarse bajo las condiciones de cultivo--, sino más bien, a que los sarcomas tienen una menor incidencia en el humano que los carcinomas, y por lo tanto estadísticamente es más factible la investigación en estos últimos (79). En contraste con el epitelio, los elementos del tejido conectivo tienen una mayor capacidad de adaptación para prolongar su proliferación in vitro (40). Esto ha servido para que en los últimos años se realicen esfuerzos para cultivar células de tumores mesenquimatosos malignos, con la esperanza de que tales materiales respondan mejor a las condiciones in vitro (94). Otra de las ventajas para seleccionar sarcomas, es que las células provenientes de éstos pueden ser comparadas in vitro con células mesenquimatosas derivadas del tejido normal del mismo paciente.

A pesar de las ventajas que representa el cultivo de sarcomas para la obtención de líneas celulares malignas, no en todos los casos se han dado resultados positivos, ya que en muchas ocasiones se han obtenido fibroblastos normales procedentes del tejido conec

tivo circundante, o fibroblastos reactivos constituyentes del estroma tumoral (22,57,104). Esto puede ser tal vez debido a que los fibroblastos normales y reactivos tengan una mayor capacidad de adaptación a los factores medio ambientales impuestos en el cultivo, que las propias células neoplásicas (29,94). Para superar esta problemática, se han hecho diversos estudios acerca de las condiciones específicas necesarias (29), para que las células cancerosas se vean favorecidas en su proliferación. Sin embargo, estos intentos en su mayoría han resultado negativos, por lo que la creación de líneas celulares in vitro provenientes de sarcomas, más bien es el resultado de un proceso al azar, que de una técnica definida (94).

Es conocido que las células malignas provenientes de sarcomas desarrollan en cultivo, formas parecidas a las que adoptan los fibroblastos normales, por lo que se ha tenido la necesidad de implementar diversos criterios para afirmar la malignidad de las células obtenidas in vitro, como son por ejemplo: la morfología aberrante de las estructuras celulares, la pérdida de sociabilidad celular, alteraciones en los mecanismos de proliferación, alteraciones en la bioquímica celular, presencia de neoantígenos de membrana y anomalías cariotípicas (13,29,94,103,107).

Los parámetros morfológicos que se toman en cuenta, para la caracterización de células malignas cultivadas in vitro, son en esencia los mismos que se consideran en los estudios histopatológicos practicados en las biopsias de los tumores cancerosos (31,114). Asimismo, las características genéticas que presentan las células malignas tanto in vitro como in vivo son, como se dijo anteriormen-

te, aneuploidías, hiperploidías, e hipoploidías. Sin embargo, se ha visto que en fibroblastos normales, el cultivo prolongado in vitro puede provocar en estas células, transformaciones que conllevan la mayoría de las veces a aberraciones cromosómicas similares a las presentadas por las células malignas (65). Por lo que se ha propuesto realizar los estudios cromosómicos de las células cancerosas cultivadas in vitro durante los primeros subcultivos, para evitar alteraciones genéticas provocadas por el mantenimiento de éstas en condiciones artificiales, y poder obtener así, cariotipos que sean equivalentes a los del tumor de origen. Por otra parte, se han desarrollado investigaciones en busca de marcadores cromosomales que permitan desde un punto de vista genético, el reconocimiento de una célula maligna como proveniente de un determinado tipo de neoplasia. Esto se pensó en base a que las aberraciones cromosómicas que conllevan algunas transformaciones malignas se dan de acuerdo a un patrón determinado, dependiendo del factor etiológico desencadenante. Desafortunadamente, en la actualidad sólo ha sido posible el descubrimiento de 2 marcadores cromosomales: uno para la leucemia mielocítica crónica, en la cual se encontró una translocación entre los cromosomas 9 y 22; y otro para el linfoma de Burkitt, en el que se presentó una banda terminal adicional en el cromosoma 14 (52, 86, 95).

La sociabilidad celular se refiere a las interacciones y el control que ejercen las células entre sí, para regular su proliferación y mantener un patrón de crecimiento definido (2). Esta característica se ve claramente al cultivar in vitro células fibroblásticas normales, las cuales presentan inhibición por contacto, esto -

es, dejan de proliferar al llegar a la confluencia celular, además de conservar una determinada orientación en su proliferación. Por el contrario, las células malignas presentan una orientación anárquica, además de una proliferación en multicapa, perdiendo totalmente de esta manera el mecanismo de inhibición por contacto - (2, 43, 107). Las alteraciones en los mecanismos de proliferación que presentan las células malignas, les permiten reproducirse indefinidamente y multiplicarse bajo condiciones adversas. Esto implica que las células neoplásicas no están sujetas a mecanismos reguladores del organismo, lo cual les confiere la capacidad de metástasis (69). En base a estas modificaciones de las características de proliferación en las células cancerosas, se han establecido criterios para corroborar el origen maligno de las células cultivadas in vitro, como son: formación de colonias en medio semisólido, formación de tumores en ratones inmunodeprimidos, eficiencia de clonación en medios líquidos, capacidad para multiplicarse a bajas concentraciones de suero y proliferación con alta densidad de saturación (26, 44, 55, 85, 98).

Aunado a las alteraciones en los mecanismos de proliferación que exhiben las células malignas, se presentan cambios bioquímicos destinados a favorecer la proliferación celular en las diferentes condiciones en las que se puedan encontrar las células, estos cambios bioquímicos son principalmente la alta producción de enzimas proteolíticas destinadas a destruir el estroma circundante (actividad fibrinolítica) (13, 44, 77), aumento en la producción de enzimas glucolíticas (piruvato-kinasa, lactato deshidroge

nasa, aldolasa, etc.), que les permiten la obtención de energía en un medio anaeróbico (51, 95) y alteraciones tanto en la secreción como en el tipo de colágena (posiblemente destinada a la formación de un estroma que le sirva de soporte) (5, 6). Asimismo, existen alteraciones bioquímicas en las células cancerosas, de las cuales no se ha podido determinar su verdadera función en el desarrollo maligno, como son la síntesis de las isoenzimas placentar y fetal intestinal de la fosfatasa alcalina (8, 92, 95, 100, 101), y la alta producción de fosfatasa ácida (95). Dentro de las características bioquímicas anteriormente descritas, la producción de las isoenzimas de la fosfatasa alcalina se ha convertido en uno de los principales marcadores de las células malignas cultivadas in vitro, ya que en el desarrollo normal del organismo las isoenzimas tienen una distribución muy restringida en los tejidos, sin embargo, se ha encontrado que una gran cantidad de tumores malignos las sintetizan ectópicamente, a pesar de que los tumores provienen de tejido que normalmente no produce cantidades significativas de estas isoenzimas (100).

El cultivo in vitro de células malignas permitió dilucidar algunas de sus características inmunológicas. Así se descubrió que estas células presentan neoantígenos característicos compatibles con los antígenos fetales, tales como el S₁, S₂, α -fetoproteína entre otros (66, 67, 84, 95). Una vez demostrado que las células malignas poseían neoantígenos, se pensó en la posibilidad de que el sistema inmunitario pudiera reconocer a las células cancerosas. En base a esta idea, se llevaron a cabo experimentos en los cuales se trató de determinar la capacidad de las células in-

munocompetentes autólogas (del mismo paciente) para reconocer y - destruir a las células malignas. Estos experimentos, demostraron que efectivamente el sistema inmunitario tiene la capacidad de -- atacar y lisar a las células tumorales a través de mecanismos tanto humorales como celulares (27, 47, 48, 70, 88, 102). El mecanismo humoral para la destrucción de las células cancerosas, se lleva a cabo por medio de la secreción de anticuerpos específicos, - por parte de los linfocitos B, que al enlazarse con los neoantígenos de las células malignas permiten la lisis de éstas por parte del sistema del complemento. Por otro lado, el mecanismo celular o citotóxico para la destrucción de las células tumorales, se puede llevar a cabo de 4 diferentes maneras, éstas son: a) ataque -- por parte de los linfocitos T capaces de reconocer los neoantígenos de membrana; b) citotoxicidad anticuerpo dependiente por parte de precursores de linfocitos B, con receptores Fc pero sin inmunoglobulinas en su superficie; c) destrucción por medio de los asesinos naturales (NK), en base a un patrón indiscriminativo y - desconocido; y d) lisis por parte de los macrófagos, los cuales - se encuentran armados en su superficie con anticuerpos especificos (27, 105, 106).

Además de los experimentos realizados con células inmunocompetentes autólogas, se han desarrollado experimentos enfocados a determinar si las células inmunológicas de tipo alogénico (de --- otra persona), tanto de pacientes con diferentes clases de tumores, como de personas sanas, son capaces de desarrollar algún tipo de respuesta hacia las células cancerosas (48, 102, 105, 106).

Observándose que sólo en los casos en los cuales se cocultivaron células malignas con linfocitos provenientes de pacientes con el mismo tipo de cáncer, hubo reacción citotóxica. Esto llevó a la conclusión de que existen neoantígenos característicos asociados a determinados tipos tumorales.

El descubrimiento de los neoantígenos asociados a las células malignas y el reconocimiento de los mecanismos por medio de los cuales las células inmunocompetentes detectan y destruyen a estas células, además de haber dado un gran impulso al desarrollo de la inmunoterapia en los pacientes, sirvió como una importante herramienta para la caracterización de las células malignas cultivadas in vitro (84). Sin embargo, en la actualidad este método de caracterización ha venido a ser menos confiable, puesto que se ha demostrado que tanto los fibroblastos normales como las células cancerosas in vitro, pueden incorporar antígenos, ya sea de membrana o citoplasmáticos, a partir del medio de cultivo (87, 88). Por lo tanto, los neoantígenos presentados por las células cancerosas cultivadas in vitro pueden deberse más bien a las condiciones de cultivo que a una característica de malignidad.

Por último cabe aclarar, que la identificación de las células malignas provenientes de sarcomas humanos cultivados in vitro, no sólo se basa en las características propias de transformación que éstas pueden exhibir, sino también en muchos de los casos en características específicas de las células normales de las cuales se originaron (42, 49, 63), como serían entre otras la acumulación de lípidos por parte de las células de liposarcoma, la fabri-

cación de matriz ósea en células de osteosarcoma, la presencia de receptores Fc y C3b en células provenientes de tumores histiocíticos.

Actualmente dentro del tratamiento del cáncer, principalmente en sarcomas humanos, existe una terapia deficiente. Esto es debido principalmente, al poco conocimiento del comportamiento de este tipo de células neoplásicas. Por esta razón y en base a que es posible el mantenimiento in vitro de células procedentes de tumores malignos humanos, en este trabajo nos propusimos establecer líneas celulares procedentes de sarcomas y determinar sus características morfológicas, bioquímicas e inmunológicas, que nos permitan de esta manera, contribuir tanto al mejor entendimiento de las alteraciones que conllevan las transformaciones malignas, como en un futuro a la elaboración de protocolos estudiados in vitro, enfocados a un tratamiento más eficiente de los pacientes con este tipo de neoplasias.

M E T O D O L O G I AA) Reporte Clínico de los Diferentes Pacientes.

Caso 1: Osteosarcoma.-

Biopsia de un osteosarcoma de tibia izquierda, sin reporte -- clínico. La biopsia fué procesada 24 hrs después de su extracción.

Caso 2: Osteosarcoma.-

Biopsia tomada de una amputación de extremidad inferior derecha de una mujer de 58 años, con diagnóstico de sarcoma osteogénico de fémur predominantemente fibroblástico, con áreas condroblásticas de región mediafisiaria, que infiltra tejidos blandos. La -- muestra fué procesada a las 24 hrs de su extracción.

Caso 3: Osteosarcoma.-

Biopsia tomada de una amputación de extremidad inferior iz--- quierda, de un hombre de 22 años, con diagnóstico de sarcoma osteo génico medular de fémur de tipo osteoblástico, con extensión a par tes blandas adyacentes. La muestra fué procesada a las 24 hrs de - su extracción.

Caso 4: Liposarcoma.-

Biopsia tomada de retroperitoneo, de una mujer de 47 años, -- con diagnóstico de liposarcoma bien diferenciado. La muestra fué - procesada a las 24 hrs de su extracción.

Caso 5: Liposarcoma.-

Biopsia tomada de un tumor localizado en el flanco derecho de un hombre de 41 años, con diagnóstico de liposarcoma bien diferen- ciado tipo mixoide con infiltración a músculo. La muestra fué pro-

cesada a las 24 hrs de su extracción.

Caso 6: Liposarcoma.-

Biopsia tomada de muslo derecho a una mujer de 16 años con diagnóstico de liposarcoma bien diferenciado tipo mixoide recidivo. La muestra fué procesada a las 24 hrs de su extracción.

Caso 7: Condrosarcoma.-

Biopsia tomada de retroperitoneo, a un hombre de 34 años, -- con diagnóstico de condrosarcoma mesenquimal. La muestra fué procesada a las 24 hrs de su extracción.

Caso 8: Leiomiosarcoma.-

Biopsia tomada de retroperitoneo, a una mujer de 78 años, -- con diagnóstico de leiomiosarcoma moderadamente diferenciado recidivo. La muestra fué procesada a las 20 hrs de su extracción.

Caso 9: Schwannoma.-

Biopsia de un Schwannoma maligno, sin reporte clínico. La -- biopsia fué procesada 24 hrs después de su extracción.

Caso 10: Histiocitoma.-

Biopsia tomada de una amputación de extremidad superior izquierda de la región escapular subcutánea, a una mujer de 17 años con diagnóstico de histiocitoma fibroso maligno variedad pleomórfica de tejidos blandos que infiltra piel, tejidos blandos del -- hombro y tercio superior de brazo y cabeza humeral. La muestra -- fué procesada a las 24 hrs de su extracción.

Caso 11: Linfoma linfoblástico.-

Biopsia tomada de un ganglio inguinal derecho, de un hombre de 20 años, con diagnóstico de linfoma linfoblástico. La muestra fué procesada a las 3 hrs de su extracción.

Caso 12: Ganglio tuberculoso.-

Biopsia tomada de un ganglio cervical hiperplásico, de una mujer de 19 años, con diagnóstico de tuberculosis. La muestra fué procesada a las 24 hrs de su extracción.

- Fibroblastos normales.-

Esta línea celular (VC-2), establecida a partir de una biopsia de prepucio de un niño de 2 meses de edad la cual fué gentilmente donada por el Instituto de Investigaciones Biomédicas, en el tercer subcultivo después de su obtención.

B) Condiciones de Cultivo.

El medio de cultivo que fué utilizado es conocido como Medio Mínimo Esencial de Eagle o Medio de Eagle (ME) (Gibco Laboratories, U.S.A.), suplementado con 20% de suero fetal de bovino (SFB) (Gibco Laboratories, U.S.A.), previamente desactivado a 56°C en baño de agua durante 30 min. Asimismo, a este medio se le adicionaron 100 U/ml de penicilina G (Laboratorios Lakeside, México), 100 µg/ml de estreptomycin (Laboratorios Lakeside, México) y 3.7 g/l de bicarbonato de sodio antes de ser utilizado (apéndice II) (21).

Para dar las mejores condiciones al cultivo, fué utilizada una incubadora de bióxido de carbono, la cual tenía una temperatura constante de 37°C con humedad a saturación y una atmósfera de 10% de bióxido de carbono en aire (4).

Todos los cultivos fueron incubados en cajas petri de cultivo (Lux Scientific Corporation, U.S.A.) de 60 x 15 mm, conteniendo cada una de ellas 5 ml de medio de cultivo (72, 96, 109).

C) Obtención de Células.

Las biopsias obtenidas fueron colocadas en cajas petri de -- cultivo, en donde se lavaron 3 veces por inmersión en solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS, del inglés phosphate buffered saline), a un pH de 7.2 (apéndice III). Posteriormente, el tejido fué cortado con tijeras en pequeños trozos de aproximadamente 1 mm^3 , los cuales fueron tratados y sembrados por diferentes métodos dependiendo de la consistencia de la biopsia que se trabajaba.

- Método de Emparedado.- Si el tejido presentaba consistencia fibrosa, se colocaban de 4 a 5 trozos de éste en la superficie de la caja de cultivo, los cuales se mantenían fijos en el sustrato de cultivo mediante la presión ejercida por un portaobjetos (a manera de emparedado), el cual fué previamente tratado con ácido nítrico al 50% durante 1 hr. Posteriormente, se les agregaron 5 ml de medio de cultivo (59).

- Método de Adherencia por Contacto.- Este método fué utilizado para cualquier tipo de biopsia, colocándose de 5 a 7 trozos de ésta en la caja de cultivo dejándose secar al aire durante 15 min (ésto se hizo con el fin de que el tejido se adhiriera al sustrato de cultivo), después de lo cual se le agregaron 5 ml de medio de cultivo, en forma cuidadosa para evitar el desprendimiento de los trozos (22).

- Método de Disgregación Mecánica.- Si la biopsia era de consistencia poco fibrosa o de origen ganglionar, se colocaban de 3 a 4 trozos de tejido en una malla de acero inoxidable de 0.25 mm,

y con el fin de separar las células no adheridas al estroma, se maceraron con ayuda de un pistilo de vidrio. Posteriormente, las células libres se obtuvieron en forma de lavado, al haber pasar por la malla 5 ml de medio de cultivo, el cual fué colectado en una caja petri de cultivo. Asimismo, los residuos de tejido que no atravesaron la malla fueron sembrados por el método de adherencia por contacto (22).

- Método de Disgregación Secuencial Enzimática.- Si la biopsia era de consistencia fibrosa, se colocaban de 5 a 7 trozos de tejido en un matraz Erlenmeyer y se incubaron durante 15 min en 5 ml de una solución de Verseno, para retirar el mayor número de cargas, a un pH de 7.7, suplementado con 0.1% de glucosa (apéndice IV), a 37°C y una agitación continua. Posteriormente, una vez desechado el sobrenadante, se procedió a una digestión de la colágena mediante una solución que contenía colagenasa (tipo IV, Sigma Chemical Co., U.S.A.) al 0.125% en PBS sin calcio y sin magnesio, suplementado con 0.1% de glucosa. Esta digestión se efectuó a 37°C durante 60 min con agitación continua. Al término de este tiempo, las células en suspensión obtenidas de la disgregación del tejido, fueron lavadas 3 veces con PBS, mediante centrifugación a 500g durante 5 min cada vez, y colocadas en cajas petri para su cultivo. Por último, el tejido restante fué incubado con una solución de tripsina (Sigma Chemical Co., U.S.A.) al 0.25% en Verseno con glucosa 0.1%, durante 30 min a 37°C en agitación continua. Se obtuvo de esta manera una disgregación completa del tejido, siendo las células así obtenidas lavadas 3 veces con PBS para su posterior cultivo in vitro (80,93).

Una vez por semana, después de iniciados los cultivos obtenidos, por cualquiera de los 4 métodos antes descritos, se cambiaban 2 ml de medio de cultivo, con el fin de renovar nutrientes y evitar acumulación de toxinas. Asimismo, los cultivos fueron revisados rutinariamente cada 3 días en un microscopio invertido, con la finalidad de observar el crecimiento celular y detectar alguna contaminación (29,71).

D) Determinación Morfológica de las Células.

La evaluación morfológica de las células, fué realizada en todos los casos, por medio de la tinción de May-Greenwald-Giemsa, como a continuación se describe: se desechó el medio de cultivo de las cajas petri y se lavaron las células 3 veces con PBS. A continuación fueron fijadas con una solución saturada de May Greenwald (Harleco Div. de ASH/México), en alcohol metílico puro durante 2 min. Al término de este tiempo, las células adheridas a la caja de cultivo fueron lavadas con agua destilada, agregándoseles posteriormente una solución de Giemsa (Sigma de México), al 10% en agua bi-distilada durante 10 min. Las células así teñidas fueron observadas al microscopio con la finalidad de determinar sus características morfológicas, así como las dimensiones celulares y nucleares, mediante el uso de un micrómetro (American Optical, U.S.A.) (40, 91, 95 111). Las dimensiones celulares medidas fueron el largo, considerándose éste como la línea imaginaria que conecta los extremos más alejados de la célula entre sí y el ancho, como la línea imaginaria perpendicular al largo que conecta los extremos más alejados de la célula entre sí. En el núcleo se midió únicamente su diámetro.

E) Subcultivos Celulares.

Tan pronto como las células obtenidas de los tumores procesados saturaron la superficie de cultivo, se procedió a subcultivarlas. Posteriormente, cada vez que la superficie de cultivo se saturaba las células eran nuevamente subcultivadas. Debido al diferente grado de proliferación de cada tipo celular, los tiempos necesarios para efectuar los subcultivos, variaba de 4 a 15 días. Para ello, el medio de cultivo fué desechado de la caja de cultivo y se agregaron 5 ml de Verseno en forma de lavado, para quitar residuos de proteínas, desechos celulares y cargas divalentes. Posteriormente, el Verseno fué desechado y se adicionaron 2 ml de una solución de tripsina al 0.025% en Verseno a un pH de 7.7, llevándose a incubación durante 5 min a 37°C. Después de la incubación, la solución de tripsina conteniendo las células en suspensión fué centrifugada a 500g durante 5 min. La solución de tripsina fué desechada después de la centrifugación y las células fueron resuspendidas en una pequeña cantidad de medio de cultivo, agregando la cantidad de medio necesaria para completar 5 ml y se procedió a incubarlas (54).

F) Criopreservación de las Líneas Celulares.

