



6  
227

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

---

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES  
ZARAGOZA**

**ESTABLECIMIENTO DE UNA LINEA CELULAR  
DEL SARCOMA TRANSMISIBLE VENEREO  
CANINO, EN CULTIVOS CELULARES.  
UN ESTUDIO DE LA ULTRAESTRUCTU-  
RA CELULAR.**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL  
TITULO DE :  
BIOLOGO**

**P R E S E N T A :  
JOSE SALVADOR ESTRADA SANCHEZ**

1985.



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

# INDICE

---

|   |    |
|---|----|
| RESUMEN   | 1  |
| INTRODUCCION  | 3  |
| Reseña histórica                                      | 5  |
| Generalidades de Cultivos Celulares                   | 7  |
| Generalidades del Sarcoma Transmisible Venéreo Canino | 12 |
| Antecedentes del Sarcoma Transmisible Venéreo Canino  | 14 |
| JUSTIFICACION   | 17 |
| OBJETIVOS   | 18 |
| HIPOTESIS   | 19 |
| METODOLOGIA   |    |
| Cultivo primario                                      | 20 |
| Subcultivo  | 21 |
| Ultraestructura                                       | 21 |
| Cálculo de la Curva de Crecimiento e Índice Mítico    | 22 |
| Cultivo en Agar Suave                                 | 23 |
| Análisis Cromosómico                                  | 25 |
| Inducción del Tumor                                   | 25 |
| Criopreservación                                      | 26 |

## RESULTADOS

|  |    |
|--|----|
| Cultivo primario                       | 27 |
| Subcultivo                             | 27 |
| Ultraestructura                        | 31 |
| Curva de Crecimiento e Índice Mitótico | 38 |
| Análisis Cromosómico                   | 42 |
| Cultivo en Agar Suave                  | 46 |
| Inducción del Tumor                    | 49 |
| Criopreservación                       | 49 |
| DISCUSION DE RESULTADOS                | 50 |
| CONCLUSIONES                           | 59 |
| BIBLIOGRAFIA                           | 61 |

---

RESUMEN

## RESUMEN

El sarcoma transmisible venéreo canino histológicamente es una neoplasia que de acuerdo a la descripción de estudios realizados con microscopía de luz y electrónica es de origen linfóide y cuya morfología es la de una célula inmadura. Por su amplia distribución geográfica, su frecuente aparición en la población canina y su fácil manejo y mantenimiento en esta especie, el tumor ha sido utilizado como modelo de cáncer por diferentes grupos de investigación, de donde se desprenden estudios de citogenética, transplantabilidad, inmunología, ultraestructura y citología.

Se decidió establecer, caracterizar y purificar una línea del STVC ya que a posteriori servirá para examinar el efecto de drogas anticancerosas en este tipo de tumor. Esta línea se caracterizó dentro de los parámetros morfológicos ( a microscopía de luz y electrónica ), cariotípicos, cinéticos, de desarrollo en agar semisólido, y en su potencialidad de producir el tumor en un hospedero homólogo susceptible.

Las células del STVC presentaron características in vitro similares a las reportadas para células tumorales y transformadas, con morfología fibroblastoide con abundante citoplasma y rasgos ultraestructurales semejantes a las ya observados en tumores venéreos involutivos. El número cromosómico modal fue de 59, y un tiempo de doblaje de la población celular de 40,1 hrs, así mismo se observó que con la técnica en agar semisólido se desarrollan colonias de STVC en crecimiento monoclonal con una eficiencia de placa de 0.035%, persistiendo en las células integrantes de dichas colonias, las características cariotípicas y morfocitológicas del STVC. La capacidad de las células de la línea para producir el tumor venéreo en perros susceptibles, no quedó completamente dilucidada.

INTRODUCCION

---

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

Uno de los aportes más prácticos y útiles que se ha dado en el campo de la Biología y Medicina experimental en los últimos tiempos, ha sido el desarrollo y perfeccionamiento de métodos capaces de mantener in vitro órganos, tejidos y células aisladas de organismos animales y vegetales.

Desde el punto de vista experimental, la gran ventaja es el poder hacer los diferentes estudios funcionales y de interacción celular donde se evita la influencia del complejo organizado, del cual formaba parte ese sistema o esa unidad. Claudio Bernard en 1878 señala y hace énfasis en la importancia del medio interno como regulador de las actividades del tejido vivo, " ya que el ambiente es no solo el producto del metabolismo del tejido, sino que ese medio ambiente va actuar a su vez sobre los tejidos mismos para regular su actividad ". De esta forma se pone de manifiesto la necesidad de crear y de perfeccionar un sistema experimental artificial en el cual la acción del medio ambiente sea más moldeable ( 1 ).

Los cultivos celulares surgieron como una herramienta útil en la investigación biomédica. Células normales de glándulas endocrinas pueden continuar su producción hormonal aún in vitro. Fibroblastos fetales normales, sirven como base para la replicación viral para la producción de vacunas. Cultivos de órganos tales como epitelio bronquial, pueden responder



ante enfrentamientos con carcinógenos químicos in vitro. El desarrollo de células neoplásicas en cultivos establecidos o, en corto plazo abren un camino para el estudio de la etiología y terapéutica del cáncer ( 2 ).

En los últimos veinte años se han desarrollado una serie de investigaciones encaminadas al establecimiento de líneas celulares o cepas celulares de origen neoplásico, entre éstas destacan las cepas estables HeLa y HEp, ambas de células humanas; de origen animal tenemos la línea BHK-21 y la CCL-5 que son líneas ampliamente utilizadas en investigación ( 3, 4 ).

El resultado de todos los trabajos sobre cultivos de tejidos y células ha sido el establecimiento de procedimientos y técnicas para el estudio, comprensión y resolución de diferentes problemas biológicos. Sus métodos han sido aplicados en problemas de Bioquímica, Inmunología, Fisiología, Patología, Virología, etc. en donde ha sido posible estudiar los movimientos celulares; la acción de fuerzas físicas como las radiaciones, la temperatura, el magnetismo; la respuesta a los agentes tóxicos, acción de antibióticos, antisépticos y otras sustancias similares; así como para realizar estudios sobre células normales y malignas, mecanismos de acción viral, ultraestructura celular, fenómenos de división celular, etc. ( 4 ).

Las células en cultivo pueden ser fundamentalmente la base de los estudios fisiológicos, patológicos y farmacológicos como el medio más asequible y depurado con que cuenta hoy en día el investigador de esos campos. No debe olvidarse que los sistemas establecidos in vitro son lo que más se acerca a las condiciones experimentales exigidas en la investigación biomédica, distando mucho de ser todavía el sistema ideal de trabajo. Además de este punto es importante recordar que los cultivos de células y tejidos humanos son los únicos instrumentos de material humano vivo con los

que se puede trabajar experimentalmente ( 5 ).

### Reseña Histórica=====

Los primeros intentos de cultivos en medios artificiales comenzaron en el siglo pasado cuando F.D. Recklinhausen, en 1866, mantuvo vivas células sanguíneas de anfibio durante 35 días, sometiénolas a una gran variedad de condiciones. En 1886, W. Roux efectuó los primeros experimentos de cultivos de tejidos al trasladar la placa neural de un embrión de pollo en desarrollo a una solución salina calentada a 37°, demostrando que el cierre del tubo neural es una función de las células constituyentes ( 6 ).

L. Loab a principios de siglo, en 1902, empleó bloques de agar y plasma coagulados para mantener células sanguíneas, tejido conectivo y otros por un largo tiempo, sin que ellos muriesen, pudiéndose decir que con él se sientan las bases y se dan los primeros pasos efectivos en el cultivo de tejidos. Un año después, Jolly y posteriormente, S.P. Beebe y J.A. Ewing en 1906, hicieron diferentes observaciones sobre divisiones celulares in vitro, el primero con leucocitos de anfibio y los dos últimos con células de un linfosarcoma infeccioso de perro ( 1 ).

A. Carrel tiene una importancia fundamental en el desarrollo de los cultivos de tejidos y células al introducir nuevos métodos y técnicas, además de enfatizar la necesidad ya postulada por Bernard, de que para tener una clara comprensión de las leyes del crecimiento y la organización había que estudiar las unidades estructurales bajo condiciones cuidadosa-

mente controladas, lo cual solo se lograría al aislar del organismo dichas unidades.

Carrel empleó por primera vez extractos de tejidos, lo que permitió una mayor facilidad en la manipulación y manejo de los cultivos, ya que hasta ese tiempo se había estado utilizando como medios nutritivos gotas de linfa y de plasma; también introdujo técnicas asépticas rigurosas como las practicadas y mantenidas por un cirujano, ya que el mayor obstáculo en el cultivo de tejidos era la contaminación. Esto le permitió mantener en una forma efectiva cultivos por el espacio de treinta y cuatro años si el empleo de antibióticos. Los trabajos efectuados por Carrel demostraron que las células animales podían ser mantenidas indefinidamente solo en ciertos casos ( 7 ).

Uno de los objetivos de la escuela de Carrel, fue el de mantener en cultivo continuo, células con un gran desarrollo por un largo periodo de tiempo. Surgiendo la posibilidad de transpolar las técnicas microbiológicas al desarrollo del cultivo celular.

El mejoramiento de las actuales técnicas en cultivos celulares es en parte proporcionado por W. Earle y colaboradores del Instituto Nacional del Cáncer de EE.UU., siendo los primeros en desarrollar células directamente sobre vidrio en gran cantidad, así como de realizar cultivos en suspensión ( 8 ).

En 1911, Warren y Margaret Lewis se abocaron a investigar los factores presentes en un medio para cultivos celulares. Baker en asociación con Carrel, también realizaron esta labor por medio de procesos analíticos, identificando una importante cantidad de los constituyentes presentes en éstos. Así mismo, este tipo de trabajo lo realizaron Fischer, Parker, Healy, Mergan, White, Waymouth y Early dando como resultado el desarrollo de los medios básicos más empleados hoy en día ( 9 ).

## Generalidades de Cultivos Celulares

Las células se caracterizan, en general por tener una cierta morfología, una actividad metabólica definida y una función particular de acuerdo con el tipo de tejido y órgano a cuyo conjunto pertenece, variando dentro de determinados límites el tipo celular del cual se trata. Cuando la célula es aislada del tejido de origen para ser mantenida in vitro, ocurren alteraciones profundas en todos sus aspectos, para poder adaptarse a las nuevas condiciones que le son impuestas. Su morfología y su metabolismo se alteran conservándose algunas de sus funciones ( 10 ).

La célula sufre cambios morfológicos apreciables, por lo que la clasificación usada para las células de los tejidos animales in vivo no puede ser aplicada a las células in vitro. Las células en cultivo tienden a asumir una morfología similar, siendo verdaderamente difícil identificar una célula cuyo origen sea un tejido conectivo o epitelial. Así, desde el punto de vista morfológico se pueden encontrar cuatro grupos celulares fundamentales: a) células en forma de estrella, b) células fusiformes, c) células poligonales y d) células redondas ( 7 ).

Un hecho que hay que tener en cuenta es el de que las células en cultivo pueden sufrir alteraciones en cuanto a su forma de división, así como el aumento general, del número de cromosomas, lo que es bastante aparente en las líneas celulares estables ( 11, 12, 13, 14 ).

El metabolismo celular y su control se encuentran muy alterados en las células en cultivo, tratándose en la actualidad de aclarar algunos de sus problemas, siendo de muy particular interés el de poder descifrar los mecanismos que regulan la actividad celular in vivo y la cual se pier

de casi completamente in vitro. Otros puntos de interés son los estudios del control nutricional, la actividad enzimática, las interacciones celulares y el control genético ( 2 ).

Las condiciones más adecuadas para el crecimiento y mantenimiento de las células in vitro son aquellas más cercanas a su medio ambiente in vivo, y por ésto se hace necesario conocer y considerar todos aquellos factores que afectan directamente los tejidos y sus células ( 2 ).

#### FACTORES AMBIENTALES QUE AFECTAN EL DESARROLLO CELULAR

|                                      |
|--------------------------------------|
| Temperatura                          |
| Presión osmótica                     |
| Concentración $H^+$                  |
| Otros iones inorgánicos              |
| Metabolitos esenciales :             |
| carbohidratos                        |
| gases disueltos                      |
| aminoácidos                          |
| vitaminas                            |
| proteínas                            |
| Metabolitos complementarios :        |
| coenzimas                            |
| nucleósidos                          |
| péptidos                             |
| metabolitos intermediarios           |
| Hormonas                             |
| La matriz en la cual crece la célula |
| Otros factores específicos           |
| Interacción entre los factores       |

( tomado de J. Paul 1965, (7))

Los requerimientos metabólicos de las células en cultivo están orientados hacia la obtención de energía y la producción de los materiales

celulares para su multiplicación, y no esta dirigida hacia funciones celulares específicas. La energía producida es utilizada para la síntesis continua de material protoplásmico, permitiendo a la vez todos los movimientos celulares ( 15 ).

En los cultivos celulares lo más importante y fundamental es el medio en el cual van a mantenerse y desarrollarse las células. Este medio debe ser una mezcla de sustancias equilibradas que permiten a las células cumplir todas sus funciones vitales. Los medios de cultivo por su composición pueden ser sintéticos, los cuales están constituidos por una mezcla químicamente definida de sustancias, y medios naturales como el plasma y los extractos de tejidos.

Solo desde la década pasada se han desarrollado verdaderamente medios químicamente definidos, ya que los medios empleados para el cultivo de células animales in vitro se derivan casi exclusivamente del organismo. El empleo de los medios naturales no le permiten al investigador determinar las sustancias requeridas por las células, además de no poderse observar el efecto de sustancias particulares sumadas al medio, ya que dichos medios presentan una gran complejidad y variabilidad ( 1 ).

Existen dos o tres medios completamente sintéticos para el crecimiento y mantenimiento de líneas celulares, pero por el desconocimiento de algunos puntos en los requerimientos nutricionales de la mayoría de los tipos celulares, los medios químicamente definidos son suplementados con algún producto natural como es el suero sanguíneo ( 8 ).

Todos los medios empleados en el cultivo de tejidos tienen como base una solución constituida por diferentes sales inorgánicas disueltas en agua, la cual cumple una función vital, ya que mantiene el pH y la presión osmótica, además de contener y suministrar los diferentes iones inor

gánicos indispensables, Así mismo sirve para proporcionar dilución e irrigación del medio y suministrar el agua necesaria para el metabolismo celular normal ( 7 ).

Los tejidos y células aisladas de cualquier organismo pueden ser cultivados y mantenidos in vitro en una amplia variedad de condiciones. También se pueden mantener y cultivar, con ciertas limitaciones, órganos y rudimentos de órganos. De esta manera se han desarrollado tres tipos de trabajos en cultivos que pueden ser descritos como cultivos de tejidos, cultivos de células y cultivos de órganos.

Existen varios métodos para el establecimiento de un cultivo, pudiéndose hacer de un fragmento de tejido, de un fragmento de órgano y de una porción de líquido exudado del cuerpo ( 10 ).

El tamaño del explante, el tipo de tejido, su capacidad de crecer y multiplicarse in vitro, el uso al cual se destine, etc. son datos que se deben tener en cuenta al tratar de establecer un cultivo.

Existen dos formas principales de cultivo: cultivos primarios, que son aquellos obtenidos directamente a partir de un explante, y las cepas celulares estables que se han mantenido por pasajes sucesivos en el laboratorio a partir de cultivos primarios. Cada uno de estos tipos de cultivos pueden mantenerse in vitro en forma estacionaria adheridos a las paredes del recipiente que los contiene o en el medio ( 2 ).

Las enzimas son usadas corrientemente para separar las células de fragmentos de tejido a fin de establecer cultivos celulares con capa uniforme, una densidad de población definida y cantidades apreciables de células, aparte de la obtención de cepas puras o clonas. Existen diferentes procedimientos físicos y químicos para el mismo fin, pero la tripsinización como método de obtención de cultivos celulares es el más empleado ( 4 ).

Se encontró que las células transformadas por el virus de polio-  
ma formaban parte de las colonias logradas en agar semisólido, notándose  
que las células normales no proliferaban ( 2 ). McPherson y Montagnier,  
en 1964 observaron que células malignas tales como HeLa, HEp2 y la estir-  
pe L de fibroblastos de ratón pueden también formar colonias en agar su-  
ave, y determinando que dicha técnica puede ser útil en el aislamiento de  
células malignas a partir de neoplasias humanas ( 9 ). McAllister y Reed  
en 1968, colocaron pequeños trozos de tejido y células enzimo-dispersadas  
de tumores sólidos en agar al 0.33%, y éste sobre una mezcla de agar 0.5%  
La eficiencia de formación de colonia fue baja, con un promedio de 133 co-  
lonias por millon de células inoculadas ( 8 ).

Siguiendo este tipo de procedimientos se ha desarrollado la clona-  
ción de células de médula ósea humana y de ratón (ambas normales o con al-  
guna patología), con buenos resultados ( 16 ). Para lograrlo es necesario  
colocar una capa alimentadora que consiste en agar al 0.5% mezclado con  
plasma humano ( 17 ). Esta capa permite la difusión de sustancias que es-  
timulan el crecimiento de las colonias ( 18 ), la mezcla resultante de a-  
gar se ocupa de subcapa y sobre esta se siembran las células tumorales en  
solución de agar al 0.3% como concentración final. Se ha observado que el  
tiempo de crecimiento de una colonia de más de cincuenta células es de a-  
proximadamente 14 días. Con la técnica de Pike y Robinson se ha logrado  
el crecimiento de varias células tumorales entre las que se encuentran  
las del sarcoma de células redondas, logrando en este caso una eficiencia  
de placa de  $4.15 \times 10^{-2}$  ( 16 ).



### Generalidades del Tumor Venéreo Canino

**Sinónimos :** Sarcoma infeccioso, linfosarcoma infeccioso, linfosarcoma venéreo, linfosarcoma transmisible, condiloma canino, sarcoma de Sticker, mikosarcoma ( 19, 20 ), reticulosarcoma -, linfoma -, sarcoma transmisible venéreo canino ( 21, 22, 23 ).

**Definición :** Se trata de una neoplasia constituida por células linfoides inmaduras de forma redonda ó poligonal, sostenidas por finos haces de colágena y fibroblastos ( 24,25, 26, 27 ). Se transmite exclusivamente por células vivas, generalmente durante la cópula ( 28 ).

**Descripción clínica :** En los perros las manifestaciones clínicas de este tumor dependen de : el tamaño del área que afecta al pene, la presencia de metástasis en los nódulos linfoides inguinales, y de la edad del tumor ( 30 ). Cuando la neoplasia es de reciente implantación se aprecian uno o más pequeños nódulos.

El tumor puede tener ulceración, sangrado y necrosis. Los nódulos pueden llegar a medir hasta 5 centímetros de diámetro y tener apariencia de coliflor, el tumor crece en la submucosa. En las hembras, aparecen también nódulos que sobresalen de la mucosa vaginal, tales nódulos varían en diámetro, desde pocos mm hasta 1 ó 2 cm, también su forma es irregular. El tumor puede llegar a obstaculizar el orificio uretral. Las metástasis son poco frecuentes ( 31, 32, 33 ).

Cuando el tumor es transplantado a otro perro por inoculación subcutánea con suspensiones de tejido neoplásico, crece como nódulo solitario, muy raramente se extiende para formar otros

nódulos subcutáneos, puede presentar metástasis a los nódulos linfáticos de la región. Con inoculación intraperitoneal pueden presentarse múltiples tumores pequeños a los dos meses ( 34 ).

Descripción histológica : El tumor adquirido naturalmente, es una masa nodular confluyente y delesnable. La superficie externa es de color rosa pálido y contiene fluido viscoso, esta constituido de tres diferentes tipos de células: de células redondas o poliédricas con numerosas vesículas, aparato de Golgi prominente y abundante citoplasma, ésta es identificada como célula linfóide inmadura. El segundo tipo celular es menos numerosa e identificada como célula fagocítica, con núcleos ovoides alargados y citoplasma irregular, donde se han encontrado numerosos lisosomas, vesículas, figuras de mielina y células fagocitadas parcialmente digeridas. Se consideran estos dos tipos celulares similares en su origen. El último tipo celular corresponde a una célula plasmática y no se le cataloga como una célula neoplásica. El estroma esta formado por tejido conectivo con escasos fibroblastos. El tumor transmitido naturalmente y el inducido presentan características histopatológicas similares. Las células poligonales miden aproximadamente de 9 a 12  $\mu$ m de diámetro, en un arreglo celular compacto, formando cordones ó laminas. Los límites exteriores de las células no son teñidos con hematoxilina-eosina, pero pueden ser claramente teñidos con ác. fosfotúngstico-hematoxilina o por PAS ( 19, 34, 35 ).

## Estudios preliminares acerca del Tumor Venéreo Canino

El tumor venéreo del perro es el tumor transplantable más antiguamente conocido. Ya en 1877, M.A. Novinsky obtiene los primeros resultados en el trasplante exitoso de animal a animal, continuando sus estudios posteriormente en otras especies animales, siendo solo susceptible la zorra ( 19 ).

Para 1934 Stubbs y Furth publican sus trabajos acerca de trasplantes en serie ( emplearon 691 perros ) por inoculación intravenosa logrando cerca del 70% de crecimientos tumorales a los treinta días después del enfrentamiento. Más recientemente Koike efectúa un estudio semejante; él somete a cada animal a trasplantes sucesivos, observando que en tumores de perros anteriormente enfrentados su estadio era más corto y la regresión ocurría en menor tiempo ( 23 ).