Cultivos en fase exponencial fueron tripsinizados, y las células así obtenidas fueron resuspendidas en una solución compuesta por 80% de ME suplementado con 10% de SFB y 10% de dimetil sulfóxido. Inmediatamente después, se repartieron alícuotas de 1 ml de la suspensión celular (con la cantidad de células equivalentes a un plato de cultivo), en ampollitas de 2 ml (Cooke Laboratory Products, U.S.A.). Las ampollitas fueron colocadas directamente en congela--

ción a -70°C durante toda la noche. Al día siguiente, las ampollitas fueron trasladadas a nitrógeno líquido, a una temperatura de -190°C .

Para determinar si las células fueron congeladas en forma correcta y estéril, se sacó una ampollita del nitrógeno líquido, la cual fué rápidamente puesta en un baño de agua a 37°C hasta que la muestra estuvo completamente líquida. Posteriormente, la ampollita se centrifugó a 500g durante 5 min, el sobrenadante se desechó y el botón celular fué resuspendido en medio de cultivo. Finalmente, la suspensión fué distribuida en 2 cajas de cultivo, agregándose la cantidad de medio necesario para completar 5 ml, antes de proceder a su incubación (4,40).

G) Cinética de Proliferación Celular.

Para determinar la curva de proliferación celular, fueron sembradas 14 cajas de cultivo 35 x 15 mm (Costar, U.K.), con células provenientes de cultivos creciendo en fase exponencial, a una densidad de 2.5×10^4 células por caja. La evaluación del número total de células viables se efectuó mediante tripsinización, entre las 12 y 24 hrs siguientes a la siembra y se procedió a determinar los restantes puntos de la curva por conteos que variaban entre 1 y 5 días, dependiendo del comportamiento de las células en cultivo.

H) Cultivo en Agar.

El cultivo de células en medio semisólido se realizó mediante una modificación a la técnica de bicapa en agar (77). Para ello se colocó en un plato de cultivo 3 ml de una solución a 44°C , consti-

tuida por 40% de agar (Bacto-agar, Difco Laboratories, U.S.A.) al 1.25% en agua destilada, 40% de medio doble ME y 20% de SFB, se dejó reposar 1 hr para que el agar gelificara formando la llamada -- primera capa. Posteriormente, se constituyó una segunda capa, agregando 3 ml de una solución también a 44°C, teniendo 2 partes del medio semisólido anteriormente descrito y ya sea una parte de ME o medio condicionado por las mismas células a ser sembradas, conteniendo de 8,000 a 10,000 células (previamente tripsinizadas). Los platos así sembrados se dejan reposar durante otros 20 min para que gelifique la segunda capa de agar. Se incubaron y se revisaron diariamente los cultivos durante 15 días para observar la posible formación de colonias (56,77,83).

1) Tinciones Histoquímicas.

Antes de proceder a efectuar cualquiera de las técnicas de tinciones histoquímicas descritas a continuación y con la finalidad de eliminar residuos celulares así como posibles interferencias del medio de cultivo con las diferentes tinciones, se desechó el medio de cultivo y se lavaron las células adherentes 3 veces con PBS.

- Lípidos.- Las células se secaron al aire, se rehidrataron con unas cuantas gotas de agua destilada y se les agregó etilenglicol puro (Reasol, México) durante 10 min. Posteriormente, se agregó una solución de Oil Red O (Sigma Chemical Co., U.S.A.) al 0.5% en etilenglicol y se dejó por 6 hrs. Transcurrido este tiempo, se desechó el Oil Red O y se adicionó una solución de etilenglicol al 85% en agua destilada durante 1 min, al término del cual, se enjuagaron las células con agua destilada en 2 cambios de 30 seg cada -

uno y se tiñeron con hematoxilina de Harris (Sigma de México). Con esta técnica se observan los depósitos de lípidos de color rojo -- (35).

- Fosfatasa Alcalina.- Las células se fijaron en acetona pura por 2 min a 4°C, se enjuagaron con agua destilada y se secaron al aire. En seguida, se incubaron durante 10 min a temperatura ambiente con una solución conteniendo Naftol AS-MX (apéndice V), como sustrato específico de la enzima a teñir. Pasado este tiempo, las células se enjuagaron con agua destilada y se tiñeron con hematoxilina de Harris por unos segundos, se enjuagaron con agua destilada a 38°C para virar y se secaron al aire. Se obtiene mediante esta técnica, precipitaciones de color rojo en los sitios de actividad enzimática (34). Con esta tinción se realizaron improntas de médula ósea de ratón como positivo.

- Fosfatasa Ácida.- En esta tinción fué necesario que las muestras se trataran por duplicado, pues se midió fosfatasa ácida normal y fosfatasa ácida tartrato resistente. Las células se fijaron durante 30 seg en una solución de citrato-acetona (apéndice VI); ya fijadas las muestras, se enjuagaron con agua destilada y se secaron al aire, conservándolas en estas condiciones hasta por una semana. Posteriormente, las células se incubaron a 37°C en la oscuridad durante 1 hr con una solución que contenía Naftol AS-BI ácido fosfórico (apéndice VI) como sustrato específico. Después de esto, las células se enjuagaron con agua destilada y se tiñeron con hematoxilina ácida de Mayer (Sigma Chemical Co., U.S.A.) por 5 min. Se obtiene mediante esta técnica, que en los sitios de actividad enzimática aparezcan depósitos en forma de gránulos de color marrón, -

tanto en el caso de fosfatasa ácida normal como en el caso de fosfatasa ácida tartrato resistente. Para esta técnica se emplearon como blancos positivos frotis sanguíneos de personas normales.

- Peroxidasa.- Las células se fijaron en una solución, constituida por 5 ml de formaldehído al 37% y 45 ml de etanol al 95%, por 30 seg a temperatura ambiente, se enjuagaron en agua corriente durante 2 min y se secaron al aire en la oscuridad por 10 min. Posteriormente, se incubaron a 37°C durante 30 min en la oscuridad con una solución conteniendo p-fenilenidiamina (apéndice VII), como sustrato necesario para que la enzima reaccionara. En seguida, se enjuagaron con agua corriente durante 30 seg, se secaron al aire y se tiñeron con hematoxilina ácida de Mayer. Esta técnica muestra la actividad enzimática como gránulos cafés o negros. Análogamente para esta técnica se emplearon como blancos positivos frotis sanguíneos de personas normales.

J) Determinación de Producción de Colágena.

Con la finalidad de obtener un buen número de células, en esta técnica se utilizaron de 6 a 8 cajas de cultivo con cultivos saturantes. Para obtener un medio de cultivo sin proteínas séricas, se les extrajo el medio nutritivo, se lavaron 3 veces con PBS y se incubaron durante 3 días en presencia exclusiva de ME. Al término de este período de incubación, el medio se colectó en un tubo de ensaye y las células se suspendieron en otro tubo (con la ayuda de un gendarme) en 2 ml de agua destilada (4).

La técnica de determinación de colágena esta basada en la cantidad de hidroxiprolina de las muestras, y se llevó a cabo con un método que registra concentraciones de menos del 2% de hidroxipro-

lib. con respecto a aminoácidos totales.

En ampolletas de vidrio de 1 ml, se introdujeron cuidadosamente, 0.50 ml de la muestra problema (ya sea la suspensión celular o el ME condicionado) y 0.5 ml de ácido clorhídrico 12N. Estas ampolletas fueron cerradas al vacío en la flama, sin dejar burbujas en el interior de ella, para después colocarlas en un baño de Nujol a 130°C durante 12 hrs. Posteriormente, las ampolletas se abrieron y las muestras ya hidrolizadas se colocaron en tubos de ensaye en donde se neutralizaron con una solución de hidróxido de sodio 2.5N, usando como indicador rojo fenol (Sigma de México). Después las muestras fueron diluidas con una cantidad suficiente de agua destilada, para que la concentración final de sal producida en la neutralización no excediera de 0.4M.

Para la cuantificación se utilizó como referencia hidroxiprolina (hidroxy-L-prolina, crystalline, Sigma Chemical Co., U.S.A.) a concentraciones conocidas, para una curva patrón que iba de 1 a 5 µg por cada 2 ml, siendo éste el mismo volumen empleado para las muestras problema.

Teniendo ya todos los tubos de la curva, y las muestras preparadas, se adicionó 1 ml de cloramina T (apéndice VIII), agitándose vigorosamente y después dejándose reposar por 20 min a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, se agregó 1 ml de ácido perclórico 0.15M, mezclándose y dejándose reposar 5 min a temperatura ambiente. Finalmente, se colocó 1 ml de p-dimetilaminobenzaldehido (apéndice VIII), mezclando vigorosamente hasta que se obtuvo una solución homogénea e inmediatamente después los tubos fueron colocados en una baño de agua a 60°C durante 20 min.

Después de esta incubación, se procedió a adicionarles 10 ml de benceno y se agitaron vigorosamente durante 5 seg, repitiéndose esta operación una vez más. Inmediatamente después, se introdujo cuidadosamente una pipeta hasta la capa de agua, se tomaron -- 3.5 ml los cuales fueron colocados en una celda y se leyó a 557 nm (Pye Unicam, SP-8-100 ultraviolet spectrophotometer). Posteriormente, se agregó a cada tubo 0.2 ml de peróxido de hidrógeno al 30% en agua bidestilada, se mezcló suavemente y se dejó reposar durante durante 5 min, después de lo cual se leyeron nuevamente a 557 nm. Se preparó un blanco con agua destilada, el cual fué leído 5 min después de la adición del peróxido. Este valor blanco se restó al obtenido en la curva estandar para cada tubo (0 hasta 5 µg) (112).

Para la corrección de la lectura de las muestras problema, -- que fueron llevadas a la gráfica, se utilizó la siguiente fórmula:

$$(A - B) - 0.12 (B - C)$$

en donde A = absorvancia de la muestra después de la extracción con benceno, B = absorvancia de la muestra después del peróxido, C = absorvancia del blanco de agua con peróxido y 0.12 = factor empírico.

Los valores obtenidos de hidroxiprolina por medio de esta -- técnica fueron transformados a cantidad de colágena, tomando en cuenta que la hidroxiprolina constituye el 20% de la molécula de colágena (51, 62). Por último, el cálculo de la producción de colágena se llevó a cabo de acuerdo a la siguiente fórmula:

(Cantidad de colágena total (medio de cultivo + células)/No. total de células cultivadas)/3 días

K) Determinación de Lisozima.

En la determinación de la secreción de lisozima por parte de las células, se utilizó el mismo ME condicionado, recolectado para la medición de colágena. Para ello, se colocó 0.025 ml de este medio en 1 ml de suspensión de paredes bacterianas de Micrococcus lysodeikticus (Sigma Chemical Co., U.S.A.) (apéndice IX) que fué previamente incubado a 34°C en las celdas del espectrofotómetro -- (Pye Unicam, SP-8-100 ultraviolet spectrophotometer). El decremento en la turbidez fué analizado de acuerdo a la absorbancia de -- 640 nm, realizandose las lecturas en el primer minuto de lisis. -- La cantidad de lisozima presente en la muestra, se obtuvo a partir de la preparación de una curva estandar que iba de 5 a 20 ug/ml de lisozima (Merck, Alemania) (apéndice IX) (117).

L) Determinación de Receptores para Fc y C3b.

Para determinar si existían receptores para Fc y C3b en las membranas celulares, se utilizó la técnica de formación de rosetas (11). Se emplearon cultivos resembrados 72 hrs previas al experimento, se lavaron las células adheridas 3 veces con PBS sin calcio y sin magnesio y se adicionó 0.5 ml de una suspensión ya sea con eritrocitos de carnero (EC) activados con IgG anti EC --- (apéndice X), para la medición de receptores para Fc, o con 0.5 ml de EC activados con IgG anti EC más complemento humano (apéndice X), para la medición de receptores para C3b. Posteriormente, --

se incubaron las células durante 2 hrs con 4.5 ml de PBS y durante 24 y 48 hrs con 4.5 ml de ME. Al término de la incubación, los cultivos se lavaron 3 veces con PBS, se tiñeron con May Greenwald - Giemsa y se observaron al microscopio (42).

M) Fagocitosis.

Para evaluar la posible capacidad fagocítica de las células, se tomaron subcultivos con 72 hrs de incubación, los cuales se lavaron 3 veces con PBS y se incubaron ya sea durante 2, 24 y 48 -- hrs con 5 ml de ME más 0.2 ml de PBS conteniendo esferas de látex de 0.5 μ de diámetro (Sigma Chemical Co., U.S.A.). Al término de los diferentes periodos de incubación, los cultivos fueron lavados 3 veces con PBS y teñidos con May Greenwald - Giemsa. Por último, las preparaciones fueron revisadas al microscopio, con el fin de observar si las células presentaron algún grado de activación fagocítica hacia las esferas de látex (42).

N) Obtención de Leucocitos Mononucleados.

Se obtuvieron 10 ml de sangre periférica de donadores adultos normales con una jeringa que contenía 0.1 ml de heparina (Laboratorios Lakeside, México) con 100 U/ml. Posteriormente, la sangre se colocó en un tubo de ensaye y fué mezclada con igual cantidad de PBS suplementado con glucosa al 0.1%.

En tubos de ensaye que contenían 2.5 ml de Ficoll-Paque ---- (Pharmacia Fine Chemicals AB, Suecia) (apéndice XI), con una densidad de 1.077 gr/ml, se colocaron 5 ml de la mezcla de sangre -- con PBS y se centrifugó a 400 g durante 30 min. Al término de es-

te tiempo, la banda de leucocitos mononucleados en la interfase -
fué cuidadosamente extraída pasándola a otro tubo de ensaye, don-
de fueron lavados 3 veces con 5 ml de PBS y finalmente resuspendi-
dos en 5 ml de medio de cultivo (4, 23). La cantidad de leucoci-
tos obtenida fué evaluada utilizando una cámara de Neubauer.

O) Interacción de los Leucocitos con las Diferentes Líneas Celulares.

Para determinar la posible interacción de los leucocitos de sangre periférica con las diferentes líneas celulares cultivadas, se procedió a subcultivar 100,000 células por caja de cultivo, in cubandose por un lapso de 3 días, para permitirles estar en fase de proliferación exponencial. Después de este tiempo, se agregó a cada plato de cultivo 1×10^6 leucocitos de sangre periférica y - finalmente se evaluó la interacción celular a las 24 hrs, median-
te la determinación del número de leucocitos que se adherían a ca-
da célula, siendo interacción débil cuando se adherían de 1 a 3 -
leucocitos, fuerte cuando se adherían de 4 a 15 y como interac-
ción muy fuerte con más de 15 leucocitos adheridos a las células
blanco (16).

P) Número Cromosómico.

Cultivos celulares proliferando en fase exponencial fueron -
incubados de 2 a 12 hrs en presencia de colchicina (Sigma Chemi-
cal Co., U.S.A.), a una concentración de 0.8 $\mu\text{g/ml}$ en el medio. -
Posteriormente, las células fueron tripsinizadas, centrifugadas -
durante 5 min a 500 g (las condiciones de centrifugación fueron -

las mismas en toda la técnica), y resuspendidas en 5 ml de medio hipotónico compuesto por una parte de medio de cultivo y 2 partes de agua bidestilada. Después de 10 min de este tratamiento, las células se centrifugaron y al botón obtenido se le adicionaron, cuidadosamente, 2 ml de una solución fijadora compuesta por 3 partes de metanol puro y una parte de ácido acético glacial, en el cual se mantuvieron durante 10 min. Al cabo de este tiempo, se desechó el fijador y las células fueron lavadas 3 veces con fijador fresco, siendo finalmente resuspendidas en 1 ml de éste (4, - 15).

En portaobjetos previamente almacenados en alcohol etílico al 70%, se goteó desde 1 m de altura la solución conteniendo a las células y se secaron rápidamente a la flama. Las preparaciones así obtenidas, fueron teñidas durante 10 min con Giemsa al 10% en agua bidestilada y observadas al microscopio con el objetivo de 100 X de inmersión, buscándose preferentemente mitosis dispersas que no tuvieran sobreposición de las ramas de los cromosomas. Se contaron de 30 a 50 mitosis, para registrar el número cromosómico en cada experimento (41).

Q) Varios.

Las muestras de tejido de sarcomas fueron obtenidas de los Hospitales, General de la Secretaría de Salubridad y Asistencia y de Oncología del Instituto Mexicano del Seguro Social.

Las biopsias fueron transportadas en 15 ml de medio nutritivo desde su extracción hasta su recepción en el laboratorio. Aquellas que no fueron procesadas inmediatamente se preservaron en re

refrigeración a 4°C hasta el momento de su cultivo. Nunca se mantuvieron en refrigeración más de 24 hrs.

Todos los experimentos realizados con células se hicieron antes de la séptima resiembra, por duplicado y un mínimo de 2 veces.

Todos los medios y soluciones utilizadas para el cultivo y subcultivo de las células fueron previamente calentadas a 37°C en un baño de agua.

Todas las soluciones utilizadas para el cultivo fueron previamente esterilizadas por medio de filtros (Milipore, type GS, - U.S.A.) de 0.22 μ de poro y solo en el caso de la solución de colagenasa se utilizó un filtro de 0.44 μ .

Los reactivos utilizados, a menos de así especificarse, fueron de grado reactivo J.T. Baker, México. Asimismo, el material de cristalería fué de tipo Pyrex.

R E S U L T A D O S

A partir del cultivo de biopsias provenientes de 10 sarcomas humanos se obtuvieron células en estado de proliferación, las cuales fueron caracterizadas morfológicamente. Sin embargo, sólo en 5 casos se lograron obtener líneas celulares, a las que además de la caracterización morfológica, se les determinaron los siguientes parámetros: cinética de proliferación celular, crecimiento en agar, producción de colágena, presencia de fosfatasa alcalina y -ácida, interacción con leucocitos de sangre periférica humana y número cromosómico.

Además, se hicieron determinaciones más específicas para las células provenientes de tumores histiocíticos como son secreción de lisozima, presencia de receptores para Fc y C3b, actividad fagocítica y presencia de peroxidasa. Asimismo, se determinó la posible presencia de lípidos para las células provenientes de sarcomas de tejido adiposo.

Ahora bien, dado que las células tumorales de origen mesenquimal cultivadas in vitro, exhiben características similares a las de los fibroblastos normales humanos, fué necesario, con la finalidad de tener un punto de comparación, cultivar fibroblastos normales de piel, fibroblastos reactivos procedentes de un proceso maligno (linfoma linfoblástico) y fibroblastos reactivos de un proceso no maligno (ganglio infartado de un paciente con tuberculosis). Cabe aclarar, que a los diferentes tipos de fibroblastos, se les determinaron las características morfológicas y solamente

los 2 primeros se utilizaron como puntos de comparación para las restantes pruebas realizadas en las líneas celulares malignas obtenidas.

A) Obtención de Líneas Celulares y su Morfología:

- Células Obtenidas a Partir de Tumores Oseos.

Caso 1: Osteosarcoma de Tibia Izquierda.

Los trozos de tibia izquierda, provenientes de un osteosarcoma, sembrados por el método de adherencia por contacto, dieron lugar a células que comenzaron a migrar hacia el sustrato de cultivo en la periferia de éstos, a partir de los 15 días de incubación, obteniéndose confluencia celular 30 días después. Se observó proliferación celular en el 73% del total de los 11 platos de cultivo sembrados (tabla 2).

Las células obtenidas de esta manera, presentaban generalmente forma estrellada o irregular, con medidas que iban de 109 a 293 μ de diámetro y de 52 a 108 μ de ancho. El citoplasma era abundante de color rosáceo, con una gran cantidad de pequeñas granulaciones rojas, y una zona perinuclear con una alta densidad de pequeñas vacuolaciones.

El núcleo era ovoide de color rojo púrpura, con un diámetro entre 32 y 49 μ , en donde se podía observar una cromatina de aspecto fino y de 3 a 5 nucleolos (tabla 3).

Estas células se mantuvieron en cultivo continuo durante 6 - semanas.

Caso 2: Osteosarcoma de Fémur.

Los trozos de tejido provenientes de un osteosarcoma de fémur, sembrados por el método de adherencia por contacto, dieron lugar a células que comenzaron a migrar hacia el sustrato de cultivo en la periferia de éstos a partir de los 3 días de incubación, obteniéndose confluencia celular 20 días después. Además, se llevó a cabo el método de disgregación secuencial enzimática con los trocitos de tejido del tumor, obteniéndose células adherentes a las 24 hrs de incubación y una confluencia de éstas 5 días después. Se observó proliferación celular en el 87% del total de los 17 platos cultivados (tabla 2).

Cabe aclarar que las células obtenidas por los 2 diferentes métodos, presentaron las mismas características morfológicas, por lo cual se consideraron como un solo tipo celular y se describen de la misma manera.

Estas células se distribuyeron al azar en el sustrato de cultivo y se encontraron sobrepuestas aún sin haber llegado a la confluencia. Al alcanzar altas densidades, formaban pequeñas islas de agrupaciones celulares de varias capas de grosor (fig. 2).

Las células obtenidas de estas maneras presentaban generalmente formas estrelladas o irregulares, con medidas que iban de 252 a 706 μ de diámetro y de 129 a 378 μ de ancho. El citoplasma era muy abundante y reticulado, de color azul intenso, con gran cantidad de granulaciones rojas, adheridas a fibras que incluso se prolongaban fuera de éste a manera de rosario y una zona perinuclear con una alta densidad de pequeñas vacuolaciones, también

se presentó una alta proporción de matriz extracelular que en ocasiones llegaba a formar una estructura velamentosa que incluso llegaba a cubrir a las células.

El núcleo era ovoide de color rojo, con un diámetro entre 39 y 92 μ , en donde se pudo observar una cromatina poco granulada -- y de 3 a 5 nucleolos (tabla 3).

Estas células se han mantenido en cultivo continuo durante 12 meses mediante subcultivos cada 10 días, por lo cual se consideró que se había establecido una línea celular y se le dio la clave de OSX-1. Asimismo, se procedió a la criopreservación en nitrógeno líquido de estas células.