Jackson es el primero en interesarse en la citología del tumor, publicando sus trabajos en 1944, un año más tarde Bloom y Meyer dan su trabajo que intenta aclarar el origen de las células de esta neoplasia, identificándolas como linfoblastos, posteriormente Bloom y colb. en 1955 sugieren que dichas células son de origen reticuloendotelial ( 24 ).

A principios de la década de los años 60's Prier y colb. se interesan por el sarcoma y realizan trabajos de citogenética y requerimientos nutricionales, encontrando que los cariotipos de las células normales ( con 78 cromosomas ) son perfectamente distinguibles de los pertenecientes a células neoplásicas, en las cuales hay un número cromosómico de 59, por otra parte se observó que el metabolismo celular presenta como característica el que se vea afectado por pequeñas cantidades de SH- aminoácidos en cultivos celulares primarios ( 35, 36, 37 ).

En 1968 Johnson y colb. realizan un estudio encaminado a promover el STVC como modelo de cáncer experimental, debido a su fácil manejo en transplatación, a la alta frecuencia de casos en la naturaleza y a su gran porcentaje de regresión espontánea, siendo además muy susceptible a la radio- y quimioterapia, induciéndose la regresión con una baja recurrencia (22, 30, 35 ).

En 1968 también Adams y colb. implantan la primer línea celular del STVC siendo el primer trabajo de estudio de citogenética y morfología sobre estas células en cultivo prolongado, y encuentran que la morfología de las células del STVC in vitro es predominantemente alargada, con algunas células redondas y un número cromosómico de 59 exclusivamente ( 38 ). Otros estudios citogenéticos acerca de estas células son los realizados por Murray y colb. en 1969 y Zarrouck en 1980 empleando ambos biopsias y concordando sus resultados con los de Adams y colb. ( 39, 40 ). Mohanty realiza estudios de morfología a microscopía de luz en 1977, difiriendo de Adams y colb., en el tiempo de confluencia de los cultivos ( 41 ).

Los estudios de ultraestructura en este tumor se realizaron a partir de 1972 con González y colb. en México, los cuales distinguen tres diferentes tipos de células constituyentes, predominando la del tipo morfológico redondo sobre la del tipo fibroblastoide y las células plasmáticas (esta última normal). ( 21 ). Varios estudios de ultraestructura correlacionan la evolución del tumor in vivo con los efectos de la quimioterapia para obtener la regresión, observando que esta neoplasia es notablemente sensible a las drogas anticancerosas ( 22, 42 ). Estudios más recientes realizados por Otomo y colb. (1981) analizan la citología del tumor a partir de biopsias, después de transplatación repetida, encontrando que primero ocurre infiltración linfocitaria y se observa que los linfocitos se

adhieren a la pared de las células del STVC, terminando por destruir a éstas y reabsorbiéndolas ( 43, 44, 45 ).

Adams y colb. (1981) localizan células del STVC que presentan, 3 cromosomas marcadores, uno pequeño submetacéntrico, un gran metacéntrico con constricción secundaria subterminal y otro metacéntrico con constricción secundaria en los dos brazos cortos y largos del cromosoma ( 46 ). Otros investigadores han encontrado diferentes marcadores en cuanto a número y morfología de éstas ( 33, 37, 39, 47, 48, 49, 50 ).

## JUSTIFICACION

La mortalidad en México por tumores malignos no ha tenido cambios significativos en los últimos 20 años, a pesar de todos los esfuerzos realizados, una proporción del 4% sobre el total de de funciones, es decir una de cada veinte registradas se debe al cáncer. La mortalidad por tumores malignos del tejido linfático y de los órganos hematopoyéticos, en el Distrito Federal es de 22.7 por cada 100 000 personas fallecidas. Ocupando este tipo de tumores el cuarto lugar como causa de muerte por tumores malignos ( 51 ).

El sarcoma transmisible venéreo canino constituye un modelo experimental para el estudio del cáncer, por lo que el establecer la línea celular en cultivos celulares permitirá el análisis de los mecanismos de acción de drogas antineoplásicas.

## OBJETIVOS

Establecer la línea celular del Sarcoma Trans  
misible Venéreo Canino en cultivos celulares .

- Caracterizar ultraestructuralmente la morfología de la línea celular.
- Calcular el índice mitótico y la curva de crecimiento celular .
- Demostrar la capacidad de las células de la línea para crecer en agar semisólido .
- Correlacionar la identidad celular por medio de su cariotipo .
- Demostrar la capacidad de las células de la línea para inducir el tumor en un hospedero homólogo susceptible .

## H I P O T E S I S

Sabiendo que las células que componen el Sarcoma Transmisible Venéreo Canino son de origen linfoide y de características morfológicas semejantes a las células linfoides inmaduras ( 21, - 40, 52, 53 ), y que las células neoplásicas humanas derivadas del sarcoma de células redondas han podido ser cultivadas y aisladas en organización monoclonal, por medio de cultivo en agar semisólido ( 16 ). Por estas razones se considera que el Sarcoma Transmisible Venéreo Canino podrá ser cultivado y purificado en su crecimiento monoclonal neoplásico en el sistema de agar semisólido .



---

METODOLOGIA

## M A T E R I A L     Y     M E T O D O

Se obtuvieron biopsias excisionales del tumor venéreo de perros de raza indeterminada con ocurrencia natural del tumor. La toma de la biopsia se realizó en quirófano y colocándose en medio M-199 ( In Vitro S.A.) suplementado con 5% de suero fetal de ternera (GIBCO Berkeley Calif.) y con 2000 U de penicilina y 2 mg de estreptomicina por mililitro de medio, en el cual se mantuvo por una hora, agitando cada 15 min, para eliminarle la sangre infiltrada en el tejido neoplásico.

Cultivo primario

Dentro de una campana de flujo laminar, se pasó la biopsia a una caja Petri (estéril) de 90 mm, con 10 ml de solución salina de Hank's (SSH) eliminándose parte del tejido fibroconectivo con unas tijeras. Se lavó dos veces con SSH y se tomaron dos pequeñas muestras de tejido, una de ellas se fijó en formalina para análisis en microscopio de luz y otra de ellas se pasó a fijador de Karnovsky para su estudio a microscopía electrónica. Posteriormente la biopsia fue pasada a otra caja de Petri con 10 ml de M-199 con 10% de suero fetal de ternera, 2000 U de penicilina y 2 mg de estreptomicina por mililitro. Ahí se disgregó finamente la muestra empleando unas tijeras, y cuando se pudo observar una turbidez en el medio fue colectado con una jeringa de 10 ml y aguja

del número 20. Este medio fue puesto en un tubo de ensaye y diluido 1:10, posteriormente se realizó el conteo y viabilidad celular por medio de la prueba de azul trypan. Las células se cultivaron en botellas de plástico de 50 ml (Costar, Mass) a una concentración de  $2 \times 10^6$  cel/ml en medio M-199 con 20% de suero fetal de ternera, gentamicina (Galen Lab.) 50  $\mu\text{g/ml}$ , estreptomicina (Lakeside) 1  $\mu\text{g/ml}$ , anfotericina (Squibb) 1.25  $\mu\text{g/ml}$ , y suplementado con L-glutamina (G-III SYGMA) 0.30  $\mu\text{g/ml}$  y piruvato de sodio (SYGMA) 0.20  $\mu\text{g/ml}$ , ajustando el pH a 7.2 con  $\text{NaHCO}_3$  al 7.5% y se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  con una atmósfera del 5% de  $\text{CO}_2$  y 95% de aire.

#### Subcultivo

Se llevó a cabo cuando la monocapa celular de las botellas de cultivo fue confluyente, retirándose el medio y lavando las células con solución salina amortiguadora de fosfatos (libre de calcio y magnesio) mantenida previamente a  $37^\circ\text{C}$  en un volumen de la mitad o un cuarto del que tenía de medio. Se agregó una solución de tripsina al 0.1% y verseno al 0.02% a nivel suficiente para cubrir las células y se incubaron por 5 minutos ( 54 ) posteriormente se centrifugó a 130g durante 5 minutos, fue retirada la tripsina y agregados 5 ml de medio para resuspender el botón celular. Se realizó prueba de viabilidad (azul trypan) y conteo por hemocitómetro, para realizar diluciones y mantener la concentración celular de siembra de  $2 \times 10^6$  cel/ml.

#### Ultraestructura

Para la observación en el microscopio electrónico se tomó la muestra de la biopsia y fue cortada en pequeños trozos de aproximadamente  $1 \text{ mm}^3$  (3 a 5 piezas) y se fijó sumergiéndolas en solución

Karnovsky (1% paraformaldehído, 1.25% glutaldehído, pH 7.4, 560 mOsm)(55) durante una hora y media. Se lavó con amortiguador de cacodilatos 0.2 M, por 5 minutos cada lavado y se postfijó en tetraóxido de osmio al 1% en solución de Millonig por una hora a 0-4°C, después se lavó de inmediato con agua para eliminar el exceso de amortiguador y se tñó el bloque con una solución de acetato de uranilo al 2% con agua durante 5 minutos.

Se deshidrató en acetona ( 25,50,95 y 100% ) cada cambio durante 3 minutos y dos cambios en el caso de acetona 100%, luego se infiltró con una mezcla (1:1) de acetona 100% y el medio de inclusión (Araldita 6005 SYGMA) durante media hora a temperatura ambiente, pasándose al medio de inclusión puro, recién hecho en las cápsulas de gelatina desecadas, durante 48 hrs a 60°C. Los bloques fueron cortados en un ultramicrotomo Ultra cut/Reichert-Jung primero a 2  $\mu$ m ( se tñeron los cortes con paragon para identificar las áreas de interés a observar (56)) y posteriormente los cortes fueron de 800 Å, y se montaron en rejillas de cobre (Mesh 200) y teñidos con citrato de plomo y lavados en álcali diluido. Por último se lavaron dos veces con agua destilada y las observaciones se realizaron en un microscopio electrónico Philips EM-300 a 60 kV.

El análisis de células en cultivo se realizó de la siguiente forma: la suspensión celular lograda después del tratamiento con tripsina al cultivo fue centrifugada a 150g durante 5 minutos para después obtener el paquete celular y ser trabajado de la forma ya descrita para la biopsia.

#### Cálculo de la curva de crecimiento e índice mitótico

En cajas de Petri de plástico de 90 mm de diámetro (Falcon Labware Oxnard CA.), se sembraron 4 ml de una suspensión de células del STVC a una concentración de  $1 \times 10^5$  cel/ml, en M-199 enrique-

cido éste con 20% de suero fetal de ternera. Se incubaron a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> tomando este momento como hora cero. A las 24 hrs. se retiró el medio de tres cultivos escogidos al azar y se puso en ellos tripsina al 0.25%, se incubó por cinco minutos, posteriormente se retiró la tripsina, por separado para cada cultivo (asegurándose que hubiera una correcta y completa separación de la monocapa celular). A partir de esta solución se efectuó el conteo y viabilidad celular por azul trypan y hemocitómetro. Se volvieron a escoger al azar otros tres cultivos durante los nueve días subsiguientes, efectuando el conteo celular respectivo. Obtenidos todos los datos se graficaron número de células contra días de cultivo.

Índice mitótico. En cajas de Petri se colocaron antes de la siembra, cubreobjetos en cada una de ellas, posteriormente se sembró la misma concentración celular ya referida. A las 24 hrs., a tres cultivos de éstos se les adicionó colcemida (CIBA Lab. INC.) a una concentración final de 0.2 µg/ml y se incubó por dos horas a 37°C. Luego fue tratado el cultivo con una solución hipotónica (1:9 SSH:agua) durante treinta minutos. Se retiraron los cubreobjetos de la caja y se sumergieron en acético-estanol (1:3) por 10 minutos. Se secó al aire y se tiñó con Giemsa. El índice mitótico se calculó dividiendo el número de mitosis observadas por 1000 células contadas.

#### Cultivo en agar

El cultivo se efectuó empleando M-199 preparado según el cuadro I. Para la preparación de la placa alimentadora, se coleccionaron 15 ml de sangre periférica de un perro clínicamente sano, en una jeringa estéril de 20 ml conteniendo 2 gotas de heparina 1:1000 (Liquamin Sodium "10", Organon INC.). Después de colectada la sangre fue transferida a un tubo de ensayo y se le permitió sedimentarse por una hora o dos a

Cuadro I  
(para 100 ml de medio)

|                                  |         |
|----------------------------------|---------|
| M-199                            | 77.8 ml |
| Suero fetal de ternera           | 20.0    |
| Piruvato de sodio (100mM)        | 1.0     |
| Vitaminas Eagle MEM (100z)       | 0.4     |
| Glutamina Eagle MEM (200mM)      | 0.4     |
| NaHCO <sub>3</sub> (7.5%) c.s.p. | pH 7.2  |

todo es esterilizado por filtración con Millipore 0.45  $\mu$ m .

temperatura ambiente. El plasma conteniendo los leucocitos y plaquetas fue removido con una pipeta Pasteur, y el número de células nucleadas fue contado con un hemocitómetro a contraste de fases.

El medio preparado a razón de 9:1 con agar al 5% (DIFCO-Bactoagar) hervido, logrando una concentración final de 0.5%. El medio fue mantenido previamente a 37°C y el agar fue adicionado a éste a una temperatura justamente abajo del punto de ebullición, posteriormente la mezcla fue enfriada hasta aproximadamente 40°C, a ésta se le adicionaron las células de sangre periférica en plasma a una concentración final de  $5 \times 10^3$  cel/ml. Un mililitro de esta suspensión fue colocado en cada caja Petri de 35 mm - (Falcon Labware. Oxnard CA.), de un total de 10 cajas, y el agar fue solidificado a temperatura ambiente.

Para la preparación de la placa sembrada con células del STVC, se colectaron células de las botellas de cultivo por tripsinización de la monocapa y transferidas a un tubo de centrifuga y agregado suero fetal de ternera en una cantidad equivalente a la de la tripsina. Se centrifugó a 150g por 5 minutos y se retiró el sobrenadante resuspendiéndose en 5 ml de medio preparado. Se realizó conteo y viabilidad celular, posteriormente

el medio fue mezclado a razón de 9:1 con agar al 3% hervido ( con las mismas consideraciones que en la capa alimentadora ) y la suspensión celular fue adicionada a la mezcla, para lograr una concentración celular de  $2 \times 10^5$ . Un mililitro de esta mezcla fue adicionado sobre la subcapa de agar con células alimentadoras preparada de antemano.

Se efectuaron observaciones a los cultivos hasta notar la presencia de colonias de más de 50 células logrando estas observaciones con un microscopio de disección. Se retiraron las colonias con una micropipeta y dispersadas con una solución de tripsina-verseno 0.1/0.02% , resuspendiéndose en medio fresco M-199 con 20% de suero fetal de ternera y posteriormente fueron sembradas en botellas de plástico de 50 ml. ,

#### Observación de cromosomas

Desde el primer pasaje se realizó el estudio citogenético de las células, así como al 3°, 5°, 8°, y 11° pasajes. A una muestra de células preparada para la siembra se incubó por 18 hrs., posteriormente se le adicionó colcemida a una concentración final de  $0.2 \mu\text{g/ml}$  y después de dos horas se trató la monocapa con verseno al 0.05% durante 5 minutos y luego se concentro por centrifugación ( $130\text{g}/10\text{min.}$ ); más tarde fue transferida la muestra a una solución salina hipotónica (1:9 SSH: agua) por un periodo de 30 min , fijándose en acético-etanol (1:3) por 10 min. y se realizaron las preparaciones con técnica de goteo, secándolas al aire y teñidas con Giemsa.

#### Inducción del tumor

A los treinta días después de establecida la línea fue tomada una muestra del cultivo celular y se realizó una suspen-

si3n en SSH a una concentraci3n final de  $5 \times 10^6$  cel/ml, la cual se inocu-  
lo subcut3neamente en perros ( raza indeterminada sin ocurrencia anterior  
del tumor ) en la regi3n inguinal y genital. Fueron realiz3ndose observa-  
ciones cada semana con el fin de detectar crecimiento tumoral en los hos-  
pederos susceptibles.

#### Criopreservaci3n:

L3s c3lulas del STVC fueron colocadas en sus-  
pensi3n para criopreservaci3n, en M-199 suplementado con 50% de suero fe-  
tal de ternera y 10% de DMSO a una concentraci3n celular de  $3-5 \times 10^6$  -  
cel/ml (Espejo R. Apuntes IIBM.UNAM.1983). Dos mililitros de esta suspen-  
si3n se colocaron en criotubos y se enfriaron por una hora a  $0-4^{\circ}\text{C}$ , poste-  
riormente por una hora a  $-20^{\circ}\text{C}$  y por 3ltimo se almacenaron en un tanque  
de nitr3geno l3quido.

Para descongelar la l3nea se retir3 el criotubo del nitr3geno l3-  
quido y se transfirio a un ba3o de agua previamente calentado a  $37^{\circ}\text{C}$ , lo  
m3s r3pidamente posible. Pasados 10 minutos el contenido del criotubo se  
cultiv3 como ya ha sido mencionado.



---

RESULTADOS

## RESULTADOS

Los resultados histológicos obtenidos mostraron que el tumor estaba formado principalmente por dos tipos celulares, uno de células redondas o irregularmente poliedricas de 15 a 30 micrómetros de diámetro, con un núcleo excéntrico redondo a oval y cromatina dispersa, nucleolo prominente y relación núcleo:citoplasma 1:1. El otro tipo celular presente en el tumor tenía una morfología fibroblastoide, con un núcleo alargado, un solo nucleolo y escaso citoplasma. Escasas fibras reticulares fueron vistas entre los grupos de células tumorales. El núcleo fue hiper-cromático y varias mitosis pudieron distinguirse. ( Fig. 1 ).

### Cultivos celulares

Después de veinticuatro horas de incubación la mayoría de las células presentan una morfología redonda y solo ocasionalmente fueron observadas células alargadas. Cultivos de cuarenta y ocho horas mostraban los dos tipos celulares observados en la histología; una fibroblastoide y otra redonda con gran núcleo y abundante citoplasma. En todos los cultivos las células se encontraban adheridas y la pérdida celular fue apreciable. A los tres días de incubación se mostraban grupos o cúmulos de crecimiento los cuales se caracterizaban por estar en el centro de ellos solo células redondas y en la perifería células fibroblas-

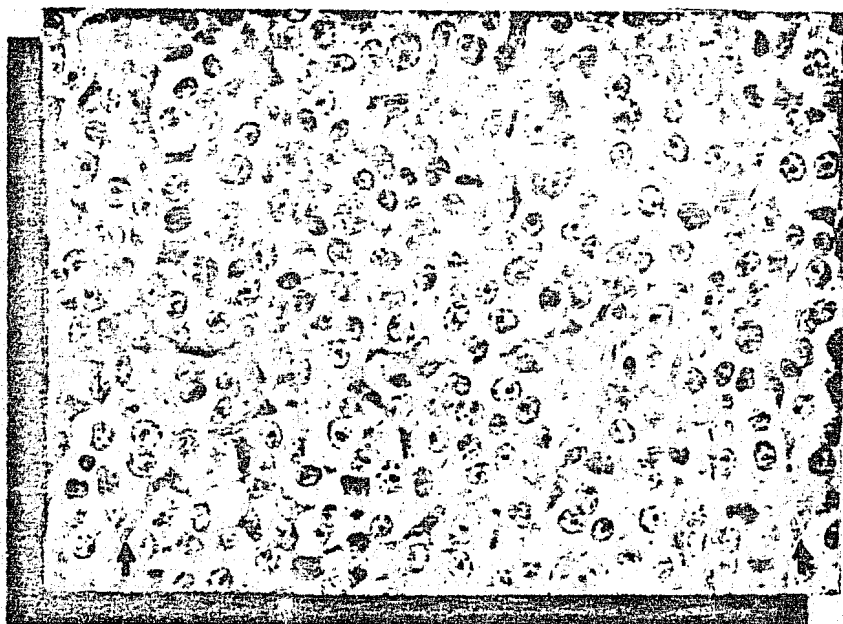


Fig. 1 Histología del STVC. La población de células redondas es predominante, presentando un núcleo prominente, abundante citoplasma y nucleolo excéntrico. Hay pocas cel. fibroblastoides (→). Tinción H&E..250 x

toides. Cuando los cultivos cumplieron una semana de incubación la población celular era predominantemente de morfología fibroblastoide, con áreas de crecimiento esparcidas por toda la superficie de la botella de cultivo. En las áreas de esta en donde no había cumulos de crecimiento las células eran redondas y solo ocasionalmente triangulares ( Fig. 2 ).