Caso 3: Osteosarcoma de Fémur.

Los trozos de tejido, provenientes de un osteosarcoma de fémur, sembrados por el método de adherencia por contacto, dieron lugar a células que comenzaron a migrar hacia el sustrato de cultivo hacia la periferia de éstos a partir de los 7 días de incubación, obteniéndose confluencia celular 15 días después. Además, para esta biopsia se llevó a cabo el método de disgregación secuencial enzimático con los trocitos de tejido, obteniéndose células adherentes a los 15 días de incubación y una confluencia de éstas 7 días más tarde. Se observó proliferación celular en el 95% del total de los 16 platos sembrados (tabla 2).

Cabe aclarar, que las células obtenidas por los 2 diferentes métodos presentaron las mismas características morfológicas, por lo cual se consideraron como un sólo tipo celular y se describen aquí de la misma manera.

Estas células se distribuyeron al azar en el sustrato de cultivo y se encontraban sobrepuestas aún sin haber llegado a la confluencia. Al alcanzar altas densidades, formaban pequeñas islas de agrupaciones celulares de varias capas de grosor (fig. 3).

Las células obtenidas de esta manera presentaban generalmente formas estrelladas o irregulares, con medidas que iban de 325 a 611 μ de diámetro y de 117 a 352 μ de ancho. El citoplasma era muy abundante y de tipo reticulado, de color azul, con gran cantidad de granulaciones de color rojo adheridas a fibras que incluso se prolongaban fuera de éste a manera de rosario y una zona perinuclear de color azul intenso, con una alta densidad de pequeñas vacuolaciones, también se presentó una alta proporción de matriz extracelular que en ocasiones llegaba a formar una estructura velamentosa.

El núcleo era ovoide, de color rojo, con un diámetro entre 32 y 54 μ , en donde se podía observar una cromatina de aspecto granular y de 3 a 5 nucleolos, presentándose en ocasiones células con 2 y 3 núcleos (tabla 3).

Estas células se han mantenido en cultivo continuo durante más de 12 meses, mediante subcultivos cada 9 días, por lo cual se consideró que se había establecido una línea celular y se le dió la clave de OSX-2. Asimismo, se procedió a la criopreservación en nitrógeno líquido de estas células.

- Células Obtenidas a Partir de Tumores de Tejido Adiposo.

Caso 4: Liposarcoma Retroperitoneal.

Los trozos de tejido, provenientes de un liposarcoma retroperitoneal, sembrados por el método de adherencia por contacto, dieron lugar a células que comenzaron a migrar al sustrato de cultivo en la periferia de éstos a partir de los 8 días de incubación, obteniéndose confluencia celular 43 días después. Se observó proliferación celular en el 60% de los 5 platos de cultivo sembrados (tabla 2).

Las células obtenidas de esta manera, presentaban generalmente forma irregular, con medidas que iban de 173 a 387 μ de diámetro y de 101 a 225 μ de ancho. El citoplasma era abundante de color rosa claro, en donde a veces se presentaban vacuolas y una escasa cantidad de granulaciones de color rojo.

El núcleo era ovoide, redondo y en ocasiones cariorréxico de color rosa claro, con un diámetro entre 19 y 53 μ , en donde se podía observar una cromatina de aspecto granulado y de 1 a 2 nucleolos (tabla 3).

Estas células se mantuvieron en cultivo continuo durante 3 meses.

Caso 5: Liposarcoma Bien Diferenciado.

Los trozos de tejido, provenientes de un liposarcoma bien diferenciado, sembrados por el método de disgregación secuencial enzimática, se adheririeron al sustrato de cultivo a las 48 hrs de haber sido incubados, obteniéndose confluencia celular 4 días después. Se observó proliferación celular en el 100% de los 8 platos

de cultivo sembrados (tabla 2).

Estas células presentaron inhibición por contacto, limitando su estado de saturación a una monocapa parecida a la de fibroblastos de tejido conjuntivo (fig. 4).

Las células obtenidas de esta manera presentaban generalmente forma irregular, con medidas que iban de 272 a 589 μ de diámetro y de 91 a 210 μ de ancho. El citoplasma era muy abundante de color rojo y una zona perinuclear de color azul intenso con una alta densidad de vacuolaciones.

El núcleo era ovoide o redondo y en algunos casos cariorréxico, de color rosa, con un diámetro entre 33 y 64 μ , en donde se podía observar una cromatina de aspecto ligeramente granulado y de 1 a 5 nucleolos. En ocasiones se presentaban células con 2 y 3 núcleos (tabla 3).

Estas células se han mantenido en cultivo continuo durante más de 8 meses, mediante subcultivos cada 3 semanas, por lo que se consideró que se había establecido una línea celular y se le dió la clave de LNG-83. Asimismo, se procedió a la criopreservación en nitrógeno líquido de estas células.

Caso 6: Liposarcoma Recidivo.

Los trozos de tejido, provenientes de un liposarcoma recidivo, sembrados por el método de adherencia por contacto, dieron lugar a células que comenzaron a migrar hacia el sustrato de cultivo en la periferia de éstos a partir de las 48 hrs de incubación, obteniéndose confluencia celular 9 días después. Además, se llevó a cabo el método de disgregación secuencial enzimática con los --

trozos de tejido del tumor, obteniéndose células adherentes a las 24 hrs de incubación y una confluencia celular de éstas 10 días después. Se observó proliferación celular en el 100% de las 8 cajas de cultivo sembradas (tabla 2).

Estas células se distribuyeron al azar en el sustrato de cultivo y se encontraban sobrepuestas aún sin haber llegado a la confluencia. Al alcanzar altas densidades, formaban pequeñas islas de agrupaciones celulares de varias capas de grosor (fig. 5).

Cabe aclarar, que las células obtenidas por los 2 diferentes métodos, presentaron las mismas características morfológicas, por lo cual se consideraron de un sólo tipo celular y fueron descritas de la misma manera.

Las células obtenidas presentaron formas generalmente de tipo fusiforme, triangular e irregular, con medidas que iban de 197 a 330 μ de diámetro y de 44 a 117 μ de ancho. El citoplasma era abundante de color azul intenso, con una moderada cantidad de granulaciones de color rojo distribuidas al azar y una zona perinuclear con baja densidad de pequeñas vacuolaciones.

El núcleo era ovoide de color rojo, con un diámetro entre 19 y 34 μ , en donde se podía observar una cromatina de aspecto fino y de 1 a 5 nucleolos (tabla 3).

Estas células se han mantenido en cultivo continuo durante más de 8 meses, mediante subcultivos cada 6 días, por lo cual se consideró que se había establecido una línea celular y se le dió la clave de LPF-59. Asimismo, se procedió a la criopreservación en nitrógeno líquido de estas células.

- Células Obtenidas a Partir de Tumores de Diferentes Tejidos.

Caso 7: Condrosarcoma Mesenquimal.

Los trozos de tejido, provenientes de un condrosarcoma mesenquimal de retroperitoneo, sembrados por el método de adherencia - por contacto, dieron lugar a células que comenzaron a migrar hacia el sustrato de cultivo en la periferia de éstos a partir de - los 7 días de incubación, obteniéndose confluencia celular 30 días después. Se observó proliferación celular en el 36% del total de las 11 cajas de cultivo sembradas (tabla 2).

Las células obtenidas de esta manera, presentaron generalmente forma estrellada o triangular con prolongaciones dendríticas, con medidas que iban de 199 a 399 μ de diámetro y de 100 a 223 μ de ancho. El citoplasma era muy abundante de color azul claro, en donde a veces se presentaban grandes vacuolas, una densidad baja de granulaciones rojas esparcidas al azar y una zona perinuclear de color azul oscuro en donde algunas veces se presentaba una alta densidad de pequeñas vacuolas que le dan apariencia reticular.

El núcleo era ovoide de color rojo, con un diámetro entre 32 y 49 μ , en donde se podía observar una cromatina de aspecto fino y de 1 a 6 nucleolos (tabla 3, fig. 6).

Estas células se mantuvieron en cultivo continuo durante 5 - meses.

Caso 8: Leiomiocarcoma.

Los trozos de tejido, provenientes de un leiomiocarcoma retroperitoneal recidivo, sembrados por el método de disgregación - secuencial enzimática, se adhirieron al plato de cultivo a las 48

hrs de incubación, obteniéndose confluencia celular 6 días después. Se observó proliferación celular en el 100% del total de los 12 platos de cultivo sembrados (tabla 2).

Cuando los cultivos se encontraban saturados, formaban agrupaciones celulares (como islas), con varias capas de grosor aún sin haber llegado a la confluencia total.

Las células obtenidas de esta manera presentaban forma exclusivamente de huso, con medidas que iban de 158 a 234 μ de diámetro y de 18 a 100 μ de ancho. El citoplasma era escaso de color azul intenso con vacuolaciones pequeñas distribuidas al azar.

El núcleo era ovoide o redondo, de color rojo púrpura, con un diámetro entre 31 y 49 μ , en donde se podía observar cromatina granulada y de 1 a 2 nucleolos. En la mayoría de las células se presentaban de 2 a 5 núcleos, algunas veces se presentaban equidistantes entre sí y en otras ocasiones reunidos en el centro de la célula (tabla 3, fig. 7).

Estas células se mantuvieron en cultivo continuo durante 7 semanas.

Caso 9: Schwannoma Maligno.

Los trozos de tejido provenientes de un Schwannoma maligno, sembrados por el método de adherencia por contacto, dieron lugar a células que comenzaron a migrar hacia el sustrato de cultivo en la periferia de éstos a partir de los 10 días de incubación, obteniéndose confluencia celular 5 días después. Se observó proliferación celular en el 66% de los 8 platos de cultivo sembrados (tabla 2).

Las células obtenidas de esta manera, presentaron generalmente formas irregulares o poligonales, con prolongaciones de origen dendrítico, con medidas que iban de 179 a 455 μ de diámetro y de 100 a 298 μ de ancho. El citoplasma era abundante de color violeta en donde a veces se presentaron grandes vacuolas.

El núcleo era ovoide, irregular y en algunos casos cariorréxico, de color rojo púrpura, con un diámetro entre 24 y 60 μ , en donde se podía observar una cromatina de aspecto granulado y generalmente 2 nucleolos (tabla 3, fig. 8).

Estas células se mantuvieron en cultivo continuo durante 3 - semanas.

Caso 10: Histiocitoma Fibroso Maligno.

Los trozos de tejido, provenientes de un histiocitoma fibroso maligno, sembrados por el método de adherencia por contacto, dieron lugar a células que comenzaron a migrar hacia el sustrato de cultivo en la periferia de éstos, a partir de los 30 días de incubación obteniéndose confluencia celular 8 días después. Se observó proliferación en el 70% de los 10 platos de cultivo sembrados (tabla 2).

Cuando los cultivos se encontraban saturados formaban agrupaciones celulares (como islas), con varias capas de grosor, aún sin llegar nunca a confluencia (fig. 9).

Las células obtenidas de esta manera presentaban generalmente formas irregulares, con medidas que iban de 200 a 386 μ de diámetro y de 101 a 225 μ de ancho. El citoplasma era abundante de color violeta intenso, con una cantidad moderada de granulaciones

rojas adheridas a fibras que incluso se prolongaban fuera de éste a manera de rosario y una zona perinuclear con una baja densidad de pequeñas vacuolaciones.

El núcleo era ovoide de color rojo púrpura, con un diámetro entre 33 y 55 μ , en donde se podía observar una cromatina de aspecto reticular y de 2 a 3 nucleolos (tabla 3).

Estas células se han mantenido en cultivo continuo durante más de 12 meses, mediante subcultivos cada 20 días, por lo cual se consideró que se había establecido una línea celular y se le dió la clave de HBV-60. Asimismo, se procedió a la criopreservación en nitrógeno líquido de estas células.

- Células Obtenidas a Partir de Ganglios Linfáticos.

Caso 11: Linfoma Linfoblástico.

Los trozos de tejido, provenientes de un linfoma linfoblástico, sembrados por el método de adherencia por contacto, dieron lugar a células que comenzaron a migrar hacia el sustrato de cultivo en la periferia de éstos, a partir de los 30 días de incubación obteniéndose confluencia celular 7 días después. Se observó proliferación celular en el 37% de los 12 platos de cultivo sembrados (tabla 2).

Las células al llegar a confluencia formaron haces paralelos y dieron la apariencia de tener un cierto grado de orientación. En este caso, no existió inhibición por contacto, pues las células continuaban proliferando hasta llegar a formar varias capas, formándose una nueva capa sólo hasta que la anterior se encontraba confluyente (fig. 10). Cabe mencionar que las células presenta-

ban una adherencia débil al sustrato de cultivo, ya que en ocasiones bastaba el lavado con Verseno para separarlas de éste.

Las células obtenidas de esta manera, presentaban generalmente forma de uso parecida a la de fibroblastos de tejido conjuntivo, con medidas que iban de 100 a 240 μ de diámetro y de 14 a 62 μ de ancho. El citoplasma era escaso, de color azulado y en algunas ocasiones se presentaban pequeñas vacuolaciones en la zona perinuclear.

El núcleo era ovoide de color rosa claro, con un diámetro entre 10 y 50 μ , en donde se podía observar una cromatina de aspecto fino y de 2 a 4 nucleolos (tabla 3).

Cuando los cultivos se encontraban confluentes aparecían células gigantes, que llegaban a medir hasta 514 μ de diámetro y 266 μ de ancho, con un núcleo de 53 μ de diámetro.

Estas células se han mantenido en cultivo continuo durante más de 12 meses, mediante subcultivos cada 6 días, por lo cual se consideró que se había establecido una línea celular y se le dió la clave de LFE-24. Asimismo, se procedió a la criopreservación en nitrógeno líquido de estas células.

Además de las células adherentes antes descritas, se obtuvo una proliferación de células en suspensión de tipo linfocítico a los 17 días de haber sembrado, por el método de disgregación mecánica, los trozos del ganglio linfático.

Las células obtenidas de esta manera, presentaron generalmente forma redonda, con medidas que iban de 29 a 46 μ de diámetro. El citoplasma era abundante, de color azul oscuro y en algunas ocasiones presentaba vacuolaciones de diversos tamaños.

El núcleo era oval o irregular, excéntrico de color rojo, con un diámetro entre 18 y 38 μ , en donde se podía observar una cromatina finamente reticulada, con ausencia de nucleolos (fig. 11).

Estas células se mantuvieron en cultivo continuo durante 3 semanas, y se les encontró un índice mitótico de 12.6% en su fase de crecimiento exponencial.

Caso 12: Ganglio Tuberculoso.

Los trozos de tejido de un ganglio cervical proveniente de un paciente con tuberculosis, sembrados por el método de adherencia - por contacto, dieron lugar a células que comenzaron a migrar hacia el sustrato de cultivo en la periferia de estos a partir de los 13 días de incubación, obteniéndose confluencia celular 35 días después. Se observó proliferación celular en el 38% del total de los 13 platos sembrados (tabla 2).

Antes de llegar a la confluencia, estos cultivos formaban -- agrupaciones celulares como islas con varias capas de grosor, las cuales se interconectaban entre sí al saturarse el cultivo, dando una apariencia de entrecruzado y quedando una monocapa celular entre ellas, observándose además, la formación de matriz extracelular de apariencia velamentosa (fig. 12).

Las células obtenidas de esta manera presentaban generalmente forma triangular, fusiforme o irregular, con prolongaciones velamentosas, con medidas que iban de 191 μ a 338 μ de diámetro y de 27 a 147 μ de ancho. El citoplasma era abundante de color azul claro, con gran cantidad de granulaciones rojas distribuidas al azar y -- una zona perinuclear de color azul intenso con una alta densidad -- de pequeñas vacuolaciones.

El núcleo era ovoide o redondo de color rojo, con un diámetro entre 21 y 90 μ , donde se podía observar una cromatina de aspecto fino y de 1 a 4 nucleolos (tabla 3).

Estas células se mantuvieron en cultivo continuo durante 7 meses, mediante subcultivos cada 7 días, por lo que se consideró que se había establecido una línea celular y se le dió la clave de GTG-3. Actualmente, sólo se les mantiene criopreservadas en nitrógeno líquido.

- Fibroblastos Normales de Piel Humana (VC-2).

Las células de esta línea crecían de manera ordenada, formando haces paralelos, con una orientación definida. Al llegar a confluencia, exhibían inhibición por contacto, pues detenían su crecimiento limitando de esta manera su estado de saturación a una monocapa celular (fig. 13).

Estas células presentaban forma de huso, con medidas que iban de 111 a 271 μ de diámetro y de 16 a 47 μ de ancho. El citoplasma era escaso de color azul, con pocas granulaciones arregladas sobre fibras y vacuolaciones pequeñas distribuidas al azar.

El núcleo era ovoide de color rojo, con un diámetro entre 20 y 29 μ , en donde se podía observar una cromatina de aspecto granulado y de 1 a 6 nucleolos.

Estas células se han mantenido en cultivo continuo durante -- más de 11 meses, mediante subcultivos cada 5 días. Asimismo, células de esta línea fueron criopreservadas en nitrógeno líquido.

T A B L A No. 2

EFICIENCIA EN LA OBTENCIÓN DE LAS PRIMERAS CELULAS ADHERIDAS AL SUSTRATO DE CULTIVO, A PARTIR DE LAS DIFERENTES BIOPSIAS.

TIPO DE BIOPSIA CULTIVADA	TIEMPO ENTRE LA EXTRACCION Y EL PROCESADO DE LA BIOPSIA (hrs)	TIEMPO EN QUE SE ADHIEREN LAS PRIMERAS CELULAS AL SUSTRATO (hrs)	EFICIENCIA DE PROLIFERACION EN LOS CULTIVOS (%)
Osteosarcoma de tibia izquierda	24	15	73
Osteosarcoma de fémur	24	3 (1*)	87
Osteosarcoma de fémur	20	7 (5*)	95
Liposarcoma retroperitoneal	24	8 (2*)	60
Liposarcoma bien diferenciado	24	2 (2*)	100
Liposarcoma recidivo	24	2 (1*)	100
Condrosarcoma mesenquimal	24	7	36
Leiomiomas retroperitoneal	24	10 (2*)	100
Schwannoma maligno	24	10	66
Histiocitoma fibroso maligno	24	30	70
Linfoma linfoblástico (células adherentes)	3	30	37
Ganglio tuberculoso	6	13	38

(*) Este es el tiempo que tardaron las células a adherirse al sustrato de cultivo, después de haber sido tratados los cultivos por el método secuencial enzimático.

MORFOLOGÍA Y CARACTERÍSTICAS DE CRECIMIENTO DE LAS CELULAS CULTIVADAS

PROCEDENCIA DE LAS CELULAS CULTIVADAS	T A M A R O Diámetro (μ) Ancho (μ)	FORMA CELULAR	H U C L E O Forma Diámetro (μ) Color Cromatina Nucleolos	C I T O P L A S M A Cantidad Relativa Color Zona peri nuclear Vacuolación Granulaciones	Otras Estructuras	CARACTERÍSTICAS DE CRECIMIENTO DE LOS CULTIVOS CELULARES
Osteosarcoma de tibia izquierda	192 ±20* 77 ±6*	Estrellada irregular	Ovoide 28 ±1* Rojo púr-pura Fina 3 - 5	Abundante Rosaceo Alta densidad de pequeñas vacuolaciones.	No se observa.	Gran cantidad de color rojo Ninguna N. D.
Osteosarcoma de fémur (OSX-1)	416 ±31 261 ±21	Estrellada irregular	Ovoide 51 ±4 Rojo Granulada 3 - 5	Muy abundante Azul intenso Alta densidad de pequeñas vacuolaciones.	No se observa.	Gran cantidad de granulaciones rojas Reticulado, fibras y capa sabanoide extracelular Agrupaciones celulares como islas.
Osteosarcoma de fémur (OSX-2)	400 ±25 220 ±21	Estrellada irregular	Ovoide redondo 41 ±2 Rojo Granulada 3 - 5	Muy abundante Azul con gran cantidad de pequeñas vacuolaciones.	No se observa.	Gran cantidad de granulaciones rojas. Reticulado, fibras y capa sabanoide extracelular Agrupaciones celulares como islas.
Liposarcoma retroperitoneal	322 ±21 214 ±22	Irregular	Redondo cariorrético 43 ±8 Rojo claro Granulada 1 - 2	Abundante Rosa claro No presenta Escasa Escasa cantidad de granulaciones rojas	Ninguna	Ninguna N. D.
Liposarcoma (LNG-83)	345 ±32 153 ±12	Irregular	Ovoide redondo cariorrético 43 ±3 Rojo Granulada 1 - 5	Muy abundante Rojo Azul intenso con alta densidad de pequeñas vacuolaciones.	No se observa.	Ninguna Ninguna Inhibición por contacto.
Liposarcoma recidivo (LFP-59)	237 ±13 71 ±8	Fusiforme triangular irregular	Ovoide 71 ±8 Rojo Fina 1 - 5	Abundante Azul intenso Baja densidad de pequeñas vacuolaciones	No se observa.	Moderada cantidad de granulaciones rojas Ninguna Agrupaciones celulares como islas.
Condrosarcoma mesenquimal	298 ±21 141 ±15	Estrellada irregular con prolongaciones dendríticas	Ovoide 41 ±2 Rojo Fina 1 - 6	Muy abundante Azul claro Azul oscuro - baja densidad de pequeñas vacuolaciones.	Escasa	Granulaciones de color rojo al azar Ninguna N. D.
Leiomioma retroperitoneal	185 ±11 58 ±7	Fusiforme	Ovoide redondo 38 ±2 Rojo púr-pura Fina 1 - 5	Escaso Azul intenso No presenta Regular Ninguna Ninguna	Ninguna	Agrupaciones celulares como islas
Schwannoma maligno	316 ±23 185 ±22	Irregular poligonal	Ovoide irregular cariorrético 41 ±4 Rojo púr-pura Granulada 2	Abundante Violeta No presenta Escasa Ninguna Ninguna	Ninguna	N. D.
Histiocitoma fibroso maligno (HBV-60)	309 ±20 162 ±12	Irregular	Ovoide 43 ±2 Rojo púr-pura Reticular 2 - 3	Abundante Violeta intenso Baja densidad de pequeñas vacuolaciones	No se observa.	Moderada cantidad de granulaciones rojas Fibras extracelulares granuladas Agrupaciones celulares como islas
Linfoma linfoblástico (LPE-24)	170 ±14 37 ±6	Fusiforme	Ovoide 23 ±2 Rosa claro Fina 2 - 4	Escaso Azuloso Baja densidad de pequeñas vacuolaciones	No se observa.	Ninguna Ninguna Crecimiento en multicapas
Ganglio tuberculoso (GTG-3)	268 ±18 70 ±12	Triangular fusiforme irregular	Ovoide redondo 41 ±6 Rojo Fina 1 - 4	Abundante Azul claro Azul intenso alta densidad de pequeñas vacuolaciones	No se observa.	Gran cantidad de granulaciones rojas al azar. En conflencia existe capa velamentosa Agrupaciones celulares como islas.
Fibroblastos normales de piel (WC-2)	203 ±15 27 ±3	Fusiforme	Ovoide 25 ±1 Rojo Granulada 1 - 6	Escaso Azul No presenta Regular Escasa cantidad de granulaciones rojas	Escasa cantidad de fibras	Inhibición por contacto.