Se logró la confluencia en el 85% de los cultivos a los nueve días de incubación, realizandose el primer pasaje (relación 1:3 ). Estos cultivos del primer pasaje se caracterizan por presentar una uniformidad morfológica integrada por células alargadas con las características ya mencionadas. A la sexta semana ( cuarto pasaje ) se pudo observar que la

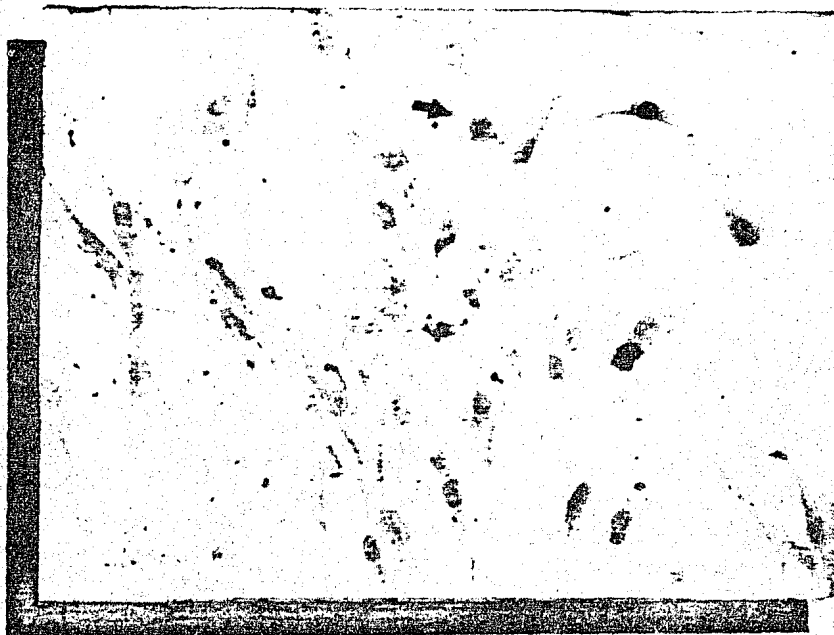


Fig. 2 Cultivo en monocapa del STVC de ocho días de incubación del cultivo primario. Se puede apreciar la morfología fibroblastoide las células con gran núcleo y abundante citoplasma. Persisten algunas células redondas (→). Tinción H&E. 250 x

población celular tendió a perder su característica de crecer en cúmulos o islas, presentando un desarrollo orientado en forma paralela, persistiendo la forma alargada de las células, los bordes de estas no están claramente definidos y su arreglo es compacto ( Fig. 3 ).

Otra de las características de las células en cultivo es la presencia de una muy acentuada vacuolación citoplásmica. ( Fig. 4 ).

Los subcultivos fueron realizados generalmente entre los doce y quince días. Después de veinticinco semanas de establecimiento in vitro: (psj14) los cultivos mostraron un cambio degenerativo, mostrando las células una morfología asimétrica, con extensiones protoplásmicas muy grandes

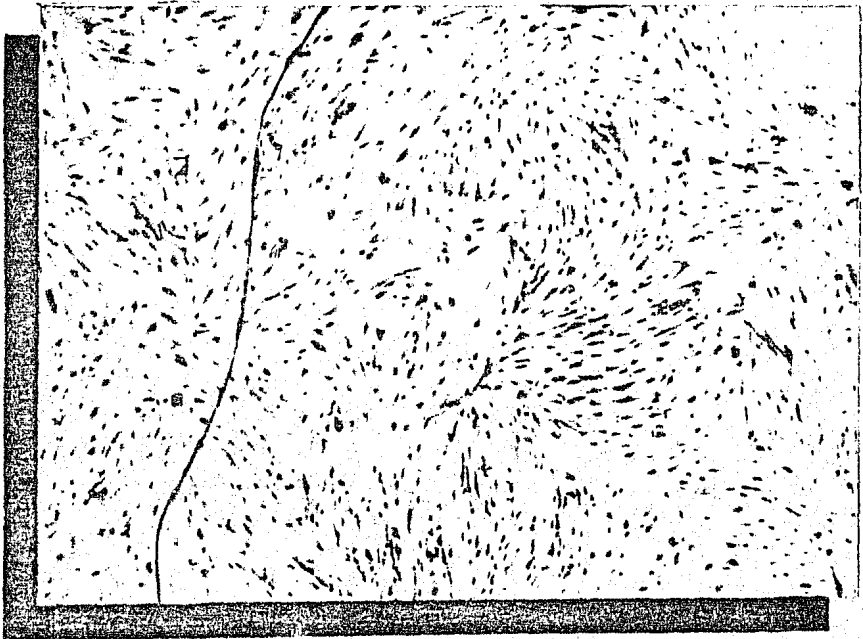


Fig. 3 Cultivo en monocapa del STVC en el 4° Pa  
saje. Crecimiento celular orientado paralela  
mente y persistencia de la morfología alargada. Tinción H&E. 100 x

de una longitud de 7 a 8 veces el tamaño del cuerpo celular; notándose además un desprendimiento de la monocapa celular de la botella de cultivo. Cinco días más tarde se pudo apreciar en la mayoría de los cultivos que solo algunas áreas de las botellas presentaban crecimiento y el resto había degenerado, y estos sitios de crecimiento estaban integrados exclusivamente de células fibroblastoides, que se desarrollaban en forma paralela y con bordes bien definidos.

Después de tres semanas los cultivos lograron la confluencia en un arreglo muy semejante al ya descrito (Fig.3). Apartir del psj.15 los siguientes se efectuaron entre los ocho y diez días a una proporción de 1:5 ya que el arreglo era sumamente compacto.



Fig. 4 Cultivo en monocapa del STVC. en el 4° Pasaje. Células tumorales con un gran núcleo y prominente nucleolo. Vacuolación citoplasmática muy marcada, notese la sobreposición celular. Tinción H&E. 1500 x

A los ocho meses de crecimiento continuo la línea celular presenta un desarrollo vigoroso y caracterizado por una población celular morfológicamente homogénea y con crecimiento en un arreglo paralelo en forma de abanico, así como un bajo decremento del pH del medio aun con una alta densidad celular.

#### Ultraestructura

El primer estudio ultraestructural que se realizó fue de las células tumorales inmediatas a la dispersión y empleadas en el cultivo primario. En la figura 5 es posible apreciar que la célula

redonda se caracteriza por la presencia de un gran núcleo irregularmente redondo a oval, el cual contiene eucromatina uniformemente dispersa y en la periferia nuclear se observa escasa heterocromatina asociada a la membrana. Existe un conspicuo nucleolo excéntrico (algunas ocasiones dos) - que presenta gránulos de cromatina perinucleolar e intranucleolar. Distribuidos en todo el nucleoplasma se observan partículas de apariencia ribosómica que posiblemente sean precursores ribosomales, y también se observan pocos granulos de intercromatina. El citoplasma contiene retículo endoplásmico rugoso (RER) ampliamente distribuido y con numerosos grupos de ribosomas en asociación, a la vez son vistos algunos polirribosomas en forma independiente. Esparcidas en el citoplasma fueron observadas pequeñas mitocondrias ovaladas a redondas, con pocas crestas y diferentes grados de hinchamiento( Fig. 6 ).

Por otro lado también se pudieron observar un número considerable de vacuolas de diversos tamaños, microvellosidades protoplásmicas escasas y de poca talla, y un aparato de Golgi prominente (Fig. 7). En algunos casos se notaron varias estructuras lamelares que en uno de sus extremos dejaban ver pequeños estrangulamientos en los espacios intramembranales de arreglo concéntrico ( Fig. 8 ).

Los fibroblastos normales encontrados en las muestras son perfectamente distinguibles morfológicamente de las células neoplásicas. Estas células normales presentan un núcleo no muy grande, de forma oval que algunas ocasiones presenta profundas invaginaciones y considerable cantidad de heterocromatina formando cúmulos asociados a la membrana nuclear; así mismo las extensiones protoplásmicas son de considerable tamaño y número ( fig. 5 ).

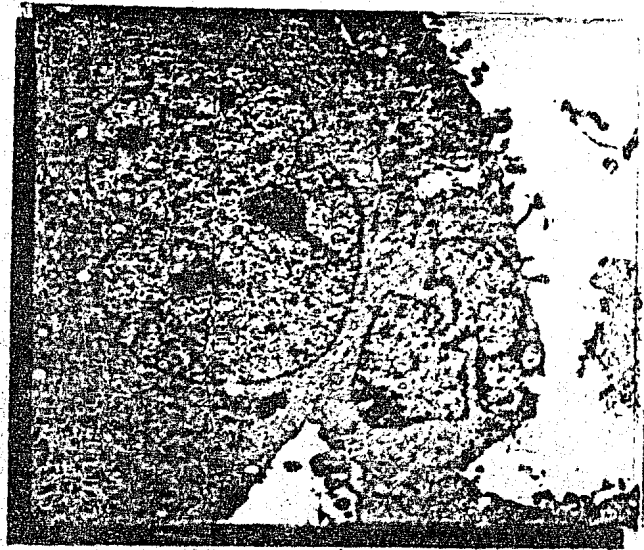


Fig. 5 Célula de STVC (derecha) y célula de tejido fibroconectivo normal (izquierda). Electromicrografía obtenida a partir de células de cultivo primario. Notese el gran núcleo y nucleolo prominente de la célula neoplásica, así como la presencia de pocas microvellosidades en ella. 14 850 x

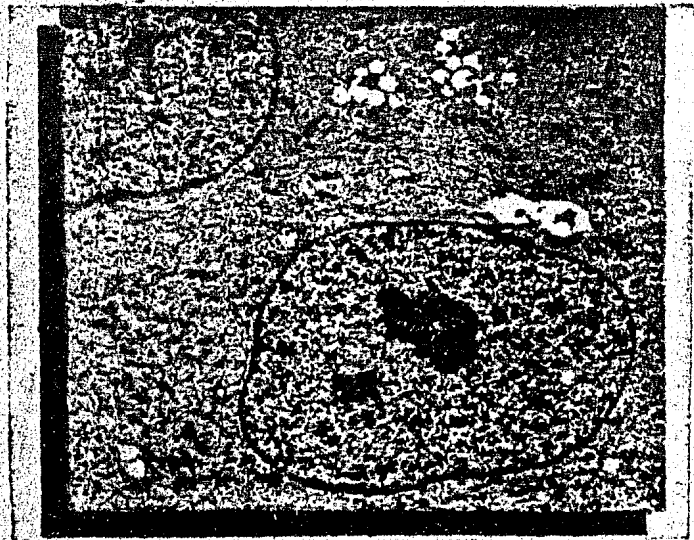


Fig. 6 Células de STVC. Las características de las células redondas pueden ser notadas; núcleo oval, aparato de Golgi, mitocondrias, y ret. endoplásmico rugoso. 14 850 x





Fig. 7 Célula de STVC. Es posible ver un aparato de Golgi prominente así como abundante vacuolación, que en algunos casos presentan inclusiones electrodensas. Algunas partículas de apariencia ribosomal están dentro del núcleo. 29700x



Fig. 8 Alta resolución de parte del citoplasma de una célula de STVC en cultivo primario, en donde se observan estructuras lamelares de arreglo concéntrico. 36 300 x

El segundo estudio ultraestructural se realizó en células de un mes de crecimiento continuo, cuya morfología alargada era la dominante en los cultivos, y ahora muestran una forma circular característica, conferida por el agente dispersante empleado en la separación de estas de la matriz de crecimiento.