(*) Media ± Error estandar.



Fig. 2.- Osteosarcoma OSX-1 (100X).



Fig. 3.- Osteosarcoma OSX-2 (100X).

Fig. 2 y 3.- Cultivos saturantes donde se puede observar conglomeraciones celulares sobrepuestas en varias capas (C), así como la existencia de superficies carinas de células (V).

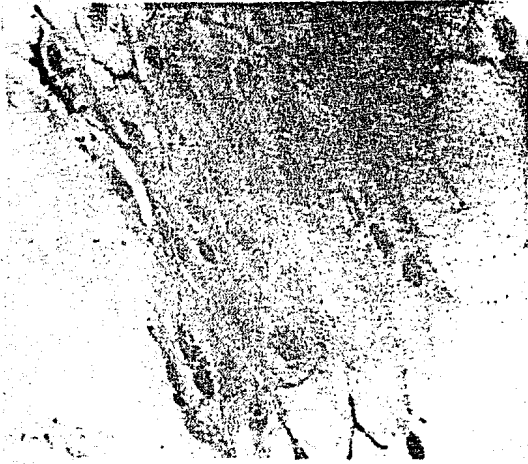


Fig. 4.- Liposarcoma LNG-83. Cultivo saturante en monocapa con carencia de espacios sin células (125X).



Fig. 5.- Liposarcoma LPP-59. Cultivo saturante donde se puede observar conglomeraciones celulares sobre puestas en varias capas (C), así como la existencia de superficies carentes de células (V) (60X).

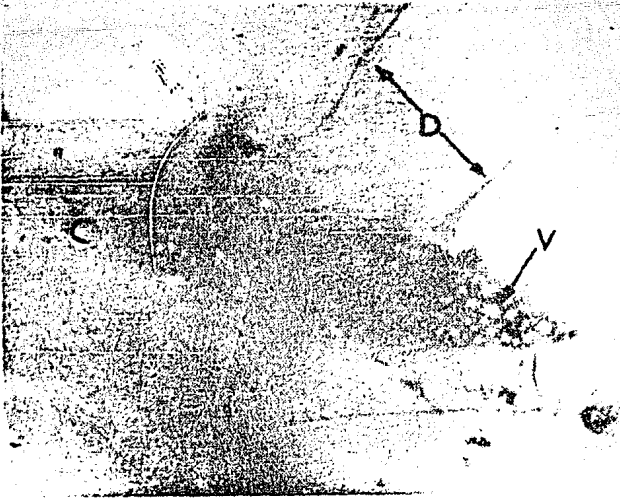


Fig. 6.- Condrosarcoma. Célula de forma estrellada con prolongaciones dendríticas (D) y citoplasma abundante (C) donde se observan grandes vacuolas (V) (500X).

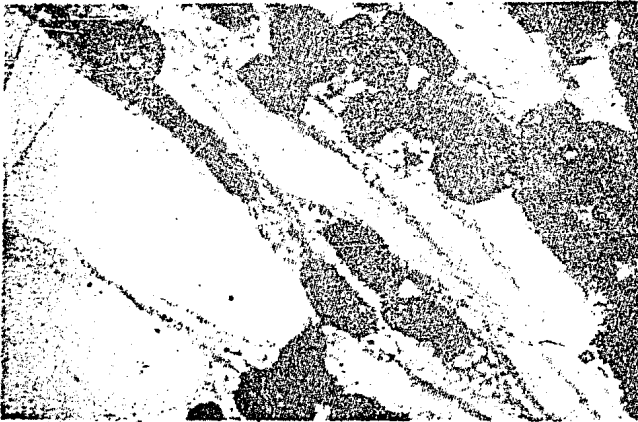


Fig. 7.- Leiomiomasarcoma. Células fusiformes multinucleadas con escaso citoplasma, en donde se pueden observar pequeñas vacuolaciones (500X).

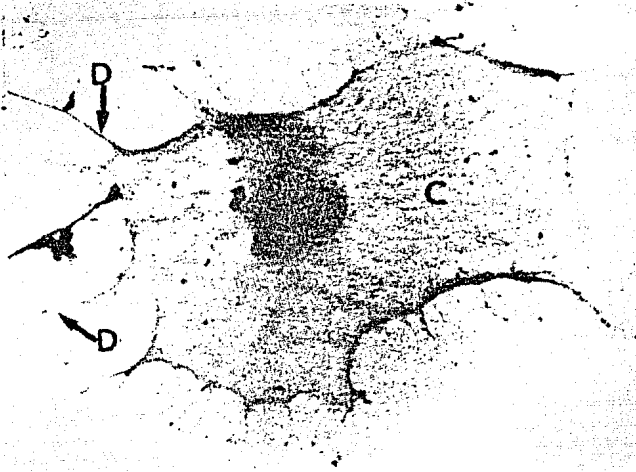


Fig. 8.- Schwannoma maligno. Célula de forma irregular con prolongaciones dendríticas (D), donde se puede apreciar un citoplasma abunante (C) y núcleo irregular (500X).

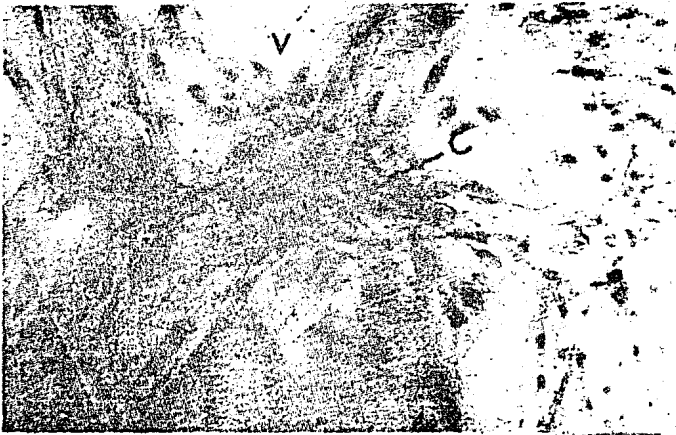


Fig. 9.- Histiocitoma fibroso maligno HBV-60. Cultivo saturante donde se puede observar conglomeraciones celulares sobrepuestas en varias capas (C), así como la existencia de superficies carentes de células (V) (60X).



Fig. 10.- Fibroblastos reactivos de Linfoma linfoblástico LPE-24. Cultivo de células confluentes, donde se observa un cierto grado de orientación y células sobrepuestas que indican el nacimiento de la segunda capa celular (100X).

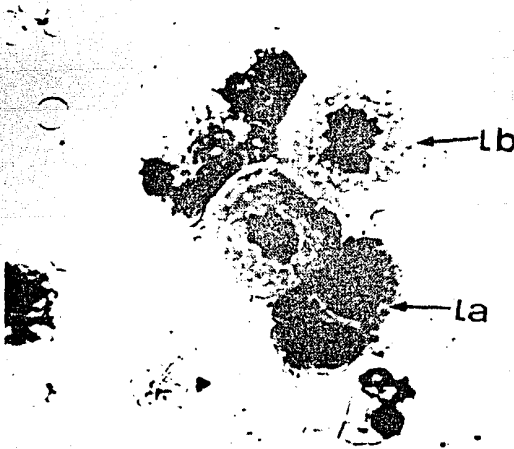


Fig. 11.- Linfoblastos de Linfoma linfoblástico. Cultivo en suspensión, donde se puede apreciar un conglomerado celular con linfoblastos en reproducción (Lb) y linfocitos activados (La) (400X).

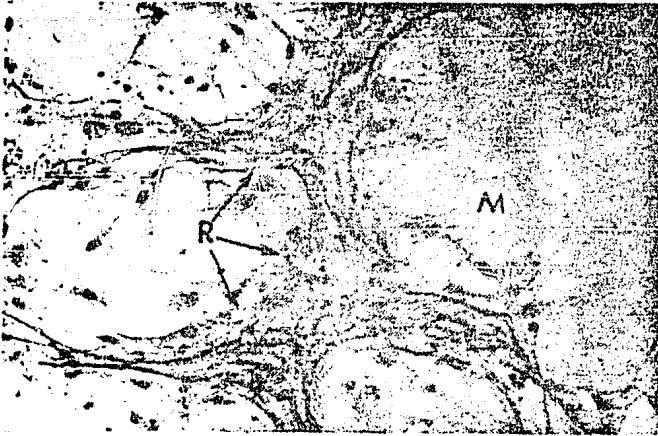


Fig. 12.- Ganglio tuberculoso GTG-3. Cultivo saturante donde se puede observar conglomeraciones celulares sobrepuestas en varias capas e interconectadas entre sí, que dan la apariencia de entretrejado (R). Asimismo, se aprecia una monocapa celular entre los conglomerados (M) (60X).



Fig. 13.- Fibroblastos Normales VC-2. Cultivo saturante en monocapa con carencia de espacios sin células, donde se observan haces paralelos celulares con una orientación definida (125X).

B) Cinética de Proliferación Celular.

La determinación de las propiedades cinéticas (tiempo de doblaje, tiempo de latencia y densidad de saturación) (tabla 4), fué llevada a cabo en las líneas celulares provenientes de 5 sarcomas (OSX-1, OSX-2, HBV-60, LPF-59 y LNG-83) y en las líneas de fibroblastos normales de piel y reactivos de ganglio (VC-2 y LFE-24). - Todas estas líneas celulares han sido mantenidas en cultivo continuo durante más de 7 meses.

El comportamiento cinético de las distintas líneas celulares cultivadas fué diferente en todos los casos (gráfica 1).

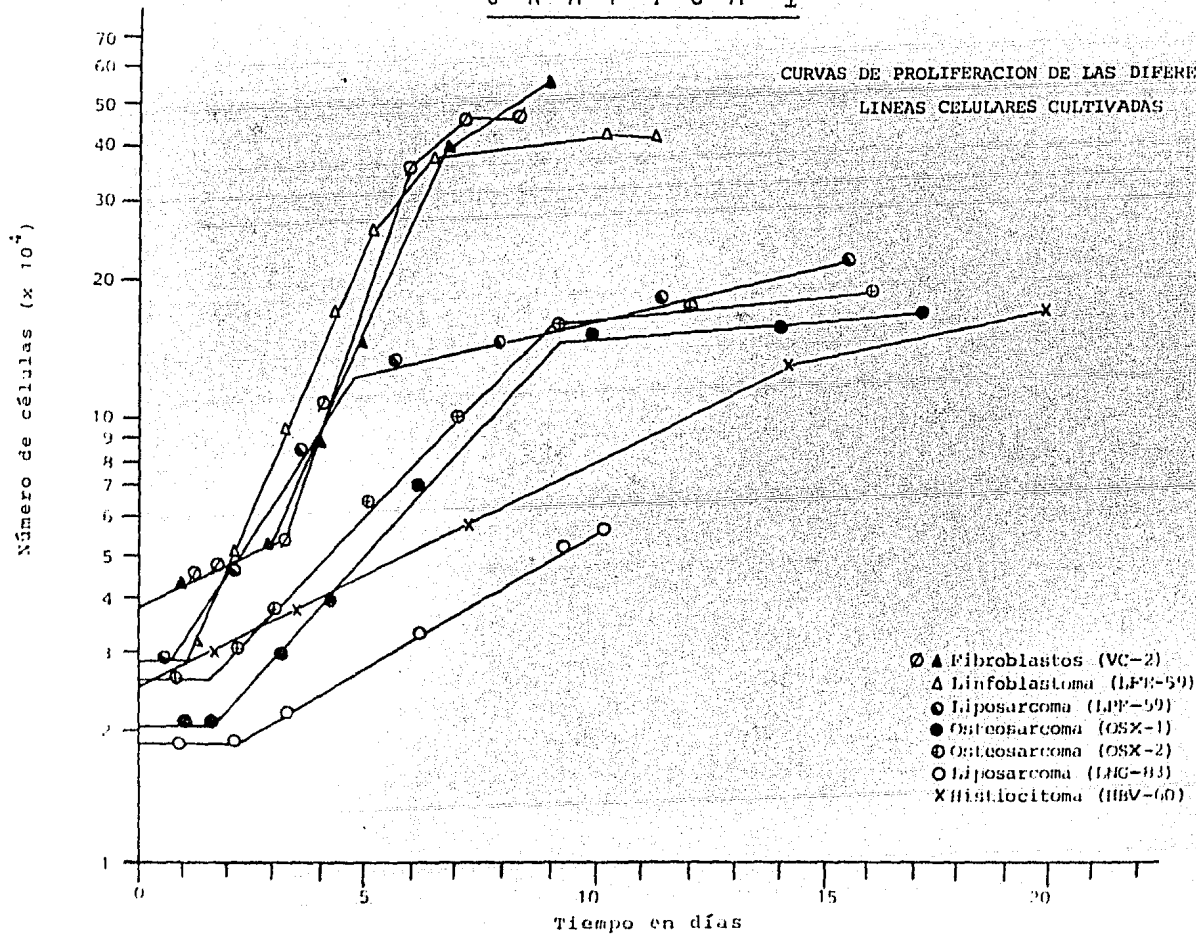
El tiempo de doblaje más largo perteneció a la línea HBV-60 con 156 hrs, seguido por la LNG-83 con 118 hrs, las líneas OSX-1 y OSX-2 con 64 y 72 hrs respectivamente, la LPF-59 con 42 hrs, hasta llegar a las líneas LFE-24 con 29 hrs y la VC-2 con un tiempo de doblaje que fué de 27 a 34 hrs. Cabe aclarar, que en este último caso se obtuvieron 2 curvas de proliferación y por lo tanto se toma un rango en el tiempo de doblaje (tabla 4). Por otro lado, para la línea LPF-59 se determinó el tiempo de doblaje que tuvo después de su fase de proliferación exponencial, siendo éste de 310 hrs.

El tiempo de latencia fué de 0 hrs para la línea HBV-60, seguida por la LPP-59 con 10 hrs, la LFE-24 con 21 hrs, las líneas OSX-1 y OSX-2 con 36 hrs ambas, la LNG-83 con 48 hrs y finalmente la VC-2 con 72 hrs (tabla 4).

La densidad de saturación más alta encontrada fué para la línea LFE-24 con $46,777 \text{ cel/cm}^2$, después la línea VC-2 con $44,698 \text{ cel/cm}^2$, la LPP-59 con $22,860 \text{ cel/cm}^2$, la HBV-60 con $18,191 \text{ cel/cm}^2$,

G R A F I C A 1

CURVAS DE PROLIFERACION DE LAS DIFERENTES
LINEAS CELULARES CULTIVADAS



T A B L A No. 4

CINETICA DE PROLIFERACION DE LAS LINEAS CELULARES OBTENIDAS

Líneas Celulares	Tiempo de latencia (hrs)	Tiempo de doblaje (hrs)	Densidad de saturación cel / cm ²
Fibroblastos (VC-2)	72	27 - 34	44,698
Linfoblastoma (LFE-24)	21	29	46,777
Liposarcoma (LPF-59)	10	42	22,860
Osteosarcoma (OSX-1)	36	64	14,553
Osteosarcoma (OSX-2)	36	72	16,632
Liposarcoma (LNG-83)	48	118	N.D.
Histiocitoma (HBV-60)	0	156	18,191

N.D. - No se determino.

la OSX-2 con 16,632 cel/cm², la OSX-1 con 14,553 cel/cm². En el caso de la línea LNG-83, no fué posible determinar su densidad máxima de saturación (tabla 4).

C) Crecimiento de Colonias en Agar.

Este ensayo se llevó a cabo con las líneas celulares OSX-1, - OSX-2, LPF-59, LNG-83, HBV-60, LFE-24 y VC-2. El resultado obtenido fué negativo para todas estas líneas, puesto que después de 15 días de cultivo en agar, no se observó formación de colonias en ninguno de los casos, aún cuando las células se encontraban bien conservadas (esféricas y birrefringentes al microscopio invertido) después de este lapso de tiempo.

D) Características Bioquímicas.

1.- Producción de colágena por las diferentes líneas celulares:

La determinación del contenido de colágena fué realizada en las líneas celulares OSX-1, OSX-2, LPF-59, HBV-60, LFE-24 y VC-2. Esta determinación se llevó a cabo en todos los casos, tanto en medio nutritivo como en la capa celular, obteniéndose de esta manera la producción de colágena por célula por día.

La más alta producción de colágena fué encontrada en la línea celular OSX-1, en donde se obtuvieron valores de 0.01 mg en la capa celular y 5.5 mg en el medio nutritivo a partir de 2.19×10^6 células, para dar una producción total de 830 pg de colágena/cel-día. A continuación en orden decreciente se encontró la línea celular LPF-59, en donde se obtuvieron valores de 0.01 mg en la capa -

celular y 7.08 mg en el medio nutritivo a partir de 3.89×10^6 células, para dar una producción total de 606 pg de colágena/cel-día. En la línea celular OSX-2, se obtuvieron valores de 0.41 mg en la capa celular y 1.06 mg en el medio nutritivo a partir de 2.63×10^6 células, para dar una producción total de 190 pg de colágena/cel-día. En la línea celular HBV-60, se obtuvieron valores de 0.38 mg en la capa celular y 0.41 mg en el medio nutritivo a partir de 1.93×10^6 células, para dar una producción total de 136 pg de colágena/cel-día. En la línea celular VC-2, se obtuvieron 0.14 mg en la capa celular y 2.11 mg en el medio nutritivo a partir de 5.86×10^6 células, para dar una producción total de 120 pg de colágena/cel-día. Por último, se encontró que la menor producción de colágena se dió en la línea celular LFE-24, en donde se obtuvieron valores de 0.19 mg en la capa celular y 0.46 mg en el medio nutritivo a partir de 8.91×10^6 células, para dar una producción total de 25 pg de colágena/cel-día (tabla 5).

2.- Determinación de lisozima:

La determinación de la secreción de lisozima en los medios nutritivos provenientes de las líneas celulares HBV-60, LFE-24 y VC-2 que fué realizada por el método turbidimétrico con Micrococcus lysodeicticus, resultó negativa en todos los casos.

3.- Tinciones histoquímicas:

- Fosfatasa ácida.- La determinación de fosfatasa ácida y fosfatasa ácida tartrato resistente, se hizo por medio de tinción histoquímica con las líneas celulares OSX-1, OSX-2, HBV-60, LFE-59, LNG-83, LFE-24 y VC-2.

La mayor actividad enzimática fué observada en las células -- provenientes de las líneas OSX-2, HBV-60 y LNG-83, ya que en éstas fué alta para ambos tipos de enzima. Enseguida, se registró una actividad media en las células de las líneas OSX-1 y LPP-59. Finalmente, en las líneas celulares LFE-24 y VC-2, se registró una actividad baja para fosfatasa ácida, presentándose en el caso de la -- fosfatasa ácida tartrato resistente una actividad media para la -- LFE-24 y alta para VC-2 (tabla 6).

- Fosfatasa alcalina.- La determinación de fosfatasa alcalina por medio de tinción histoquímica se realizó para las líneas celulares OSX-1, OSX-2, HBV-60, LNG-83, LPP-59, LFE-24 y VC-2. La línea celular OSX-2, dió una actividad alta de esta enzima, siendo la mayor observada en este experimento, de la misma manera, se registró una actividad media en las células de OSX-1, LPP-59 y LNG--83. Finalmente, las células de las líneas HBV-60, LFE-24 y VC-2, no exhibieron actividad enzimática alguna (tabla 6).

- Determinación de peroxidasa.- La determinación de peroxidasa por medio de tinción histoquímica, fué realizada para las líneas celulares HBV-60, LFE-24 y VC-2, resultando negativa en los 3 casos (tabla 6).

- Determinación de lípidos.- Este ensayo se realizó para las líneas celulares LPP-59, LNG-83, LFE-24 y VC-2, mediante la técnica de Oil Red O, encontrándose resultados negativos en todos los casos (tabla 6).

T A B L A No. 5

PRODUCCION DE COLAGENA POR LAS DIFERENTES LINEAS CELULARES.