Las células de la línea presentan un gran núcleo, con considerable cantidad de heterocromatina tanto asociada a la membrana nuclear como dispersa en gránulos dentro del nucleoplasma. También se aprecia poca eucromatina y persisten partículas de apariencia ribosomal incluidas en el núcleo ( fig. 9 ). El nucleolo es prominente y comunmente se ve disociado en sus fracciones granular y fibrilar; a la vez fueron encontradas algunas estructuras dentro del nucleolo, de forma circular de mayor electrodensidad que el entorno y rodeadas de un halo claro, comunmente llamadas microsférulas (59) ( fig. 10 ). El RER vesicular es muy notorio rodeando la periferia nuclear así como en toda la extensión del citoplasma, también presenta en asociación algunas acumulaciones ribosómicas. Algunos grupos de poliribosomas se encuentran libres en la célula, a la vez de una gran cantidad de mitcondrias de tamaño y forma variable que son facilmente observadas, también hay algunas vacuolas así como grandes inclusiones de tipo lipídico ( fig. 11 ). Es importante hacer notar que están presentes algunas estructuras puntuales de muy marcada electrodensidad, que son artificios provenientes de la técnica de microscopía electrónica y no propios de la célula ó algún contaminante biológico. En la micrografía 11 también se puede notar que el aparato de Golgi ya no es tan prominente y la membrana celular se encuentra caracterizada por un número moderado de extensiones protoplásmicas.

Un hecho que cabe mencionar es el de la presencia de algunas par-

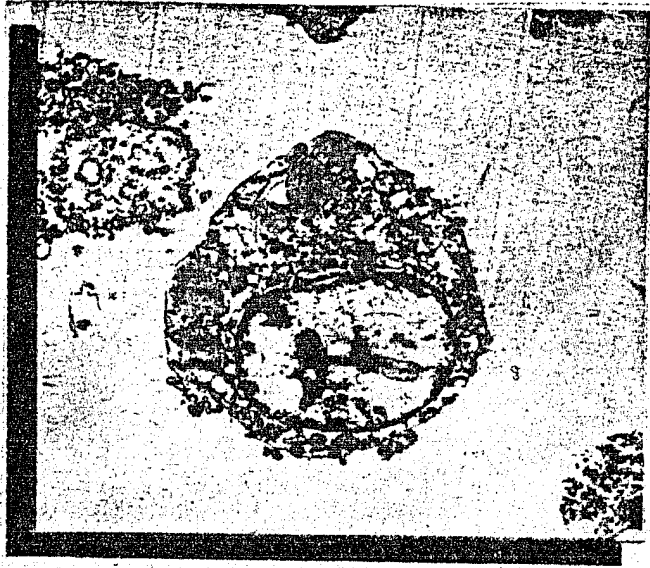


Fig. 9 Célula de STVC. Se aprecian grandes cisternas perinucleares del RER. Note las grandes vacuolas con posible contenido graso y la escasa euromatina. 11715 x



Fig. 10 Nucleolo de una célula de la línea de STVC al 4° pasaje. Se distinguen las fracciones nucleolares granular (g) y fibrilar (f). Note las estructuras compactas rodeadas de un halo claro. 57 750 x

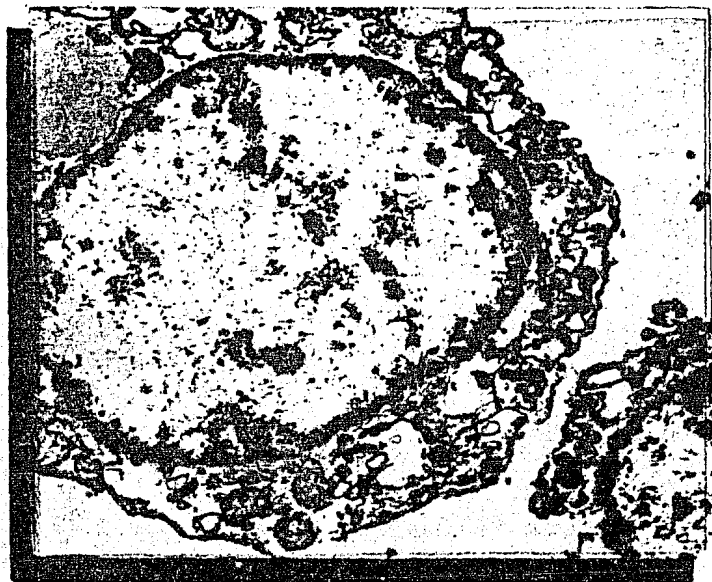


Fig. 11 Célula de STVC. El RER vesicular se encuentra ampliamente distribuido en todo el citoplasma así como rodeando al núcleo. Heterocromatina irregularmente distribuida en la periferia nuclear. 29 700 x



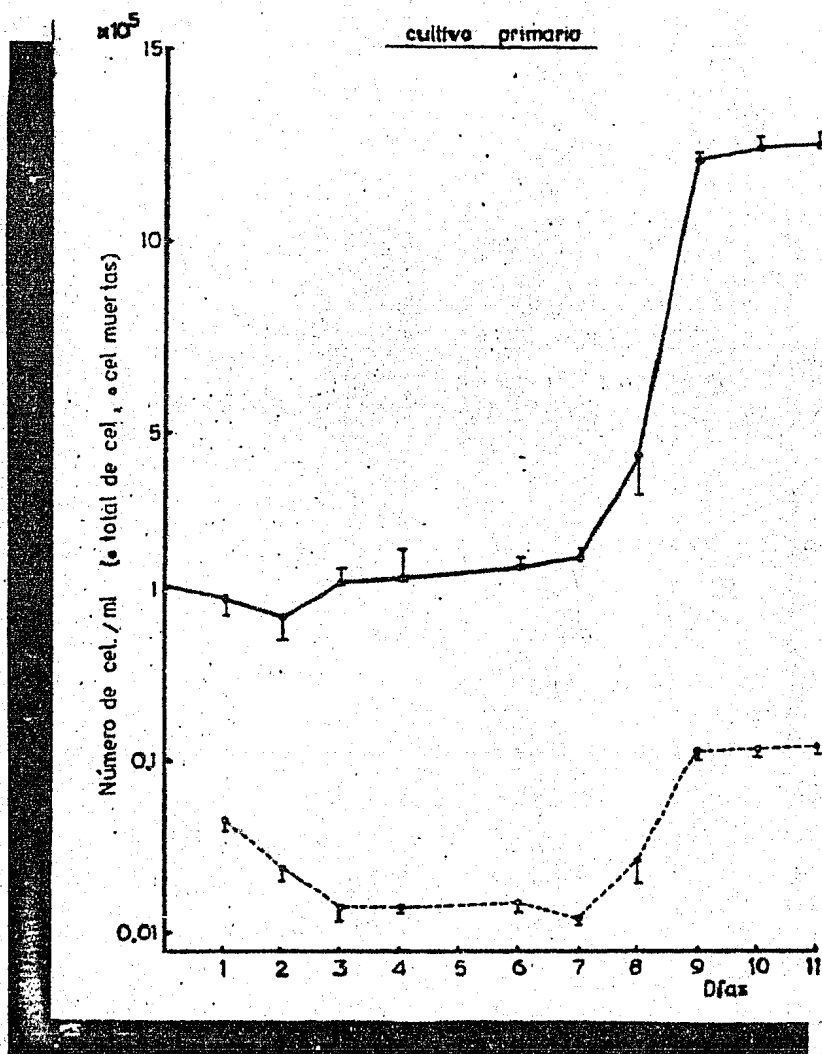
Fig. 12 Gran aumento de un núcleo de una célula de la línea STVC al 4° pasaje, en donde se aprecian 2 partículas de apariencia viral (→). 57 750 x

tículas de apariencia viral ( fig. 12 ) que fueron vistas en varias células analizadas. Las partículas se encontraban dentro del núcleo y mostraban una parte central sumamente electrodensa rodeadas por una parte más clara y envueltas en una estructura con proyecciones en forma radial, estas formas de apariencia viral median entre  $600 - 800 \text{ \AA}$  .

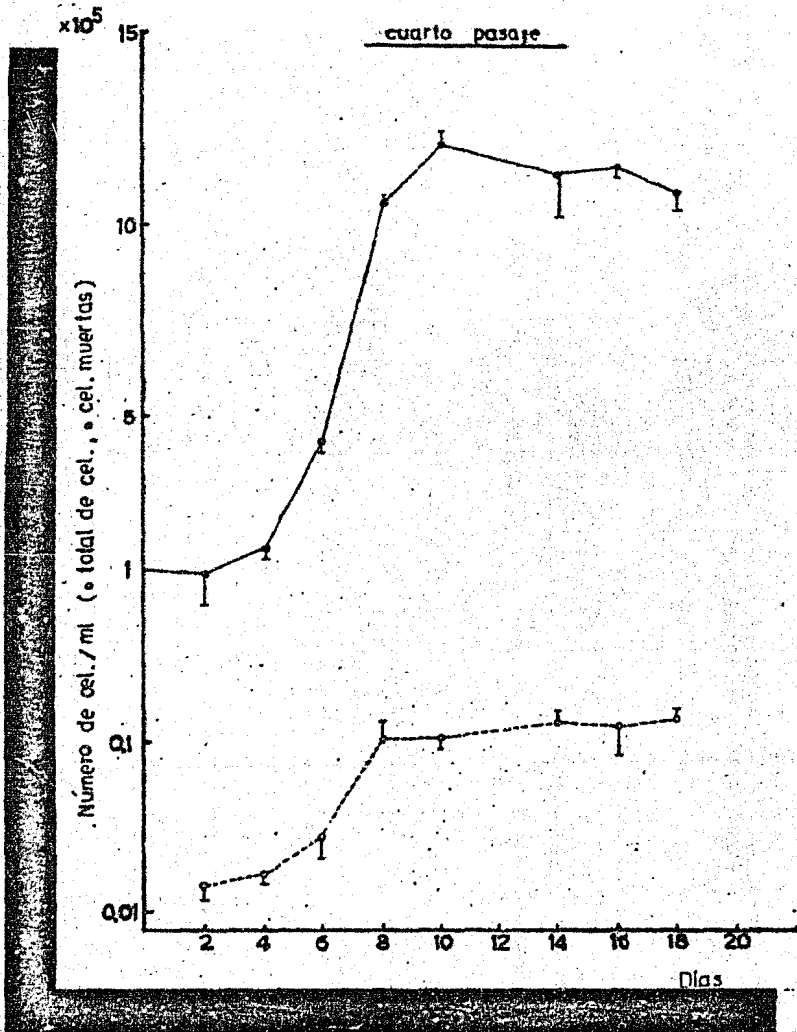
#### Curva de crecimiento

La curva de crecimiento mostrada en la gráfica 1, representa los resultados obtenidos con los cultivos primarios en caja Petri a una densidad inicial de  $1 \times 10^5$  cel/ml; notandose que las células se multiplicaban exponencialmente después de un estadio prolongado de una baja división celular, mostrando inclusive al inicio del experimento un decremento de la población celular sembrada. Después de aparecer la fase exponencial en el día 7 esta se prolonga hasta el día 9, con un tiempo de doblaje o de generación de 13.3 hrs. La curva de crecimiento encuentra una fase de placa o meseta después del noveno día con una concentración celular final de  $12.1 \times 10^5$  cel/ml. La curva de muerte celular encuentra una correlación de 0.71 con respecto a la curva de crecimiento.