TIPO CELULAR	Número de Células cultivadas (x 10 ⁶)	Cantidad de colágena en la capa celular (mg)	Cantidad de colágena en el medio (mg)	Cantidad total de colágena (mg)	Producción de colágena pg /cel-día
Osteosarcoma OSX-1	2.19	0.01	5.50	5.51	830
Liposarcoma LPP-59	3.84	0.01	7.08	7.09	606
Osteosarcoma OSX-2	2.63	0.45	1.06	1.51	190
Histiocitoma HBV-60	1.93	0.38	0.41	0.78	136
Fibroblastos VC-2	5.86	0.14	2.11	2.25	120
Linfoblastoma LFE-24	8.91	0.19	0.46	0.65	25

T A B L A No. 6

TINCIONES HISTOQUIMICAS

TIPO CELULAR	Fosfatasa ácida		Fosfatasa	Lípidos	Peroxidasa
	Normal	Tartrato resistente	alcalina		
Osteosarcoma (OSX-1)	++	++	++	N. D.	N. D.
Osteosarcoma (OSX-2)	+++	+++	+++	N. D.	N. D.
Liposarcoma (LPF-59)	++	++	++	---	N. D.
Liposarcoma (LNG-83)	+++	+++	++	---	N. D.
Histiocitoma (HBV-60)	+++	+++	---	N. D.	---
Fibroblastos normales (VC-2)	+	+++	---	---	---
Linfoblastoma (LFE-24)	+	++	---	---	N. D.

N.D. - No se determinó. (---) Negativo, (+) Bajo, (++) Medio (+++) Alto.

E) Características Inmunológicas.

Las características inmunológicas determinadas fueron la presencia de receptores para Fc, presencia de receptores para C3b y actividad fagocítica. Estas pruebas fueron realizadas en las líneas celulares HBV-60, LFE-24 y VC-2, en donde se encontraron resultados negativos en los 3 casos.

F) Interacción de Leucocitos de Sangre Periférica con las Diferentes Líneas Celulares.

El cocultivo de leucocitos de sangre periférica de personas adultas normales con las líneas celulares OSX-1, OSX-2, LPF-59, HBV-60, LNG-83, LFE-24 y VC-2, se llevó a cabo en 5 experimentos, utilizando para ello 5 donadores distintos y usando siempre cuando menos 2 líneas de sarcomas y una de fibroblastos.

En ninguno de los casos se observó interacción de los 2 tipos celulares en las 2 primeras horas de incubación, tanto en ausencia como en presencia de suero fetal de bovino. Esta interacción fué detectada a partir de las 24 hrs de incubación en todas las líneas celulares pero en diferentes grados (tabla 7).

En las líneas celulares, el grado de interacción varió desde muy bajo en las líneas LFE-24 y LPF-59, hasta muy alto en el caso de las líneas HBV-60 y LNG-83 (tabla 7, fig. 14).

La interacción que se estableció entre las células adherentes y los leucocitos fué a nivel de membrana, con predominio entre los leucocitos del tipo linfocítico sobre el monocítico (fig. 15). Se consideró como una interacción débil cuando se encontra--

ron hasta 3 leucocitos adheridos a las células blanco, una interacción fuerte cuando eran de 4 a 15 y como una interacción muy -- fuerte con más de 15, llegándose a observar hasta 70 leucocitos.

Cuando la interacción era débil, los leucocitos presentaron una unión membranal reducida y una morfología de tipo normal. --- Cuando la interacción era fuerte, se presentó unión más intensa -- entre las membranas, teniendo los linfocitos una configuración -- tal, que se observaba un citoplasma abundante, llegándose en ocasiones a distinguir los nucleolos (fig. 15).

Para determinar si esta interacción celular producía activadores celulares (linfocinas), capaces de blastogenizar a los linfocitos de sangre periférica, se cultivaron 3 líneas celulares -- (HBV-60, OSX-1 y VC-2), en presencia de éstos durante 10 días.

A partir del quinto día de cultivo, las células de tipo linfocítico que permanecían en suspensión presentaron un claro cambio morfológico semejante al presentado por los linfoblastos y las células plasmáticas. Estos consistieron en un aumento del volumen -- citoplasmático, acompañado de vacuolaciones, así como la presencia de una zona periférica azurofílica y una zona perinuclear que recuerda el aparato de Golgi. El núcleo se observó con la cromatina altamente condensada, presentando inclusive 1 o 2 nucleolos y adoptó una posición excéntrica en la célula (fig. 16 y 17). En -- ocasiones se observaron células en mitosis (fig. 18), y se presentaron también agrupaciones celulares que recuerdan las islas inmunológicas (fig. 19 y 20).

T A B L A No. 7

INTERACCION DE LEUCOCITOS DE SANGRE PERIFERICA HUMANA CON LAS DIFERENTES LINEAS CELULARES

LINEAS CELULARES	Interacción débil con leucocitos %	Interacción fuerte con leucocitos %	Interacción muy fuerte con leucocitos %
Fib. Normales (VC-2)	17	1	0
Exp. 1 Linfoblastoma (LFE-24)	11	0	0
Histiocitoma (HBV-60)	42	27	4
Fib. Normales (VC-2)	12	0	0
Exp. 2 Histiocitoma (HBV-60)	16	48	14
Osteosarcoma (OSX-1)	23	9	0
Linfoblastoma (LFE-24)	17	0	0
Liposarcoma (LPP-59)	31	5	0
Exp. 3 Liposarcoma (LNG-83)	33	18	0
Osteosarcoma (OSX-1)	34	10	1
Osteosarcoma (OSX-2)	27	9	0
Linfoblastoma (LFE-24)	15	0	0
Exp. 4 Liposarcoma (LPP-59)	16	3	0
Liposarcoma (LNG-83)	25	4	0
Linfoblastoma (LFE-24)	24	2	0
Exp. 5 Liposarcoma (LPP-59)	31	6	1
Liposarcoma (LNG-83)	26	14	1

Nota: Todos los datos fueron tomados a las 24 hrs de cocultivo. El experimento 2 se dejó cocultivando hasta los 10 días, notándose que no variaban los porcentajes de interacción de los leucocitos con las células adherentes.

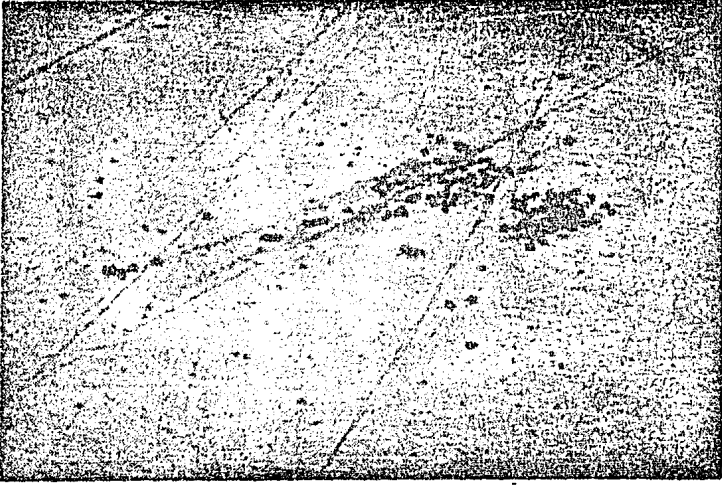


Fig. 14.- Células de histiocitoma interactuando muy fuertemente con un gran número de leucocitos de sangre periférica (100X).

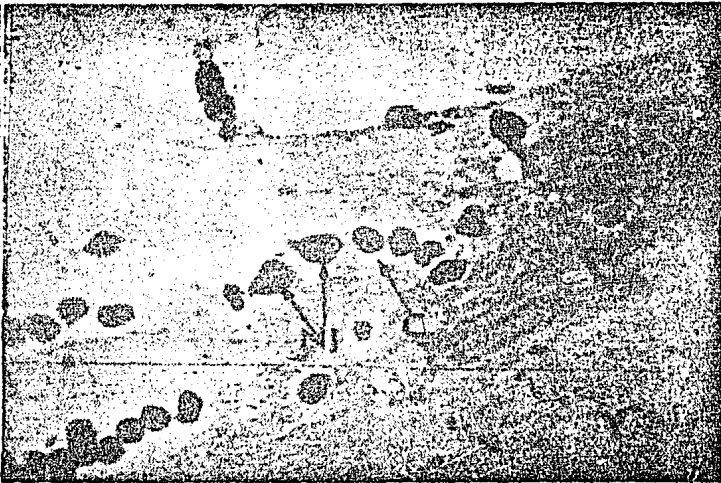


Fig. 15.- Una célula de histiocitoma interactuando fuertemente con leucocitos de sangre periférica. Se observa la presencia de linfocitos y monocitos, así como - en algunos casos, de sus nucleolos (N1) y citoplasma (C) (400X).

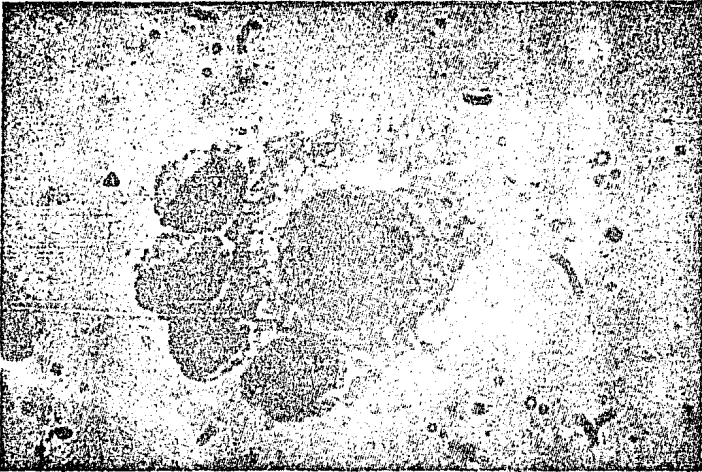


Fig. 16.- Linfocitos de sangre periférica. La célula más grande muestra una morfología típica de célula plasmática (1000X).

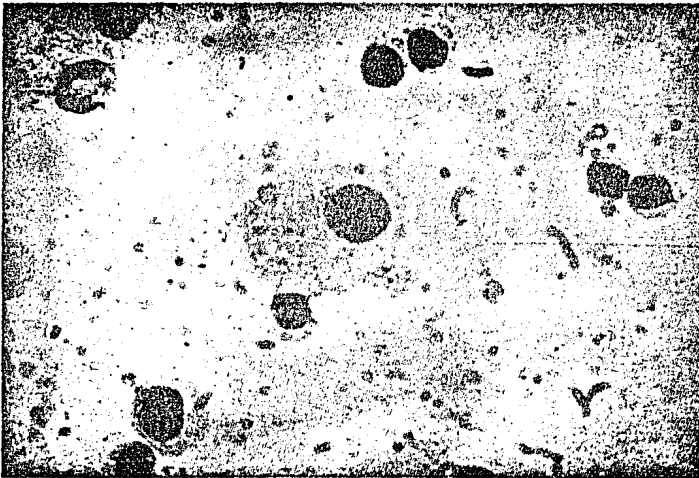


Fig. 17.- Linfocitos de sangre periférica mostrando diferentes grados de diferenciación hacia células plasmáticas (400X).



Fig. 18.- Linfocitos de sangre periférica mostrando una célula en mitosis (1000X).

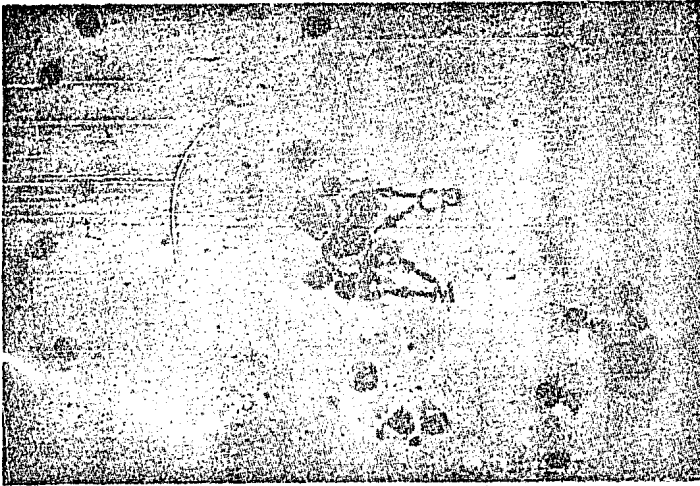


Fig. 19

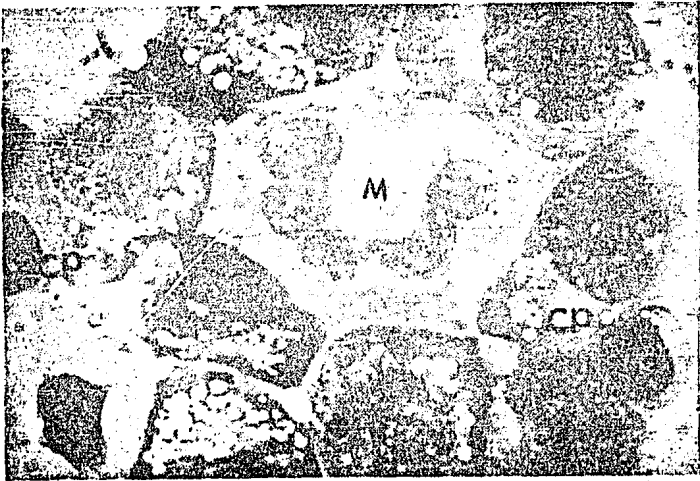


Fig. 20

Fig. 19 y 20.- Leucocitos de sangre periférica mostrando agrupaciones celulares de monocitos (M) y linfocitos, semejantes a las llamadas islas inmunológicas. - Asimismo, se distinguen los diferentes estadios de la diferenciación de los linfocitos hacia células plasmáticas (Cp). (400X y 1000X).

G) Número Cromosómico.

La determinación del número cromosómico fué realizada en las líneas celulares VC-2, LFE-24, OSX-1, OSX-2, LPF-59 y LNG-83, por medio de su tratamiento con colchicina en un lapso de tiempo que dependía de su velocidad de proliferación celular. En el caso de la línea HBV-60, no fué posible la obtención del número cromosómico, ya que su tiempo de doblaje tan largo impedía el tener una -- cantidad suficiente de mitósis en estado de metafase.

La línea celular VC-2, expuesta durante 6 hrs al tratamiento con colchicina presentó una variación en el número cromosómico de 40 a 48, con un número modal de 46, siendo ésto muy claro ya que se encontró en 32 de las 50 mitosis contadas (tabla 8, fig. 21).

La línea celular LFE-24, expuesta durante 6 hrs al tratamiento con colchicina, presentó una variación en el número cromosómico de 14 a 64, con un número modal de 46, siendo ésto también muy evidente, ya que se encontró en 25 de las 50 mitosis contadas (tabla 8, fig. 22).

La línea celular OSX-1, expuesta durante 12 hrs al tratamiento con colchicina, presentó una variación en el número cromosómico de 41 a 48, de un total de 30 mitosis contadas. El número modal no pudo ser determinado, pues no existió un número cromosómico lo suficientemente constante, ya que los conteos más frecuentes fueron de 9 para 45 cromosomas y de 8 para 42 cromosomas. Señalar que en algunas ocasiones se lograron observar mitosis que presentaban cromosomas completamente pulverizados (tabla 8, fig. 23).

La línea celular OSX-2, expuesta durante 8 hrs al tratamiento con colchicina, presentó variaciones en el número cromosómico de 18 a 54, de un total de 50 mitosis contadas. El número modal no pudo ser determinado pues no existió un número cromosomal lo suficientemente constante, ya que se presentó una gran variabilidad de éstos. Sin embargo, es notable el hecho de que 37 del total de los conteos se concentraron en el rango de 39 a 46 cromosomas, presentándose éste último en 14 conteos. Cabe aclarar que en algunas ocasiones se lograron observar mitosis que presentaban cromosomas completamente pulverizados (tabla 8, fig. 24).

La línea celular LPF-59, expuesta durante 6 hrs al tratamiento con colchicina, presentó una variación en el número cromosómico de 16 a 47, de un total de 50 mitosis contadas. El número modal no pudo ser determinado pues no existió un número cromosomal lo suficientemente constante, ya que los conteos más frecuentes fueron de 10 para 46 cromosomas y de 11 para 44 cromosomas. Sin embargo, se encontró una alta frecuencia en el número de conteos en el rango de 40 a 46 cromosomas, ya que aquí se encontraron 36 del total de los conteos. Cabe señalar que en algunas ocasiones se lograron observar mitosis que presentaban cromosomas completamente pulverizados (tabla 8, fig. 25).

La línea celular LNG-83, fué expuesta únicamente durante 3 hrs al tratamiento con colchicina, debido a que en los primeros subcultivos su proliferación era más rápida que en la curva de crecimiento presentada, ya que cuando se realizó ésta, su velocidad de proliferación fué de acuerdo a su adaptación in vitro. La

variación en el número cromosómico fué de 39 a 46, de un total de 30 mitosis contadas. El número modal no pudo ser determinando, --- pues no existió un número cromosomal lo suficientemente constan-- te, ya que los conteos más frecuentes fueron de 6 para 44 cromosomas y de 8 para 46 cromosomas. Cabe señalar que en algunas ocasiones se lograron observar mitosis que presentaban cromosomas com-- pletamente pulverizados (tabla 8, fig. 26).

T A B L A No. 8

NUMERO CROMOSOMICO DE LAS DIFERENTES LINEAS CELULARES

NUMERO DE CROMOSOMAS	14	16	18	24	25	27	28	29	30	32	34	35	36	37	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	54	64	TIEMPO DE TRATAMIENTO (hrs)	NUMERO DE MITOSIS - CONTADAS
FIBROBLASTOS (VC-2)															2			1	2	8	32	2	3					6	50
LINFOMASTOMA (LFE-74)	1				1	1				2					1	1	3	1	2	1	25	7		2	1	1		6	50
OSTEOSARCOMA (OSX-1)																2	8	2	4	9	5		2					12	12
OSTEOSARCOMA (OSX-2)		1		1		3		1	1	1	1			1	1	3	5	2	5	3	4	1	14	1		1		8	50
LIPOSARCOMA (LPE-59)	1		1		1	1		2				1	1	1	2	1	4		6	3	10	3	11	1				6	50
LIPOSARCOMA (LNG-84)															4	2	3	1	1	6	4	8	1					3	30

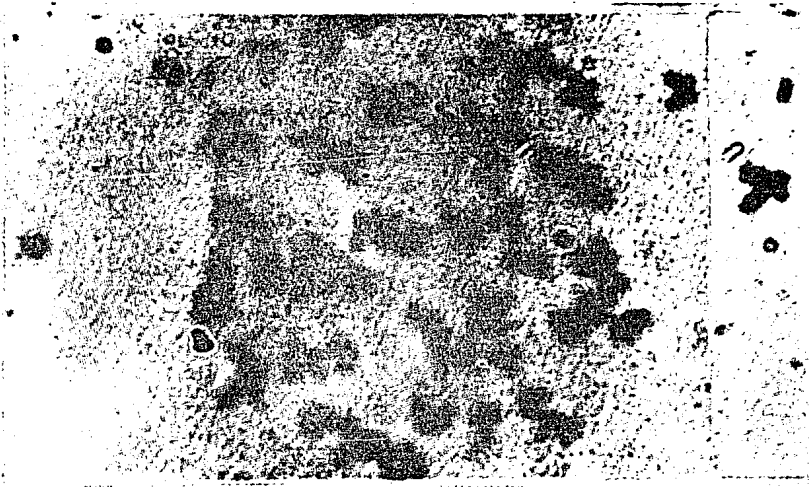


Fig. 21.- Metafase de la línea VC-2 (1000X).



Fig. 22.- Metafase de la línea LPE-24 (1000X).

Fig. 21 y 22.- Metafases normales donde se presentan 46 cromosomas.



Fig. 23.- Metafase de la línea celular OSX-1, donde se pueden observar 44 cromosomas y posibles pulverizaciones (P) (1000X).

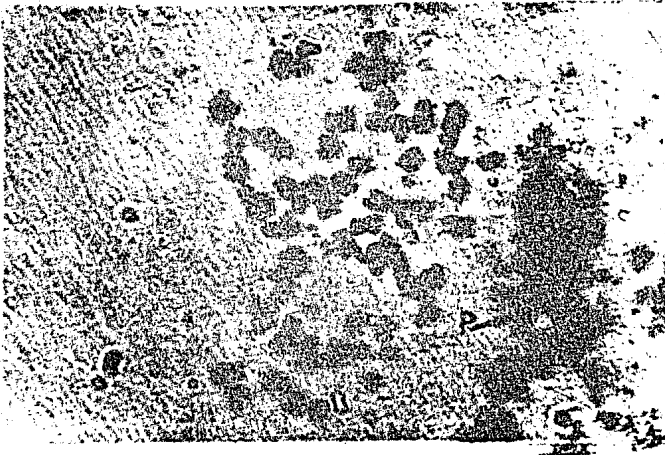


Fig. 24.- Metafase de la línea celular OSX-2, donde se pueden observar 46 cromosomas y posibles pulverizaciones; (P) (1000X).



Fig. 25.- Metafase de la línea celular LPF-59, donde se pueden observar 41 cromosomas (1000X).