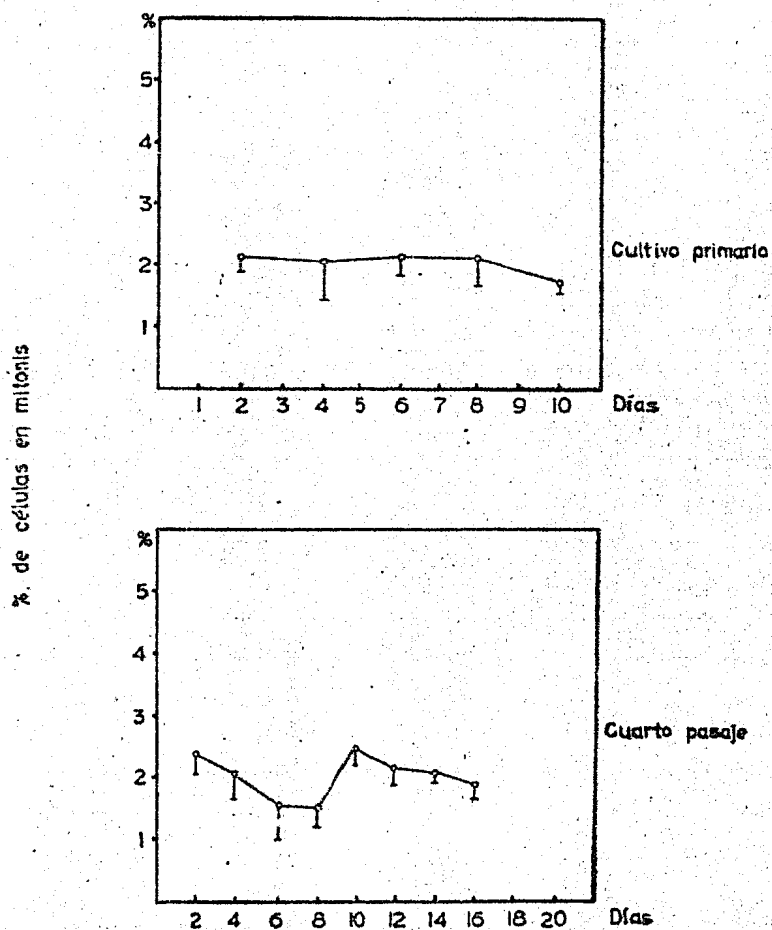
La gráfica 2 muestra la curva de crecimiento calculada con datos obtenidos con cultivos del cuarto pasaje de la línea celular y la metodología fue precisamente la empleada en la curva del cultivo primario. La concentración final de siembra fue de  $1 \times 10^5$  cel/ml, con una variación en el tiempo de efectuar las lecturas ya que el periodo para lograr la confluencia era muy prolongado, y por tanto las lecturas se efectuaron cada cuarenta y ocho horas. En este experimento la pérdida celular no fue tan marcada en el periodo de post-siembra. La fase exponencial en este ca



Gráfica 1 . Curva de crecimiento celular de cultivo primario de STVC. Promedio de los valores del número total de células obtenidos de tres cultivos cuantificados a diario ( ● ). Muerte celular determinada por azul - trypan ( ○ ) .



Gráfica 2 . Curva de crecimiento celular de subcultivo al 4° pasaje de STVC. Promedio de los valores del número total de células obtenidos de tres cultivos cuantificados cada 48 hrs. (•). Muerte celular determinada por azul trypan (o).



Gráfica 3 . Índice mitótico. Cálculo del porcentaje de mitosis, en cultivos primarios y subcultivos del cuarto pasaje de células del STVC .



so se presentó después de un periodo de cuatro días y permaneció activa hasta el decimo día de incubación, con una concentración final de placa de  $12.2 \times 10^5$  cel/ml. El tiempo de doblaje para este modelo se encontró en base a la fórmula de Hayflick ( 59 ) y fue de 40.1 hrs. en la fase exponencial. La curva representante de la pérdida celular en el transcurso del experimento encuentra una correlación de 0.82 con respecto a la curva del número total de células en crecimiento.

El índice mitótico encontrado en los cultivos primarios muestra ( gráfica 3 ) una constancia dentro de un rango muy estrecho, a todo lo largo del periodo de análisis. Los vectores representan la desviación standar de la media ( obtenida apartir de 3 datos en cada lectura ), y esta desviación es mayor en el cuarto día y relacionandolo con la curva de crecimiento corresponde a la fase pre-exponencial, así mismo el menor índice mitótico se observa en la fase de placa o meseta post-exponencial.

En el cuarto pasaje se encuentra una mucho mayor variación en el índice mitótico, en la gráfica 3 se muestra un decremento del porcentaje mitótico en los primeros seis días de incubación de donde los primeros 4 días corresponden a la fase pre-exponencial en su curva de crecimiento correspondiente. Después de esto el índice alcanza un máximo al decimo día que corresponde al inicio de la fase de placa, posteriormente disminuyen-do las mitosis.

#### Estudio cromosómico

El análisis cromosómico de las células tumorales mostró que estas presentan un número modal cromosómico de 59 ( fig. 13 ), observandose dos posibles cromosomas marcadores, un pequeño metacéntrico y otro metacéntrico mediano con una constricción secundaria subter-



Fig. 13 Cromosomas de células del STVC. 5° pasaje.  
Posibles cromosomas marcadores (→). Tinción  
Giemsa . 1250 x

minal.

En el cariotipo ( fig. 14 ) se puede observar que esta integrado por quince cromosomas metacéntricos y submetacéntricos, siendo el resto acrocéntricos. Todos los cromosomas fueron arreglados en base a su tamaño y posición del centrómero.

Como puede observarse en la gráfica 5 el número cromosómico (NC) varía desde 34 hasta 85, predominando las células con 59 y 64-85 cromosomas en donde en este último rango se encuentran NC's de 78, que son los pertenecientes a células caninas normales. Sin embargo estos cariotipos eran semejantes a los normales solo en número más no en morfología, puesto que en ellos se localizaban cromosomas metacéntricos o submetacéntricos e inclusive cromosomas marcadores.

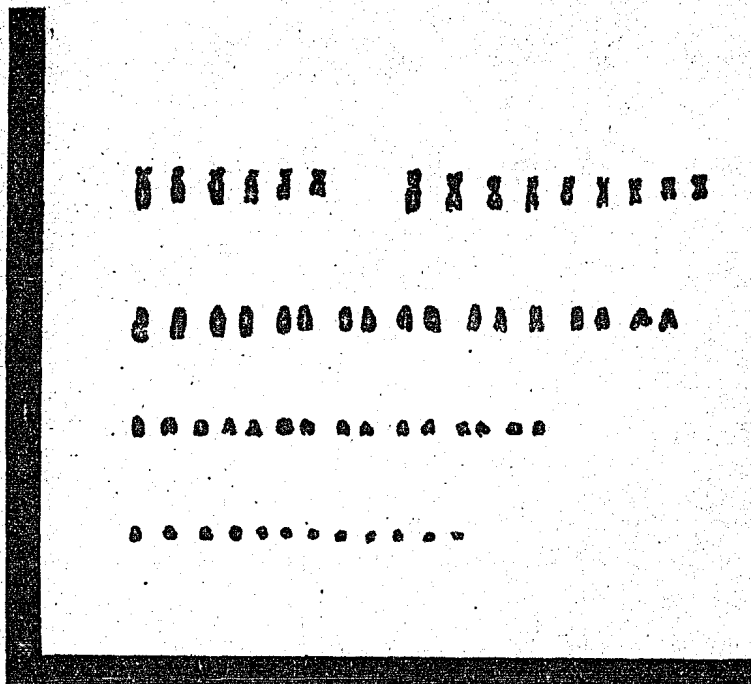


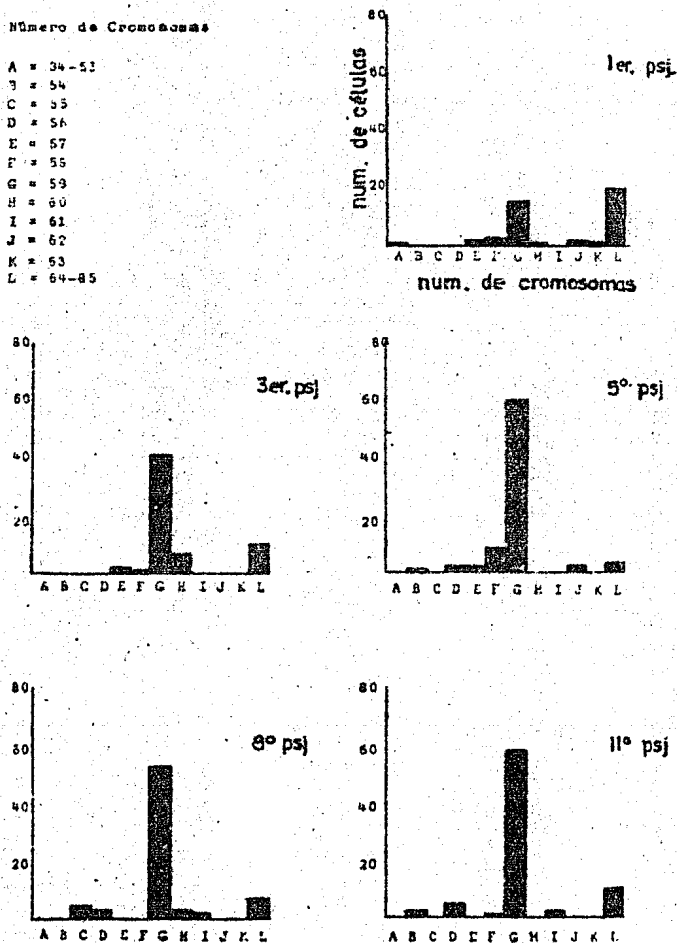
Fig. 15 Cariotipo de una célula del STVC

Al tercer pasaje se encontró una distribución del NC completamente distinta al primer pasaje, el NC modal fue de 59 y la proporción de otros cariotipos fue completamente baja o nula, a excepción del rango 64-85 que incluyó a 17 células del total.

Para el quinto pasaje la distribución anteriormente descrita fue más marcada, el cariotipo con 59 cromosomas fue altamente predominante y en este caso las células con NC normal de 78 fueron solo dos del total a

## Número de Cromosomas

A = 34-53  
 B = 54  
 C = 55  
 D = 56  
 E = 57  
 F = 58  
 G = 59  
 H = 60  
 I = 61  
 J = 62  
 K = 53  
 L = 64-85



Gráfica 4. Variación del número cromosómico de las células del STVC en cultivo, con respecto al periodo de establecimiento de la línea.

nalizado. En el estudio efectuado al octavo y onceavo pasajes se observó que la proporción de células con 59 cromosomas fue muy alta.