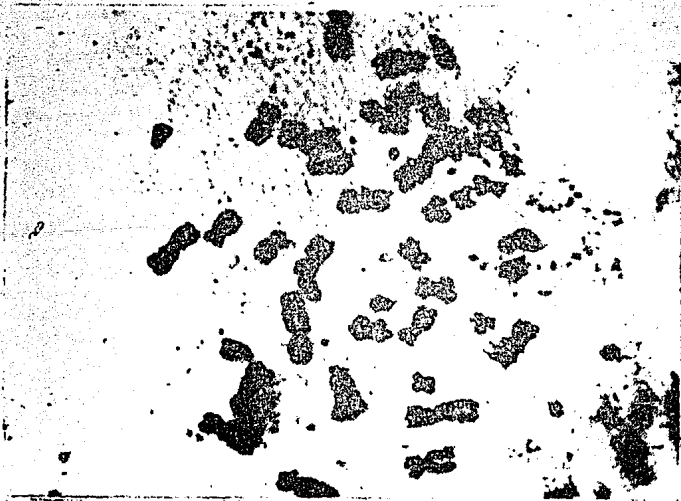


Fig. 26.- Metafase de la línea celular LNG-83, donde se pueden observar 43 cromosomas (1000X).

D I S C U S I O N

Un total de 12 biopsias fueron puestas en cultivo, dentro de un lapso de tiempo que no fué más allá de las 24 hrs desde su extracción hasta el momento de su siembra. Consideramos que este -- lapso de tiempo transcurrido, no afectó directamente la eficien-- cia en la proliferación de las células adherentes a partir de las biopsias, ya que como ha sido encontrado previamente, la eficien-- cia de la proliferación celular en el cultivo de tumores no es -- afectada si la biopsia es sembrada antes de las 36 hrs de su ex-- tracción (29).

En nuestros experimentos, en 7 de los 8 casos de los sarco-- mas, las células aparecieron en el sustrato de cultivo en un ran-- go de tiempo que varió de 2 a 12 días a partir del inicio del cul-- tivo, la excepción se obtuvo en el histiocitoma fibroso maligno, donde las células tardaron 30 días en migrar hacia el sustrato de cultivo, lo cual pudo ser debido a la lenta prodliferación que presen-- tan las células de este tipo de sarcomas in vivo (86). En lo que respecta al porcentaje de eficiencia de proliferación de los cul-- tivos procedentes de estas biopsias, se obtuvo igualmente una ex-- cepción al comportamiento general de más del 50%, éste caso fué - el condrosarcoma, en donde se observó que solo el 36% de los cul-- tivos presentaron proliferación celular, pudiéndose atribuir és-- to, a la gran cantidad de estroma que exhibe normalmente este ti-- po de tumor (39) y en consecuencia una baja densidad celular, lo que a nuestro juicio disminuiría notablemente el contacto directo de las células (en la superficie de la biopsia) con el medio am--

biente externo y por lo tanto existiría menor probabilidad de que las células proliferaran fuera del tejido. Por otro lado, los fibroblastos reactivos procedentes del linfoma linfoblástico y del ganglio tuberculoso, tardaron en migrar del tejido al sustrato -- de cultivo 30 y 13 días respectivamente, así como tuvieron un porcentaje de eficiencia de cultivo de 37 y 38%. Como fué descrito -- en nuestros resultados, al cultivar la biopsia de un paciente con linfoma linfoblástico, tuvimos además de una proliferación de células en suspensión, de tipo linfocítico, una proliferación de células adherentes de tipo fibroblástico. En consecuencia consideramos que si las células en suspensión representan a la población -- maligna, las células adherentes serían fibroblastos que proliferarían rápidamente debido a una respuesta de tipo reactivo. Por tanto, el establecimiento de una línea celular de este tipo nos permitirá el poder hacer comparaciones con fibroblastos malignos provenientes de sarcomas.

Estos resultados nos indican que las células procedentes de sarcomas a excepción del condrosarcoma, que tuvo una densidad celular muy baja, presentaron una gran adaptabilidad a nuestras condiciones de cultivo, en comparación con las células de tipo reactivo. Aunque posteriormente se discutirán datos más específicos sobre la malignidad de los cultivos procedentes de estos sarcomas, creemos que esta gran adaptabilidad puede ser indicio de ella, si consideramos que una célula maligna ha llegado a independizarse -- de los factores reguladores externos para su proliferación.

Dentro de la morfología que presentan las células en culti--

vo, tenemos que los fibroblastos normales provenientes de piel humana y los fibroblastos reactivos (del linfoma linfoblástico) exhibieron características similares, como son, su pequeño tamaño celular y su forma alargada o fusiforme con escaso citoplasma. Estas características morfológicas concuerdan con las observaciones realizadas para fibroblastos de origen humano (40). Siendo que existe un gran problema para diferenciar morfológicamente en cultivo in vitro entre fibroblastos normales y células malignas de origen mesenquimatoso, a todo lo largo de este trabajo se realizaron cultivos paralelos con fibroblastos normales para tener un punto de comparación de las propiedades evaluadas. Por otro lado, las células procedentes de ganglio tuberculoso, difirieron morfológicamente de los fibroblastos de piel y del linfoma linfoblástico, ya que presentaron un mayor tamaño celular, así como polimorfismo y características citoplasmáticas que nos hacen pensar en una mayor actividad sintética.

Estas características típicas de células reticulares (22), nos sugieren que las células obtenidas a partir del tejido de ganglio tuberculoso pueden ser de este tipo.

En 7 de los 8 casos de sarcomas, estas células presentaron un mayor tamaño que las de tipo fibroblástico, así como una forma diferente, ya que mostraron pleomorfismo celular en los que se incluía principalmente formas triangulares, estrelladas e irregulares. Sólo en el caso de las células provenientes de leiomiোসарcoma, se observaron células de tipo fusiforme, que semejaban más bien a células de músculo liso. En cuanto a las características citoplasmáticas, se observaron diferencias entre las mismas células neoplásicas

sicas, ya que en las células provenientes de los osteosarcomas -- (OSX-1 y OSX-2), condrosarcoma, liposarcoma (LNG-83), Schwannoma, histiocitoma y leiomiosarcoma, el citoplasma presentó una gran actividad sintética, posiblemente debida a una mayor producción de sustancias específicas de las células de origen. Lo anterior nos induce a pensar que estas células se encontraban más diferenciadas que las obtenidas a partir de los otros sarcomas.

Por otra parte, en algunos casos las células presentaron núcleos con características indicadoras de alteraciones de tipo neoplásico, como fué la picnosis en las células provenientes de osteosarcoma, Schwannoma, histiocitoma y leiomiosarcoma; cariorrexis -- en las células provenientes de liposarcoma y Schwannoma y en el caso de leiomiosarcoma la presencia de 2 a 5 núcleos en la mayoría de las células.

En base a lo anterior podemos deducir, que desde un punto de vista morfológico, las células provenientes de las biopsias de -- sarcomas a parte de diferir grandemente de las células normales, exhibieron características típicas de alteraciones neoplásicas.

Un criterio aceptado para establecer si las células de tipo fibroblástico mantenidas en cultivo in vitro son de origen maligno, es mediante la pérdida de inhibición por contacto. La línea celular de fibroblastos de piel mantenida en nuestro laboratorio, presentó como era de esperarse, este tipo de inhibición. Sin embargo, las células fibroblásticas provenientes tanto del linfoma linfoblástico como del ganglio tuberculoso perdieron esta propiedad, ya que las primeras proliferaron formando capas múltiples y

las segundas en agrupaciones de células sobrepuestas aún sin haber confluencia, lo cual fué similar al patrón de proliferación que -- presentaron la mayoría de los sarcomas. Por otro lado, tuvimos el caso de un liposarcoma (LNG-83), cuya proliferación era estrictamente en monocapa. En consecuencia, consideramos que nuestros resultados indican, que la inhibición por contacto no es una propiedad exclusiva de las células normales y de la misma manera, la pérdida de esta inhibición no es una propiedad distintiva de las células tumorales. Siendo que los diferentes cultivos efectuados con fibroblastos normales manifestaron tanto los patrones de proliferación de monocapa, de multicapa y de agrupaciones, suponemos que el tipo de proliferación in vitro dependerá del sitio de procedencia de las células y no de su malignidad. Por otro lado, se llegó a detectar que en todos los cultivos en donde intervenían células no malignas, se llega a una inhibición por densidad. Este fenómeno -- consistió en una inhibición en la proliferación celular una vez -- que el cultivo llegaba a una cierta densidad. En contraste, las líneas provenientes de los sarcomas humanos no presentaron in vitro esta inhibición por densidad, ya que el número de células continuaba aumentando, aunque más lentamente, después de haber pasado la etapa de proliferación exponencial. Para determinar si este patrón de proliferación lenta ovedecía a un tipo de cinética específico, se evaluó para la línea LPP-59 y se encontró que éste era exponencial con un tiempo de doblaje de 310 hrs, el cual es muy inferior al encontrado durante su proliferación inicial de 42 hrs. Sería -- conveniente el ampliar estos estudios utilizando un mayor número --

tanto de líneas malignas como no malignas, para determinar si esta segunda fase de crecimiento exponencial es exclusiva de células cancerosas y obtener de esta forma un nuevo criterio de malignidad in vitro. Tal y como era esperado las células de mayor tamaño, tuvieron una densidad de saturación menor como fué el caso para la OSX-1 con $14,553 \text{ cel/cm}^2$, mientras que las células más pequeñas tenían la mayor densidad de saturación de alrededor de $45,000 \text{ cel/cm}^2$ para los fibroblastos normales. Es interesante hacer notar que tanto la densidad de saturación como el tamaño celular de las líneas fibroblásticas LPE-24 y VC-2, sean semejantes a pesar de que la primera prolifera en multicapas, mientras que la segunda lo hace en monocapa. A nuestro criterio, ésto es posible sólo si el mismo número de células que al proliferar ocupan su lugar en la última capa y existiera un mismo número de células que mueren en las capas inferiores, o si en lugar de una proliferación existe un reacomodo de las células en monocapa para formar las capas superiores. A nuestro juicio la primera interpretación sería la correcta ya que durante la determinación de los conteos celulares, siempre se encontraba un número importante de restos celulares. Sin embargo, para aclarar esta situación sería conveniente el efectuar determinaciones de índice mitótico a lo largo de la formación de las diferentes capas. Por último, cabe mencionar que los 2 osteosarcomas (OSX-1 y OSX-2), presentaron también el mismo tipo de densidad celular, ésto aunado al hecho de que las 2 líneas de fibroblastos presentaron densidades semejantes, nos podría indicar que esta propiedad puede ser específica de cada tipo celular.

Ahora bien, en otros trabajos se ha encontrado que las líneas

de células malignas tienen por lo general una densidad de saturación mucho mayor que aquellas formadas por células no malignas -- (13, 85), este concepto antagoniza con los datos presentados en este trabajo. La mayoría de los trabajos en los cuales se obtienen densidades de saturación mayores para las células transformadas, por lo general éstas no son malignas, de lo cual surgiría el concepto de que existe algún mecanismo de transformación específico asociado a la malignidad. Sin embargo, existen algunos trabajos en los cuales las células malignas tuvieron una densidad mayor a la de fibroblastos de piel del mismo paciente (94). Es evidente que un estudio más detallado es necesario para aclarar este comportamiento que presentan las células malignas así como las de origen normal.

A partir de los datos obtenidos de las curvas de proliferación, encontramos que los tiempos de doblaje de las líneas fibroblásticas normales (LFE-24 y VC-2), fueron menores que los obtenidos para las líneas provenientes de sarcomas, lo cual corrobora la idea de que la proliferación normal no es necesariamente más lenta que la maligna.

Cuando se evaluó el tiempo de latencia de las diferentes líneas celulares, se encontró que para la línea HBV-60 éste fue nulo, lo cual como discutido anteriormente, nos indica el alto grado de independencia que presentan estas células a las condiciones de cultivo y por lo tanto su malignidad. Hay que hacer notar que éste último es apoyado por el estudio histopatológico en el cual se diagnosticó como un tumor altamente agresivo. En consecuencia,

proponemos que el cultivo in vitro de células procedentes de sarcomas, nos da una posibilidad de evaluación de malignidad a través del tiempo de latencia que presentan las células neoplásicas. Aunado a ésto, si tomamos en consideración que esta línea celular - (HBV-60) obtuvo el mayor tiempo de doblaje in vitro (156 hrs) y - que in vivo corresponde al tumor de evolución más lenta, nos da - una indicación de que estas células son de origen maligno, pues - aparte de la estrecha correlación del comportamiento tanto in vi-
tro como in vivo, existe también el alto porcentaje de eficiencia de cultivo discutido anteriormente.

Dentro de los sarcomas cultivados hubo 2 osteosarcomas y 2 liposarcomas. Las líneas de osteosarcoma presentaron propiedades cinéticas muy semejantes entre sí, mientras que las de liposarcoma diferían grandemente en este aspecto. Esto según lo discutiremos más adelante, nos ilustra la forma en que los cultivos celulares contribuyen a la determinación del grado de diferenciación obtenido por las células en diferentes tipos de sarcomas. Por lo -- que consideramos, que los 2 osteosarcomas presentaron un grado se mejante de diferenciación, lo cual se corrobora con los diagnósticos histopatológicos, mientras que para los liposarcomas, la línea LPP-59 era mucho más indiferenciada que la LNG-83, siendo ésto contrario, por lo menos en nuestras condiciones de cultivo, al diagnóstico histopatológico que señalaba un grado de diferenciación celular similar para las células provenientes de las 2 biopsias.

Una vez discutidas las propiedades morfológicas y de cinéti-

ca de proliferación, que confieren a nuestras líneas un comportamiento que se puede identificar como maligno, procederemos a continuación a discutir los resultados obtenidos para otras pruebas usadas normalmente en la identificación de malignidad como son la formación de colonias en agar, existencia de enzimas citoplasmáticas, producción anormal de colágena y número cromosómico.

Se sabe que los fibroblastos humanos cultivados in vitro no presentan formación de colonias en agar, a menos que se agregue un factor llamado factor de crecimiento de sarcomas (SGF, del inglés sarcoma growth factor) (45, 99), por el contrario algunos fibroblastos transformados, o células provenientes de ciertos crecimientos malignos presentan esta formación de colonias. Aunque la explicación que se da a este hecho no es clara, este fenómeno podría representar la adquisición de una nueva capacidad proliferativa de las células, dada ya sea por la transformación misma, o por la presencia del factor SGF. Siendo que ninguna de nuestras líneas formaron colonias en agar, aún en presencia de medio condicionado por ellas mismas, podemos pensar que el tipo de transformación asociado a los sarcomas, no confiere esta propiedad a las células. Sin embargo, hay que tomar en cuenta que en la literatura existen trabajos en los cuales un pequeño porcentaje de los sarcomas cultivados en agar, dieron lugar a la formación de colonias. Sería interesante estudiar el efecto que pudiese tener el factor SGF en la inducción a la formación de colonias en agar, para poder corroborar la función del mismo.

En caso de que pudiese inducirse a nuestras células a la for

nación de colonias en agar, nos permitiría la realización de clonados, lo cual nos proporcionaría la ventaja de poder trabajar -- con un sistema más homogéneo y de separar células dentro de una -- misma transformación maligna, con diferentes grados de diferencia ción.

La producción de colágena, como se pudo observar en los resultados, es mayor en las células tumorales que en las células de tipo fibroblástico, esto nos indica, que a pesar de que el proceso maligno conlleva a un estado de indiferenciación celular, estas células conservan una característica importante del tejido mesenquimal, como es la producción de colágena. Por otro lado, la menor producción de colágena encontrada en las células fibroblásticas, no es anormal en cultivo de tejidos, pues es conocido que los fibroblastos in vitro tienen una baja producción de esta proteína. Si se quiere ver aumentada la producción de colágena, es necesario la adición de ácido ascórbico, para que la síntesis de esta molécula se vea incrementada a niveles normales encontrados in vivo (68). Ahora bien, se observó que en todas las líneas celulares existe una mayor cantidad de colágena en el medio de cultivo que en la capa celular, lo cual es normal, ya que la mayor cantidad de colágena se encuentra diluida en el medio, en la forma de su precursor procolágena y solo una pequeña cantidad de ésta, se polimeriza y se precipita para formar la matriz extracelular (90).

La presencia de altos niveles de fosfatasa ácida detectada en las líneas celulares HBV-60, OSX-1, OSX-2, LPP-59 y LNG-83, y

no en los fibroblastos normales, nos indica una alteración en su expresión fenotípica ya que normalmente las células de tipo osteocítico y adipocítico no presentan una cantidad significativa de esta enzima y las de origen histiocítico la presentan en bajas cantidades. Por otro lado, en el caso de la determinación de fosfatasa ácida tartrato resistente, tanto las células provenientes de sarcomas como las fibroblásticas dieron una reacción positiva similar, por lo que no se puede decir que sea un parámetro indicador del origen o de alteración tumoral. Siendo que esta enzima no se encuentra normalmente en fibroblastos normales, podemos pensar que la existencia de ésta en nuestros cultivos, posiblemente es debida a las condiciones comunmente utilizadas para experimentos in vitro. Además, la producción de fosfatasa alcalina por parte de las células neoplásicas, se ha considerado como un indicador distintivo de alteraciones malignas, lo cual se corrobora al no detectarse actividad de esta enzima en fibroblastos normales y sí presentarse actividad, a excepción de la línea HBV-60, en el resto de las líneas de sarcomas.

Por último, además de las tinciones para fosfatasa ácida y alcalina, se llevó a cabo la determinación de lípidos en las líneas procedentes de los liposarcomas los cuales resultaron negativos, - confirmándose de esta manera el fenotipo alterado que presentan dichas células. Asimismo, a la línea HBV-60 se le hicieron pruebas - para demostrar la presencia de receptores para Fc y C3b, producción de peroxidasa, secreción de lisozima y fagocitosis. Ahora bien, la ausencia de estas características histiocíticas en la línea HBV-60 típicas de estas células, puede venir implicada directamente, como

en el caso de las líneas lipídicas, por alteraciones producidas en el desarrollo maligno, lo que provocaría una pérdida en la semejanza con las células a partir de las cuales se originan.

Dadas las características bioquímicas presentadas por las líneas celulares procedentes de sarcomas, y en el caso de la línea HBV-60 también inmunológicas, consideramos que las células neoplásicas no solo se caracterizan por tener un proceso de desdiferenciación, sino que además puede existir un proceso de diferenciación aberrante, esto es, adquieren características funcionales que no corresponden con el tipo histológico del cual provienen, siendo esto causado por procesos anormales en la represión y expresión de su material genético lo cual se refleja en su fenotipo. Este proceso de diferenciación aberrante puede ser inclusive entre líneas celulares malignas originadas de un mismo tipo histológico, como fué en el caso de las líneas celulares OSX-1 y OSX-2, que exhibieron distintos niveles en la producción de colágena, fosfatasa alcalina y ácida, así como también existieron diferencias en la producción de esta última enzima en las líneas celulares LPF-59 y LNG-83.

El número cromosómico diploide de 46 exhibido por las líneas fibroblásticas VC-2 y LFE-24, nos proveen de un buen punto de comparación, el cual nos asegura que las características cromosomales presentadas por las líneas de sarcomas, son realmente representativas de las alteraciones que pudieran tener estas células in vivo y no consecuencia de alteraciones provocadas por las condiciones de cultivo.

Con la finalidad de detectar alguna aberración a nivel cromosómico

sómico, se efectuó la determinación del número cromosomal para las 4 líneas de sarcomas OSX-1, OSX-2, LPP-59 y LNG-83. En ninguna de estas determinaciones se encontró un número modal claro, indicándonos con esto, la inestabilidad del material genético que presentan estas células. Además, se observó en todos los casos alteraciones aneuplóidicas más específicamente del tipo hipoploide, la cual es una de las características distintivas que poseen las células de origen maligno. Por lo tanto, lo anterior nos da un indicio más para reafirmar que las líneas celulares obtenidas a partir de las biopsias de sarcomas, son realmente de origen maligno. Por otro lado, las células de las líneas OSX-1, OSX-2, LPP-59 y LNG-83 exhibieron mitosis con algunos cromosomas completamente pulverizados, lo cual sugiere que están infectadas por virus, apoyando de esta manera, la teoría que propone una alteración maligna de origen viral en los osteosarcomas y liposarcomas (10,79). Sin embargo, sería recomendable que en futuros trabajos se determinara en forma precisa, si estas pulverizaciones son provocadas por una infección viral adquirida en el proceso de cultivo, o si la presencia de virus es una característica común de estos sarcomas in vivo. Por último, es interesante hacer notar que entre las líneas de origen adiposo obtenidas, hubo una alteración similar en el número cromosomal ya que se encontró un alto porcentaje de mitosis con 44 cromosomas, siendo semejante al encontrado para 46 cromosomas. Sin embargo, hay que destacar que tanto la morfología como el comportamiento in vitro de estas 2 líneas fué muy disímil. Esto se puede interpretar como que en ambos casos hubo el mismo factor etiológi-

co causante de la transformación neoplásica, pero que las células alteradas se encontraban en diferentes etapas de su proceso de diferenciación. Por otro lado, no se encontraron alteraciones cromosomales, semejantes entre las 2 líneas de osteosarcomas, ya que -- mientras una mantuvo como mayoritario el número de 46 cromosomas, la otra presentó predominante 42 y 45. Siendo que en estos casos -- ambas líneas de osteosarcoma tenían tanto morfología celular como comportamiento in vitro semejante, podríamos suponer que para este caso no hubo un agente etilógico común que origino estos sarcomas, pero que las células se encontraban en semejantes condiciones de diferenciación. Es evidente que en ninguno de los casos analizados disponemos de un marcador de alteración cromosomal, ya que éstos no se presentaron en forma modal, por lo tanto creemos que sería pertinente el realizar estudios cariotípicos en los cuales sea posible determinar en forma precisa, la ausencia de algún o algunos cromosomas, así como posibles daños en estos, que pudiesen ser utilizados como marcadores específicos de ciertos tipos de sarcomas.

Siendo que es conocido que los macrófagos tienen la propiedad de interaccionar con los linfocitos de sangre periférica como un paso en el proceso de la respuesta inmune, al grado de formar asociaciones llamadas islas inmunológicas, supusimos que un buen marcador, para la identificación del origen histiocítico de la línea HBV-60, consistía en evaluar la capacidad de interacción de estas células con leucocitos de sangre periférica. Tal y como se esperaba, se detectó una interacción bastante fuerte a las 24 hrs de cultivo. Sin embargo, al realizar los experimentos de interacción des

pués de 1 hr de cultivo, se observó que dicha interacción no se -- producía. Supusimos en consecuencia, que la interacción detectada entre los leucocitos y las células de la línea HBV-60, no representaba al proceso de formación de islas inmunológicas (el cual es mediado por receptores y debería ser a corto plazo), sino a un proceso de reconocimiento entre célula maligna y leucocito normal que al - cabo de 24 hrs haya favorecido una interacción de reconocimiento - más fuerte.

Este concepto de reconocimiento de células malignas por leucocitos normales, no fué reforzado, ya que al estudiar el efecto de la interacción que pudiesen tener estos leucocitos con las otras - células malignas, encontramos que el grado de dicha interacción -- cambiaba en cada línea celular. La única correlación que se dió entre este fenómeno y las características celulares estudiadas la encontramos con el tiempo de doblaje, ya que mientras este tiempo -- aumentaba también se incrementaba la interacción con leucocitos.

Si tomamos en consideración que el tiempo de doblaje no ésta directamente relacionado con el grado de malignidad de las células en cultivo, sino más bien al grado de diferenciación que las células hayan alcanzado al momento de su transformación maligna, consideramos que si la interacción con leucocitos está directamente relacionada con el tiempo de doblaje, puede este fenómeno dar lugar a un ensayo clínico mediante el cual se determine el grado de diferenciación de células provenientes de diferentes tumores. Sin embargo, no queda claro el porqué el tiempo de interacción por nosotros detectado está tan íntimamente asociado al tiempo que tarda -

una célula en duplicarse. Es evidente que más estudios son necesarios, para evaluar si algún fenómeno específico sucede en las células durante su proceso mitótico, que haga que los leucocitos no puedan llegar a detectar algún marcador que produzca una reacción inmunológica importante. O que por otro lado, mientras las células se encuentran más diferenciadas, pueden aparecer ciertos receptores membranales que permitan al sistema inmune su reconocimiento.

El hecho de que la interacción entre los leucocitos y las células adherentes tenga una función de defensa inmunológica, está dada por la producción de linfocinas las cuales activaron a los linfocitos que no participaron en la interacción directa, ya que se encontró que aparecían conforme al tiempo de cocultivo células semejantes a linfoblastos y células plasmáticas entre los linfocitos en suspensión, así como varias células en proceso mitótico. Estos resultados indican que la interacción de un cierto tipo de linfocito con las células tumorales, puede inducir a otro tipo de linfocito a producir linfocinas con propiedades de blastogenización, que den lugar a la fabricación de anticuerpos antitumorales por células plasmáticas y a la proliferación local de células T inmunocompetentes. Este mecanismo de activación fué muy importante, llegando a presentarse un 20% de células activadas a los 5 días de cultivo.

CONCLUSIONES

1) Dadas las características morfológicas, bioquímicas, inmunológicas y número cromosomal presentadas por las células obtenidas a partir de las biopsias de sarcomas, pensamos que éstas son realmente de origen maligno.

2) Las células malignas cultivadas in vitro presentaron una mayor independencia a los factores medio ambientales de cultivo -- que las células no malignas.

3) El crecimiento de células normales no es necesariamente -- más lento que el maligno, sino más bien éste último ha perdido su control a la proliferación.

4) No es exclusiva de las células normales cultivadas in vitro la inhibición por contacto, así como tampoco es exclusiva de las células malignas cultivadas in vitro el crecimiento en capas múltiples.

5) Las células neoplásicas no sólo se caracterizan por tener un proceso de desdiferenciación, sino que además existe un proceso de diferenciación aberrante que puede ser causado por procesos anormales en la represión y expresión de su material genético.

6) La interacción de leucocitos de sangre periférica humana con células cultivadas in vitro, esta relacionada con la tasa de proliferación de éstas y probablemente con su grado de diferenciación.

7) Los terminos malignidad y diferenciación no son necesariamente directamente correspondientes, ya que las células neoplásicas

más malignas no fueron siempre las más indiferenciadas.

En resumen podemos decir que el trabajo aquí descrito aporta importantes avances en la parte teórica, en donde se contribuyó al entendimiento del proceso de malignidad y su correlación con el grado de indiferenciación de las células tumorales, mediante la utilización de líneas celulares inmortales provenientes de sarcomas humanos, y en la parte aplicativa se dan las bases para un ensayo mediante el cual, a corto plazo, se determine el grado de indiferenciación de un tumor, al interaccionar con leucocitos de sangre periférica y relacionarlo con la tasa de proliferación, así como el grado de malignidad al obtener el tiempo de latencia de las células tumorales en cultivo in vitro.

A P E N D I C E I

Composición de Algunos Medios Químicamente Definidos (mg).

Sustancias	199	M	E	D	I	O	S	Eagle's Medium
		850	NCTC 109	CMRL 1066	M S	SM-2 Medium	S-103	
L-alanina	50	25	314	25	--	---	27	---
Ac. L-amino- butiril	--	--	5.5	--	---	---	---	---
L-arginina- HCL	70	70	25	70	--	60	168	105
L-asparagina	--	--	8.9	--	---	---	---	---
Ac. L-asparti co.	60	30	9.9	30	--	---	20	---
L-cistina	20	20	10.9	20	--	---	14	24
Ac. L-glutámi co	150	75	8.2	75	--	---	---	---
L-glutamina	100	100	135	100	--	280	292	292
Glicina	50	50	13.5	50	--	150	11	---
L-histidina	20	20	19.7	20	--	10	10	31
L-hidroxipro lina	10	10	4.0	10	--	---	20	---
L-iso-leucina	40	20	18.4	20	--	300	26	52
L-leucina	120	60	20.4	60	--	200	26	52
L-licina	70	70	30.7	70	--	60	37	58
L-metionina	30	15	4.4	15	--	12	15	15
L-ornitina	--	--	7.3	--	---	---	---	---
L-fenilamina	50	25	16.5	25	--	90	16	32
L-prolina	40	40	6.1	40	--	---	17	---
L-serina	50	25	10.7	25	--	---	21	---
L-aurina	--	--	4.8	--	---	---	---	---
L-treonina	60	30	10.9	30	--	60	48	48
L-triptofano	20	10	17.5	10	--	5	10	10
L-tirosina	40	40	16.5	40	--	145	18	36
L-valina	50	25	25.0	25	--	170	47	46

Ac. aminoben-								
zolpo	0.05	0.05	0.12	0.05	0.01	---	---	---
Biotina	0.01	0.01	0.02	0.01	0.01	0.15	---	---
Pentofenato								
de calcio	0.01	---	0.02	0.01	0.04	0.1	1.2	1
Colina	0.5	0.5	1.25	0.5	1.4	1.0	1.4	1
Ac. fólico	0.01	0.01	0.02	0.01	0.01	8.0	2.2	1
Inositol	0.05	0.05	0.12	0.05	1.4	3.5	2.15	2
Niacina	0.02	---	0.06	0.02	---	0.15	---	---
Niacinamida	0.02	---	0.06	0.02	0.4	---	0.6	1
Piridoxal	0.02	0.02	0.06	0.02	0.4	---	1.0	1
Piridoxamina	---	---	---	---	0.4	---	---	---
Piridoxina	0.02	0.02	0.06	0.02	---	0.11	---	---
Riboflavina	0.01	---	0.02	0.01	0.4	0.15	0.38	0.1
Tiamina	0.01	---	0.02	0.01	1.0	0.15	1.7	1
Vit. B ₁₂	---	---	0.1	---	---	0.01	---	---
Vit. A	0.01	0.01	0.25	---	---	---	---	---
Ac. ascorbi								
co	0.05	50.0	49.9	50.0	---	50.0	---	---
Vit. E	0.01	0.01	0.02	---	---	---	---	---
Vit. D	0.1	0.1	0.25	---	---	---	---	---
Vit. K	0.01	0.01	0.02	---	---	---	---	---
Adenina	10	---	---	---	---	---	---	---
Guanina	0.9	---	---	---	---	---	---	---
Hipoxantina	0.3	---	---	---	---	---	---	---
Timina	0.3	---	---	---	---	---	---	---
Uracilo	0.3	---	---	---	---	---	---	---
Xantina	0.3	---	---	---	---	---	---	---
Ac. adenili								
co	0.2	---	---	---	---	---	---	---
Desoxiadeno								
sina	---	10.0	10.0	10.0	---	---	---	---
Desoxiciti								
dina	---	10.0	10.0	10.0	---	---	---	---
Desoxigua-								
nosina	---	10.0	10.0	10.0	---	---	---	---

5-metilci- tosina	---	0.1	---	---	---	---	---	---
5-metildeso- xicitidina	---	0.1	---	0.1	---	---	---	---
Timidina	---	10.0	10.0	10.0	---	---	---	---
2-desoxiri- bosa	0.5	---	---	---	---	---	---	---
D-ribosa								
Cocarbixila- sa	---	1.0	1.0	1.0	---	---	---	---
Coenzima A	---	2,5	2,5	2,5	---	---	---	---
Difosfopi- ridina	---	7.0	7.0	---	---	---	---	---
Flavín adeno- sina	---	1.0	1.0	1.0	---	---	---	---
Trifosfopiri- dina	---	1.0	1.0	1.0	---	---	---	---
Uridinatri- fosfato	---	1.0	1.0	1.0	---	---	---	---
Lecitina	---	---	---	---	---	2.5	---	---
Ac. oleico	---	5.0	5.0	12,5	5.0	---	---	---
Colesterol	0.2	0.2	---	0.2	---	10.0	---	---
Glucosa	1000	1000	1000	1000	2000	1000	1000	1000
D-glucosamina	---	---	3,2	---	---	---	---	---
Glucuronolac- tona	---	---	1,8	---	---	---	---	---
Glutati3n	0,05	10,0	10,1	10,0	---	---	---	---
Acetato de sodio	50,0	50,0	50,0	83,0	500	---	---	---
Glucuronato de sodio	---	4,2	1,8	4,2	---	---	---	---
Adenosina- trifosfato	10,0	---	---	---	---	---	---	---
Etanol	---	16,0	---	16,0	---	394	---	---
NaCl	6800	6800	6800	6800	8000	8000	6800	6800

KCl	400	400	400	400	400	400	400	400
CaCl ₂	200	200	200	200	140	400	200	200
MgCl ₂	---	---	---	---	---	100	---	200
MgSO ₂	200	200	200	200	200	100	200	---
NaH ₂ PO ₄	140	140	140	140	---	60	140	150
Na ₂ HPO ₄	---	---	---	---	60	60	---	---
KH ₂ PO ₄	---	---	---	---	150	---	---	---
NaHCO ₃	2200	2200	2200	2200	1050	1100	2200	2000
CoCl ₂	---	---	---	---	---	0.05	---	---
CuSO ₄	---	---	---	---	---	0.1	---	---
Fe(NO ₃) ₃	0.1	0.1	---	---	---	0.4	---	---
MnCl ₂	---	---	---	---	---	0.1	---	---
(NH ₄) ₂ MoO ₄	---	---	---	---	---	0.2	---	---
ZnSO ₄	---	---	---	---	---	1.0	---	---

A P E N D I C E II

Preparación de Medio de Eagle:

Se mide un volumen de agua bidestilada 5% menor al volumen de medio total deseado, utilizando para éllo 2 matraces. Se adicionan 13.4 g/l del medio de Eagle en polvo (Gibco Laboratorios, U.S.A.), agitándose suavemente, se agregan 3.7 g de bicarbonato de sodio, - 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina. Se complementa el volumen deseado con agua bidestilada, se ajusta el pH entre 0.2 y 0.3 menos del que se desea, que es de 7.2 (ésto se hace con ácido clorhídrico) y se esteriliza por filtración con bioxido de carbono, pasándolo a través de una membrana con poro de 0.22 µ.

A P E N D I C E III

Preparación de Solución Amortiguadora de Posfatos (PBS);

- PBS con calcio y magnesio.-

En 1 litro de agua bidestilada, se disuelven las siguientes -
sustancias:

Cloruro de calcio-----	0.10 g
Cloruro de sodio-----	8.00 g
Fosfato de sodio monobásico-----	2.16 g
Fosfato de potasio monobásico-----	0.20 g
Cloruro de magnesio-----	0.10 g
Cloruro de potasio-----	0.20 g

Una vez disueltas estas sustancias, se ajusta el pH a 7.2 con ácido clohídrico y se esteriliza la solución por filtración en una membrana milipore cuyo poro es de 0.22 μ .

- PBS sin calcio y sin magnesio.-

Se prepara la solución anterior, pero sin adicionar las sales de calcio y magnesio, siendo su esterilización por medio de autoclave.

A P E N D I C E IV

Preparación de Verseno:

Para preparar el Verseno se agregan en 800 ml de agua bidestilada, las siguientes sustancias:

Tris Base-----	3.04 g
Cloruro de sodio-----	8.00 g
Cloruro de potasio-----	0.40 g
Etilen-diamin-tetra-acético (EDTA)---	0.20 g

Posteriormente se agita, se afora a 1 lt con agua bidestilada se ajusta el pH a 7.7 con ácido clorhídrico 10 N y se esteriliza por medio de autoclave a 20 lb durante 20 min.

A P E N D I C E V

Preparación de Reactivos para Fosfatasa Alcalina:

Para la preparación de la solución que contiene el sustrato específico en la tinción de fosfatasa alcalina, se disuelve 1 mg de Naftol AS-MX (Sigma Chemical Co., U.S.A.) en 0.50 ml de N,N Dimetilformamida (Sigma Chemical Co., U.S.A.); una vez disuelto el Naftol AS-MX, se agregan 5 ml de una solución amortiguadora de acetato veronal 0.1 M a pH 9 y por último se disuelve en esta solución 1 mg/ml de sal rojo rápido TR (Sigma Chemical Co., U.S.A.). Para preparar la solución amortiguadora de acetato veronal, se disuelven 1.17 g de acetato de sodio y 2.94 g de barbiturato de sodio -- (Mallinckrodt Chemical Works Co., U.S.A.) en 100 ml de agua destilada. De esta solución se toman 5 ml y se le adicionan 0.25 ml de ácido clorhídrico 0.1 N, ésto se mezcla con 17.75 ml de agua destilada.

A P E N D I C E VI

Preparación de Reactivos para Fosfatasa Acida:

Pra la preparación de la solución fijadora, se toman 2 ml de una solución concentrada de citrato (*) y se mezclan con 18 ml de agua destilada, a ésto se adicionan 30 ml de acetona. Esta solución se debe de preparar en el momento de usarse.

Para la preparación de la solución conteniendo el sustrato es

pecífico en la tinción de fosfatasa ácida, se toman 2 ml de una solución de Naftol AS-BI ácido fosfórico a una concentración de 12.25 mg/ml en N,N Dimetilformamida, se mezclan con 2 ml de una solución 2.5 M de acetato (*) y en el caso de medir la enzima tartrato resistente, se agregan 2 ml de una solución 0.67 M de tartrato (*) y a todo se le agregan 44 ml de agua destilada. En el caso de que no se vaya a medir la enzima tartrato resistente, se elimina la solución de tartrato y en lugar de 44 ml de agua destilada se adicionan 46 ml. Una vez preparada esta solución, se agregan 15 mg de -- sal Rápida de Garnet GBC, se mezcla bien y se filtra por papel Watman No. 54.

(*) Estos reactivos bienen preparados en el Kit. 386 para fosfatasa ácida de Sigma Chemical Co., U.S.A. .

A P E N D I C E VII

Preparación de Reactivos para Peroxidasa:

Para preparar la solución que contiene el sustrato específico en la tinción de peroxidasa, se disuelve el reactivo indicador de peroxidasa (*), el cual contiene 25 mg de p-Fenilendiamina de ácido clorhídrico y 50 mg de catecol, en 50 ml de una solución de 20 mM de maliato de Trizma (*), se calienta a 37°C y por último se le adicionan 0.2 ml de peróxido de hidrógeno al 3%.

(*) Estos reactivos bienen en el Kit. No. 390-A para peroxidasa de Sigma Chemical Co., U.S.A. .

A P E N D I C E VIII

Preparación de Soluciones para Determinación de Colágena:

A continuación se describe la preparación de los reactivos empleados en la técnica para determinación de colágena:

-Solución estandar de hidroxiprolina.- Una solución es preparada por dilución de 25 mg de hidroxil-L-prolina cristalina (Sigma Chemical Co., U.S.A.) en 250 ml de ácido clorhídrico 0.001 N . El estandar es preparado por diluciones con agua destilada para obtener concentraciones de 1 a 5 μ g por 2 ml.

-Buffer de ácido cítrico y ácido acético glacial.- 5 g de ácido cítrico monohidratado, 120 g de acetato de sodio trihidratado, 34 g de hidróxido de sodio, son diluidos en 12 ml de ácido acético glacial y finalmente ajustados a un volumen de 1 lt. El pH debe corregirse a un valor de 6, siendo guardada en refrigeración con unas gotas de tolueno.

-Cloramina T .- A 0.05 M se prepara esta solución, disolviendo 1.41 g de cloramina T (E. Merk., Alemania), en 20 ml de agua destilada con 30 ml de metil cellosolve (Sigma de México) y 50 ml del -buffer de ácido cítrico-ácido acético. La solución es guardada en un frasco ambar.

-Acido perclórico.- Una solución 3.15 M es preparada por dilución de 27 ml de ácido perclórico al 70% en 100 ml de agua destilada.

- p-Dimetilaminobenzaldehído.- Se prepara una solución al 20% un poco antes de ser usada, adicionando metil cellosolve a 20 g de p-Dimetilaminobenzaldehído (E. Merk, Alemania), dando un volumen -

final de 100 ml . Para su mejor dilución puede ser colocado en un baño de agua a 60°C, hasta que no haya ningún residuo.

A P E N D I C E IX

Preparación de Soluciones para Determinación de Lisozima:

- Suspensión de Micrococcus lysodeikticus .- Se colocan 25 mg de paredes bacterianas de M. lysodeikticus, en 100 ml de una solución amortiguadora de fosfatos 0.067 M a un pH de 6.25 . Esta suspensión es pasada posteriormente a través de una malla fina para quitar las partículas más grandes y así obtener una solución homogénea.

- Solución de lisozima.- Se colocan 100 µg de lisozima, en 1 ml de una solución amortiguadora de fosfatos de 0.067 M con un pH de 6.25 , de esta solución se toman alicuotas para obtener diluciones de 5 hasta 20 µg/ml.

A P E N D I C E X

Preparación de Eritrocitos Activados de Carnero (EA):

Se toman 0.5 ml de sangre de carnero y se lavan 3 veces con 3 ml de PBS, centrifugándose durante 3 min a 500g cada vez, después se agregan 2 ml de PBS y 2 ml de IgG (Cordies Laboratories, U.S.A.) diluida 1:600 en PBS sin calcio y sin magnesio. Se resuspenden las células y se incuban durante 30 min a 37°C, pasado este tiempo, -- los eritrocitos se lavan 3 veces con PBS de la manera antes descrita y finalmente se resuspenden en 4 ml de PBS.

Preparación de Eritrocitos Activados de Carnero más Complemento (EAC):

Se toman 2 ml de EA, 0.8 ml de PBS y 0.2 ml de suero humano normal diluido 1:50 en PBS. Las células se resuspenden y se incuban durante 30 min a 37°C, después de pasado este tiempo, se lavan 3 veces con PBS, dejándose en un volumen final de 2 ml de PBS.

A P E N D I C E X I

Preparación de Ficoll-Paque:

La solución de Ficoll para llevar a cabo la separación de leucocitos mononucleares se hace de acuerdo a la siguiente fórmula: - Se prepara una solución de Ficoll (Ficoll 400, Farmacia Fine Chemicals, Suiza) al 9% en agua destilada. De esta solución se toman 24 ml y son mezclados con 10 ml de una solución Hypaque (Winthrop -- Products, U.S.A.) al 34% en agua destilada. Estas 2 soluciones se mezclan perfectamente, quedando con una densidad final de 1.07 -- g/ml . La esterilización de esta solución se lleva a cabo por medio de autoclave a 10 lb de presión durante 15 min .

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Aaronson, S. A., et. al., Human sarcoma cells in culture identification by colony forming ability on monolayer of normal cells, Exp. Cell Res., 61:1-5, -1970.
- 2.- Abercrombie, M., and Heaysman, J. E. M., Observations on the social behavior of cells in tissue culture, Exp. Cell Res., 6:293-306, 1954.
- 3.- Absher, M., Hemocytometer counting, en Tissue Culture, ed. Krusse, F. P., and Patterson, M. K., Ed. American Press, San Fransisco, U.S.A., 1973, pp. 395-397.
- 4.- Adams, R. L. P., Cell culture for biochemist, Ed. Elsevier, North Holland Biomedical Press, New York, U.S.A., 1980, pp. 23-65.
- 5.- Alitalo, K., et. al., Extracellular matrix proteins characterize human --- tumor cell lines, Int. J. Cancer, 27:755-761, 1981.
- 6.- Alitalo, K., and Vaheri, A., Pericellular matrix in malignant transforma-- tion, Adv. Cancer Res., 37:111-158, 1982.
- 7.- Balinsky, B. I., Introducción a la embriología, Ed. Omega, Barcelona, ---- España, 1978, p. 475.
- 8.- Benhaen, F. J., et. al., Modulation of the expresion of alkaline phopha--- tase genes in a human malignant cell line passaged trough nude mice, Int. J. Cancer, 28:257-264, 1981.
- 9.- Bernard, C., Lecons sur les phenomenes de la vie commun aux animaux et aux vegetaux, en Methods of Tissue Culture, Ed. Parker C. R., Ed. Harper and ----- Brothers, 3ra. ed., New York, U.S.A., 1961, pp. 1-7.
- 10.- Bey, E., et. al., A human liposarcoma cell line, In Vitro, 16(8):715-721, 1980.
- 11.- Bianco, C., et. al., A population of lymphocyte bearing a membrane recep- tor for antigen-antibody-complement complexes I: separation and characteriza-- tion, J. Exp. Med., 132:702, 1970.
- 12.- Burrows, M. T., The cultivation of the tissue chicken embryo outside the body, en Methods of Tissue Culture, ed. Parker, C. R., Ed. Harper and ----- Brothers, 3ra. ed., New York, U.S.A., 1961, pp. 62-63.
- 13.- Carl, B. J., Correlation of in vitro growth properties and tumoreginecity of syrian hamster cell lines, Cancer Res., 39:1504-1510, 1979.
- 14.- Carrel, A., The new cytology, en Methods of Tissue Culture, ed. Parker, - C. R., Ed. Harper and Brothers, 3ra. ed. New York, U.S.A., 1961, p. 64.

- 15.- Chapman, A. L., et. al., A study of a new human tumor cell line (rhabdo--
miosarcoma), Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 146:1087-1092, 1974.
- 16.- De Bono, D., Endothelial-lymohocyte interactions in vitro I: adherence of
nonalergised lymphocytes, Cell Imm., 26:78-82, 1976.
- 17.- Deman, J. C., et. al., A new cell line from a human chondrosarcoma, Br. -
J. Cancer, 35:403-414, 1977.
- 18.- De Robertis, E. D. P., et. al., Biología celular, Ed. El Ateneo, 9a. ed.,
Buenos Aires, Argentina, 1977, pp. 388-394.
- 19.- De Vita, V. T., et. al., Cancer principles and practice of oncology, Ed.
J. B. Lippincott Co., Philadelphia, U.S.A., 1982, pp. 80-92.
- 20.- Dickman, P. S., et. al., Ewing's sarcoma characterization in established
cultures and evidence of its histogenesis, Lab. Invest., 47:375-382, 1982.
- 21.- Eagle, H., Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture, Science,
122:501-504, 1955.
- 22.- Eisenger, M., Human lymph nodes, en Tissue Culture, ed. Krusse, F. P., --
and Patterson, M. K., Ed. American Press, San Fransisco, U.S.A., 1973, pp. 65-
-69.
- 23.- Favoriz, C. B., Antigen-antibodies reaction in tissue culture, en Immuno-
logical Methods, ed. Gerkragh, J. F., Ed. Academic Press, Philadelphia, -----
U.S.A., 1977, pp. 80-95.
- 24.- Fischer, A., Amino-acid metabolism of tissue cells in vitro, en Methods -
of Tissue Culture, ed. Parker, C. R., Ed. Harper and Brothers, 3ra. ed., New -
York, U.S.A., 1961, p. 65.
- 25.- Fogh, T., et. al., One hundred and twenty-seven cultured human cell lines
producing tumors in nude mice, J. Natl. Cancer Inst., 59:221-226, 1977.
- 26.- Freedman, H. V., Cellular tumorigenicity in nude mice; correlation with -
cell growth in semi-solid medium, Cell, 3:355-359, 1974.
- 27.- Fudenberg, H. H., et. al., Inmunología clínica, Ed. El Manual Moderno, --
México D. F., México, 1978, pp. 267-287.
- 28.- Gey, G. O., et. al., Tissue culture studies of the proliferative capacity
of cervical carcinoma and normal epithelium, Cancer Res., 12:264-265, 1952.
- 29.- Giard, J. D., et. al., In vitro cultivation of human tumors; establish---
ment of cell lines derived from a series of solid tumors, J. Natl. Cancer ----
Inst., 51:1417-1423, 1973.
- 30.- Giraldo, G., et. al., Kaposi's sarcoma - a new model in search for -----

viruses associates with human malignancies, J. Natl. Cancer Inst., 49:1495----
-1507, 1972.

31.- Gonda, K. A., et. al., Ultrastructural studies of surface features of ---
human normal and tumor cells in tissue culture by scanning and transmission ---
electron microscopy, J. Natl. Cancer Inst., 56(2):245-263, 1976.

32.- Graydon, H. W., et. al., Development and characterization of a human ----
sarcoma cell line, MES-SA sensitive to multiple drugs, Cancer Res., 43:4943---
4950, 1983.

33.- Green, H., and Meuth, M., An established pre-adipose cell line and its --
differentiation in culture, Cell, 3:127-133, 1974.

34.- Gurr, E., Methods of analytical histology and histo-chemistry, Ed. -----
Williams and Wilkins C. D., 5ta. ed., Great Britain, 1960.

35.- Hajdu, S. J., and Hajdu, E. O., Cytopathology of sarcomas and other non---
epithelial malignant tumors, Ed. Saunders, Philadelphia, U.S.A., 1974.

36.- Ham, A. W., Tratado de histología, Ed. Interamericana, 6ta. ed., México,
D. F., México, 1970, pp. 59-62.

37.- Hanh, T. N., et. al., Reversibility of muscle differentiation in the ----
absence of commitment: analysis of a myogenic cell line temperature-sensitive
for commitment, Cell, 34:281-293, 1983.

38.- Harrison, R. G., Observations on the living developing nerve fiber, en --
Methods of Tissue Culture, ed. Parker, C. R., Ed. Harper and Brothers, 3ra. --
ed., New York, U.S.A., 1961, pp. 2-4.

39.- Hascall, G. K., and Kimura, J. H., The ultrastructure of cultures from --
the swarm rat chondrosarcoma, The Anat. Rec., 200:267-292, 1981.

40.- Hayflick, L., and Moorhead, P. S., The serial cultivation of human di----
ploid cell strains, Exp. Cell Res., 25:585-621, 1961.

41.- Him, T. J., and Levan, A., The chromosome number of man, Hereditas, 42:2--
-6, 1956.

42.- Hiroshi, I., et. al., Bening and malignant fibrous histiocytoma of the --
soft tissue, Cancer, 50(3):520-530, 1982.

43.- Holley, R. W., and Kierman, J. A., Contact inhibitor of cell division in
3T3 cells, Proc. Natl. Acad. Sci., 60(1):300-304, 1968.

44.- Jones, P. A., et. al., The relationship between tumorigenicity, growth in
agar and fibrinolytic activity in line of human osteosarcoma cells, Int. J. --
Cancer, 16:616-621, 1975.

- 45.- Kaplan, P. L., The role of transforming growth factors in oncogenic trans-
formation, Diss. Abstr. Int. (B)., 43(9):2807, 1983.
- 46.- Kirk, D., and Kaighn, E., Non-reciprocal interactions in normal-neoplas-
tic human cells. A quantitative, kinetic approach to cell interactions in ----
vitro, Cell Biol. Int. Rep., 4(6):599-608, 1980.
- 47.- Klein, G., Immune and non-immune control of neoplastic development: ----
contrasting effects of host and tumor evolution, Cancer, 45(10):2486-2497, ---
1980.
- 48.- Kurosv, Y., et. al., Lymphocyte response to autochthonous human solid ----
tumor cells: relationship to histological types and tumor load, Gann, 70:821--
-824, 1979.
- 49.- Kwong, Y., et. al., Characterization of newly established human osteo----
sarcoma cell line, LM-1, In Vitro, 17:308-314, 1981.
- 50.- Lamon, E. W., Stimulation of tumor cell growth in vitro: A critical ----
evaluation of immunologic specificity, J. Natl., Cancer Inst., 59:769-774, ---
1977.
- 51.- Lehringer, A. L., Biochemistry, Ed. Worth Publishers Inc., 2da. ed., New
York, U.S.A., 1977, pp. 135-150.
- 52.- Levan, A., et. al., Chromosomes and cancer, Hereditas, 86:15-30, 1977.
- 53.- Lewis, M. R., and Lewis, W. H., The cultivation of tissues from chick ----
embrios in solutions of NaCl, CaCl₂, KCl and NaHCO₃, en Methods of Tissue ----
Culture, ed. Parker, C. R., Ed. Harper and Brothers, 3ra. ed., New York, ----
U.S.A., 1961, pp. 62-64.
- 54.- Lwitin, J., Trypsinization of diploid human fibroblasts, en Tissue -----
Culture, ed. Krusse, F. P., and Patterson, M. K., Ed. American Press, San ----
Fransisco, U.S.A., 1973, pp. 188-192.
- 55.- Macpherson, I., and Montagnier, L., Agar suspension culture for the ----
selective essay of cells transformed by polyoma virus, Virology, 23:291-294, -
1964.
- 56.- Macpherson, I., Soft agar techniques, en Tissue Culture, ed. Krusse, F. -
P., and Patterson, M. K., Ed. American Press, San Fransisco, U.S.A., 1973, pp.
276-280.
- 57.- Marell, M. K., Is invasiveness in vitro characteristic of malignant ----
cells ?, Cell Biol. Int. Rep., 3(8):627-635, 1979.
- 58.- Marshall, C. J., et. al., A transforming gene present in human sarcoma --

- cell lines, Nature(London), 299:171-173, 1982.
- 59.- Martin, G. M., Human skin fibroblasts, en Tissue Culture, ed. Krusse, F. P., and Patterson, M. K., Ed. American Press, San Fransisco, U.S.A., 1973, pp. 39-45.
- 60.- Mather, J., et. al., The role of hormones in the growth and regulation of cells in a serum-free medium, en The Growth Requirements of Vertebrates Cells in vitro, ed. Waymouth, C., et. al., Ed. Press Syndicate of the University of Cambridge, U.S.A., 1981, pp. 245-249.
- 61.- Mc. Donald, I. G., Biological predeterminism in human cancer, Surg. ----- Gynec. and Obst., 92:443, 1951.
- 62.- Miller, E. J., and Gay, S., Collagen: an overview, en Methods in Enzimology, ed. Colowick, S. P., et. al., Vol. 82, Structural and Contractile ----- Protein, Part. A: Extracellular Matrix, Ed. Academic Press, U.S.A., 1982, pp. 3-32.
- 63.- Moore, G., et. al., Human cell line RPMI-M7021, established from a liposarcoma, In Vitro, 9(3):135-138, 1973.
- 64.- Morgan, J. F., et. al., Nutrition of animal cells in tissue culture. ----- Initial studies in a synthetic medium, Proc. Soc. Exper. Biol. Med., 73-1, --- 1950.
- 65.- Morgan R. T., et. al., A human liposarcoma cell line producing hyaluronic acid, Cancer, 45(6):1400-1407, 1980.
- 66.- Morton, D. L., and Malmgren, R. A., Human osteosarcomas: immunologic ----- evidence suggesting associated infectious agent, Science, 162:1279-1281, 1968.
- 67.- Mukherji, B., and Hishaut, Y., Evidence for fetal antigen in human ----- sarcoma, Science, 181:440-442, 1973.
- 68.- Murad, S. D., et. al., Regulation of collagen synthesis by ascorbic acid, Proc. Natl. Acad. Sci., 78(5):2879-2882, 1981.
- 69.- Nicolson, G. H., Metástasis cancerosas, Investigación y Ciencia, 32:22--- -33, 1979.
- 70.- Oppenheim, J. J., et. al., Cellular funtions in immunology and inflama--- tion, Ed. Elsevier, North Holland Inc., New York, U.S.A., 1981, pp. 187-203.
- 71.- Ozzello, L. M. D., et. al., Cultural characteristics of malignant histiocytomas and fibrous xanthomas, Cancer, 16:331-343, 1963.
- 72.- Parker, C. R., Methods of tissue culture, Ed. Harper and Brothers, 3ra. - ed., New York, U.S.A., 1961, pp. 1-80.

- 73.- Patterson, M. K., Measurement of growth and viability of cells in culture, en Methods in Enzymology, ed. Colowick, S. P., et. al., Vol. 52, Cell Culture, Ed. Academic Press, U.S.A., 1982, pp. 141-152.
- 74.- Pérez, R., Introducción a la patología, Ed. Inst. Nal. de la Nutrición, - México D. F., México, 1979, pp. 315-337.
- 75.- Pham, T. A., et. al., Karyological and isoenzyme characterization of ---- established human sarcoma cell line, Neoplasma (Bratisl.), 27:557-566, 1980.
- 76.- Pictet, R. L., The development and function of tissues cultured in a semi-
-def and medium, en The growth Requirements of Vertebrates Cells in vitro, ed. Waymouth, C., et. al., Ed. Press Syndicate of the University of Cambridge, New York, U.S.A., 1981, pp. 245-249.
- 77.- Pluznik, D. H., and Sachs, L., The induction of clones of normal mast --- cells by a substance from conditioned medium, Exp. Cell Res., 43:553, 1966.
- 78.- Polter, V. R., Intermediary carbohydrate metabolism in tumor tissues; --- studies reactions of Krebs citric acid cycle in tumor, with homogenates, ----- slices and in vitro technics, Cancer Res., 11:565, 1951.
- 79.- Pontén, J., et. al., Two established in vitro cell lines from human ----- mesenchymal tumors, Int. J. Cancer, 2:434-447, 1967.
- 80.- Prop, F. J. A., and Wierpjes, G. J., Secuential enzyme treatment of mouse mammary gland, en Tissue Culture, ed. Krusse F. P., and Patterson, M. K., Ed. American Press, San Fransisco U.S.A., 1973, pp. 21-24.
- 81.- Puck, T. T., et. al., Clonal growth in vitro of human cell with fibroblas tic-like cells from a variety of human organs, J. Exper. Med., 106:145, 1957.
- 82.- Rasheed, S., et. al., Characterization of a newly derived human sarcoma - cell line (HT-1080), Cancer, 33:1027-1033, 1974.
- 83.- Reid, L. C. M., Cloning, en Method in Enzymology, ed. Colowick, S. P., -- et. al., Vol. 52, Cell Culture, Ed. Academic Press, U.S.A., 1982, pp. 152-164.
- 84.- Reiko, F., et. al., Natural antibody in human serum to a neoantigen human cultured cells grown in fetal bovine serum, J. Natl. Cancer Inst., 52(4):1051-1057, 1974.
- 85.- Risser, R., and Pollack, R., A nonselective analysis of SV-40 transforma- tion of mouse 3T3 cells, Virology, 59:477-489, 1974.
- 86.- Robbins, S. L., Patología estructural y funcional, Ed. Interamericana, -- México D. F., México, 1975, pp. 81-121.
- 87.- Rosenberg, S. A., Comparison of multiple assays for detecting human anti-

- bodies directed against surface antigens on normal and malignant human tissue culture cells, *J. Imm. Methods*, 17:225-233, 1977.
- 88.- Rosenberg S. A., Lysis of human normal and sarcoma cells in tissue culture by normal human serum: implications for experiments in human tumor immunology, *J. Natl. Cancer Inst.*, 58(5):1233-1238, 1977.
- 89.- Roux, W., Beitrag zur entwicklungsmechanik des embryo, en *Cell and Tissue Culture*, ed. Paul, J., Ed. Churchill, 4ta. ed., Livingstone, London, England, 1973, pp. 2-4.
- 90.- Sage, H., and Bornstein, P., Preparation and characterization of procollagens and procollagen-collagen intermediates, en *Methods in Enzymology*, ed. Colowick, S. P., et. al., Vol. 82, Structural and contractile Protein, Part. A, Extracellular Matrix, Ed. Academic Press, U.S.A., 1982, pp. 96-127.
- 91.- Sethi, J., et. al., Growing human sarcomas in culture, *Cancer*, 40:744-755, 1977.
- 92.- Singh, I., et. al., Placenta-like alkaline phosphatases from human osteosarcoma cells, *Cancer Res.*, 39:193-199, 1978.
- 93.- Slocum, H. K., et. al., Characterization of cells obtained by mechanical and enzymatic means from human melanoma, sarcoma and lung tumors, *Cancer Res.*, 41:1428-1434, 1981.
- 94.- Smith, S. H. et. al., The biology of human cells in tissue culture. I: characterization of cells derived from osteogenic sarcomas, *Int. J. Cancer*, 17:219-233, 1976.
- 95.- Takahashi, M., Color atlas of cancer cytology, Ed. Georg. Thieme, Verlag Stuttgart, 2da. ed., Tokyo, Japan, 1981, pp. 32-56.
- 96.- Taylor, W. G., Electrolytes, dissolved gases, buffers and pH changes in tissue culture, en *The Growth Requirements of Vertebrates Cells in vitro*, ed. Waymouth, C., et. al., Ed. Press Syndicate of The University of Cambridge, New York, U.S.A., 1981, pp. 94-104.
- 97.- The American Type Culture Collection, Catalogue of Strains. II, 2da. ed., Maryland, U.S.A., 1979.
- 98.- Todaro, G. J., and Green, H., Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines, *J. Cell Biol.*, 17(2):299-313, 1963.
- 99.- Todaro, G. S., et. al., Sarcoma growth factor and other transforming peptides produced by human cells. Interactions membrane receptors, *Fred.*

Proc., 41(13):2996-3003, 1982.

100.- Tokumitsu, S., et. al., Characterization of liver-type alkaline phosphatase from human gastric carcinoma cells (KMK-2) in vitro, Cancer Res., 39:4732-4738, 1979.

101.- Tokumitsu, S., et. al., Intracellular alkaline phosphatase activity in cultured human cancer cells, Histochemistry, 73:1-13, 1981.

102.- Troye, M., et. al., Lymphocyte-mediated lysis of tumor cells in vitro -- (AECC), induced by serum antibodies from patients with urinary bladder carcinoma or from controls, Int. J. Cancer, 25:45-51, 1980.

103.- Trujillo, M. J., et. al., Establishment in vitro of a human neurogenic sarcoma, Cancer Res., 32:1066-1072, 1972.

104.- Trujillo, M. J., et. al., Long-term culture of lymph node tissue from a patient with lymphocytic lymphoma, Cancer, 20(2):215-224, 1967.

105.- Vanky, F. T., et. al., Human tumor-lymphocyte interaction in vitro. VI. specificity of primary and secondary autologous lymphocyte-mediated cytotoxicity, J. Natl. Cancer Inst., 62(6):1407-1413, 1979.

106.- Vanky, F. T., et. al., Tumor biopsy cells participating in systems in which cytotoxicity of lymphocytes is generated. autologous and allogeneic studies, Int. J. Cancer, 27:273-280, 1981.

107.- Vasiliew, J. M., and Gelfaud, I. M., Neoplastic and normal cells in culture, Ed. Cambridge University Press., Great Britain, 1981, pp. 3-56.

108.- Watson, J. D., Molecular biology of the gene, Ed. Benjamin, 3ra. ed., - New York, U.S.A., 1977, pp. 492-521.

109.- Waymouth, C., et. al., The growth requirements of vertebrates cells in vitro, Ed. Press Syndicate of the University of Cambridge, New York, U.S.A., - 1981, 1-105.

110.- White, P. R., Cultivation of animal tissues in vitro in nutrients precisely known constitution, en Methods of Tissue Culture, ed. Parker, C. R., Ed. Harper and Brothers, 3ra. ed., New York, U.S.A., 1961, p. 66.

110.- Wintrobe, M. M., et. al., Clinical hematology, Ed. Lea and Fabiger, 7ma. ed., Philadelphia, U.S.A., 1974, pp. 227-343.

112.- Woessner, J. F., The determination of hidroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this imino-acid, Arch. Biochem. Biophys., 93:410-447, 1961.

113. - Yaffe, D., Retention of differentiation potentialities during prolonged cultivation of myogenic cells, Proc. Natl. Acad. Sci., 61:477-483, 1968.
114. - Yao - Shi, Fu., et. al., Malignant soft tissue tumors of probable histiocytic origin (malignant fibrous histiocytoomas): general considerations and --- electron microscopic and tissue culture studies, Cancer, 39:1176-1193, 1973.
115. - Zackai, E. H., and Mellman, W. J., Human peripheral blood leukocytes --- cultures, en Human Chromosome Methodology, ed. Yunis, J. J., Ed. Academic ---- Press, 2da. ed., New York, U.S.A., 1974, pp. 95-123.
116. - Zucker, D. F., et. al., Atlas of blood cells. function and pathology, -- Vol. 2, Ed. Lea and Fabiger, Philadelphia, U.S.A., 1981, pp. 347-406.
117. - Zucker, S., et. al., Plasma muramidase: a study of methods and clinical applications, J. Lab. Clin. Med., 75(1):83-92, 1970.

A G R A D E C I M I E N T O S

Deseamos manifestar nuestro agradecimiento al Dr. Benny Weiss Steider, por la excelente asesoría brindada para la realización de este trabajo.

Asimismo, agradecemos al Dr. Manuel Uribe, del Laboratorio de Genética de peces del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, U.N.A.M., por su valiosa ayuda para la obtención de las microfotografías incluidas en este trabajo, así como a los Drs. Arturo ---- Lerma, del Departamento de Patología del Hospital de Oncología del I.M.S.S., y Mario Gutierrez, de la Unidad de Estudios Especiales - de la S.S.A., por el material humano facilitado.

Por último, expresamos nuestra gratitud a los Srs. Ranulfo -- Pedraza y José Chavarría por su colaboración técnica, y a todas -- las personas que trabajan en el Laboratorio de Diferenciación ---- Celular y Cancer.