En la quinta parte del total de células analizadas durante el período de estudio fue encontrado alguno de los cromosomas marcadores. Estos marcadores fueron principalmente de dos tipos: un cromosoma pequeño metacéntrico perfectamente distinguible de los restantes metacéntricos - por su tamaño y volúmen, y el otro un cromosoma metacéntrico de tamaño me dio con una constricción secundaria subterminal muy característica. La - proporción de estos cromosomas marcadores varió con respecto al tiempo de cultivo ( cuadro 1 ).

Cuadro 1

- NUMERO DE CELULAS EN LAS CUALES APARECEN CROMOSOMAS MARCADORES -

| Cromosoma marcador                           | Pasaje celular |    |    |    |     |
|--|----------------|----|----|----|-----|
|  | 1°             | 3° | 5° | 8° | 11° |
| Metacentrico pequeño                         | 15             | 19 | 12 | 8  | 17  |
| Metacentrico c/constric.<br>sec. subterminal | 7              | 18 | 10 | 15 | 28  |

#### Cultivo en agar semisólido

Al realizar el cultivo en agar suave se obtuvieron colonias de más de cincuenta células después de 14 días de incubación, siendo consideradas solo aquellas colonias que mostraban límites bien definidos y un diámetro de 40  $\mu$ m ( fig. 12 ). Las células provenientes de estas colonias fueron retiradas del cultivo y teñidas con - Wright-Giemsa para su observación a microscopía de luz ( 61, 62, 63 ), lo grandose observar la morfología característica de las células del STVC -

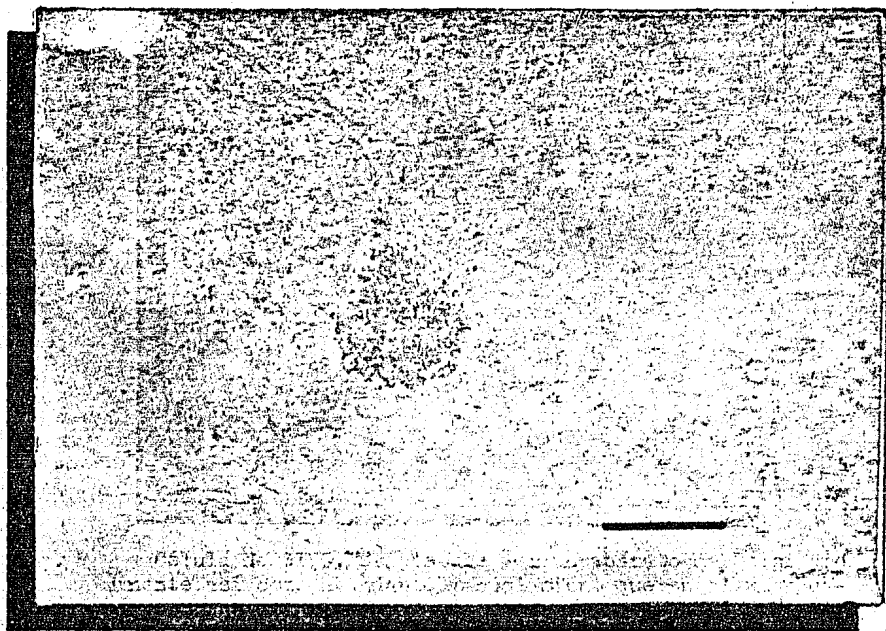


Fig. 15 Colonia de células de STVC en cultivo de agar semi-sólido a 15 días de incubación. La barra representa — 200  $\mu$ m. Contraste de fases.

(células redondas con abundante citoplasma y un gran núcleo excéntrico).

Un hecho importante fue que la muerte celular ocurre generalmente después de treinta días de haber sembrado, ocurriendo durante los primeros siete días de incubación un incremento del número celular progresivo y bastante notorio, encontrando que las células aparecen creciendo una sobre otra hasta formar una masa celular oblonga. Para este caso se tomó como criterio para el conteo, que una colonia de más de cincuenta células su medida era de cuarenta micrómetros.

Las pruebas de estimulación del desarrollo de colonias de STVC en agar semisólido mostraron que el mejor promotor de crecimiento fue la capa alimetadora con leucocitos más plasma humano. ( cuadro 2 ).

Cuadro 2

Numero de colonias de STVC/placa, desarrolladas con diferentes estimulantes.

| Cultivo                | I <sup>a</sup> | II <sup>b</sup> | III <sup>c</sup> | IV <sup>d</sup> |
|------------------------|----------------|-----------------|------------------|-----------------|
| STVC - I <sub>8</sub>  | —              | 53 ± 1          | 88 ± 5           | 120 ± 4         |
| STVC - I <sub>10</sub> | 40 ± 15        | 72 ± 21         | 83 ± 7           | 91 ± 7          |
| STVC - II <sub>3</sub> | —              | 59 ± 7          | 74 ± 2           | 111 ± 12        |
| STVC - II <sub>4</sub> | —              | 39 ± 12         | 101 ± 10         | 115 ± 10        |

a : sin estímulo

b : suero de perro normal

c : capa alimentadora - leucocitos + plasma caninos (  $5 \times 10^3$  cel/ml)

d : capa alimentadora - leucocitos + plasma humanos (  $5 \times 10^3$  cel/ml)

sobrecapa : células de STVC a una concentración de  $2 \times 10^5$  cél/ml

La eficiencia de placa lograda con una concentración inicial de siembra de  $2 \times 10^5$  cel/placa fue de  $0.035 \pm 0.011$  % (niv.sig. 0.01), con capa alimentadora de leucocitos de perro.

A partir de colonias desarrolladas en agar suave de la línea celular, se lograron obtener seis clonas designadas como :

|                            |                            |
|----------------------------|----------------------------|
| STVC - I - A <sub>8</sub>  | STVC - II - A <sub>1</sub> |
| STVC - I - B <sub>3</sub>  | STVC - II - B <sub>2</sub> |
| STVC - I - C <sub>5</sub>  |                            |
| STVC - I - C <sub>14</sub> |                            |

Estos cultivos presentaron un crecimiento semejante entre sí, así mismo como a los ya establecidos en monocapa, caracterizado por la tendencia de las células a adoptar la morfología fibroblastoide a más tardar a

las 48 hrs. de haber sido transferidas a las botellas de cultivo además de presentar un crecimiento continuo durante cuatro meses. El análisis cromosómico de las clonas mostró un número modal de 59 con ausencia de cromosomas marcadores.

### Inducción del Tumor

El trasplante realizado con células provenientes de la línea con un mes de cultivo continuo produjo crecimiento tumoral, por inoculación subcutánea en un perro clínicamente sano.

A los treinta días después del trasplante, la masa tumoral se pudo detectar manualmente, como un nódulo de aproximadamente 2 cm de diámetro del cual se determinó histológicamente que pertenecía a un tumor venéreo canino en formación.

Los intentos posteriores con células provenientes del clon STVC - I - A<sub>8</sub> y de la línea STVC - II (pasaje 10) no produjeron crecimiento tumoral en los hospederos susceptibles.

### Criopreservación

Células de la línea (pasaje 6) fueron congeladas en nitrógeno líquido, siendo descongeladas a los 15 y 30 días después obteniendo un índice de mortalidad del 35% (evaluado por tinción de azul trypan). Las células que lograron crecer después de la congelación presentaron las mismas características morfológicas, cariotípicas y de potencialidad de crecimiento en agar suave, que sus similares no congeladas.

Posteriormente a los ocho meses de cultivo continuo todos los cultivos pasaron a ser almacenados en nitrógeno líquido.



---

DISCUSION

## DISCUSION

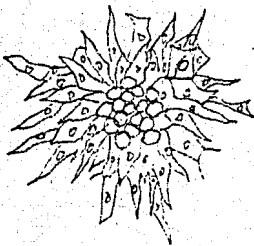
Las características histológicas de las células pertenecientes al STVC observadas en este estudio son similares a las previamente descritas por algunos investigadores ( 19,23,24,26,27,28,40, 41,42,46,64,65 ).

Se observó en los cultivos una completa confluencia de la monolapa celular a los 10 días de haberse sembrado, en contraste con el estudio de Adams y colb. ( 39 ) los cuales no lograron la confluencia hasta pasadas tres semanas después de la siembra, atribuyendo este retraso a las irregularidades del envase de cultivo. Sin embargo los resultados de este trabajo de acuerdo con Mohanty y colb. ( 42 ) indican que la superficie del vidrio no es el factor decisivo; ya que existen otros factores como la concentración de células viables, células derivadas de tumores en un estado activo de crecimiento, tumores con una mayor cantidad de células del tipo requerido para el estudio y pocas células de tejido fibroso, y tumores con muy baja reacción inflamatoria, degenerativa y necrótica, que producen este efecto.

La presencia de únicamente células redondas con abundante citoplasma en la suspensión celular antes de la siembra, un incremento de la población de células fibroblastoides en los cultivos y una disminución de la población de células redondas, así como el notorio aumento de la canti

dad de citoplasma en las células fibroblastoides sugieren que dichas células alargadas proceden del desarrollo de las células redondas. En cultivos del cuarto pasaje en adelante la población celular es estrictamente de células alargadas. Observaciones semejantes han sido reportadas de cultivos de células del tumor venéreo canino in vitro ( 24,39,42,49 ).

La pérdida de inhibición de contacto en el desarrollo celular fue muy marcada principalmente a partir del cuarto pasaje ( un mes de cultivo ) observandose islas de crecimiento distribuidas por toda la superficie de la botella de cultivo, característica propia de células cancerosas ( 2,9,10,11,66,67 ). Estas islas de crecimiento presentaban en su interior células de morfología redonda y alrededor de estas, células típicamente fibroblastoides.



Contrariamente a lo reportado por Adams et al ( 39 ) no se encontró una mezcla morfológica en la población celular en los cultivos a largo plazo. A los siete meses de cultivo continuo la población celular fue exclusivamente de células alargadas, aun que en ninguno de estos cultivos ni en primarios , se realizó clonaje de células redondas como ellos mencionan que realizaron. A pesar de que algunos campos al microscopio se observaron varios elementos redondos, estos se consideraron como células en proceso mitótico por su baja proporción dentro de la concentración celu

lar presente ( 1, 14 ).

Las dos líneas celulares ( STVC-I y STVC-II cada una de ellas de diferente donador) logradas en este estudio crecieron vigorosamente en M-199 suplementado con 20% de suero fetal de ternera, siendo este último - primordial para su adecuado desarrollo como lo hicieron notar Prier et al ( 36 ) y Adams et al ( 39 ).

Así mismo en contraste con los histiocitomas caninos, cuya población celular es usualmente monomórfica ( 68 ), el tumor venéreo como ya se mencionó su población es predominantemente pleomórfica ( 25,27,41 ).

El análisis ultraestructural de las células del tumor en cultivo primario fue muy similar con los estudios realizados con tumores en diferentes estados de evolución ( 21,26,43,46,65,69 ), sin embargo a diferencia de Kennedy y Yang ( 65 ) no se encontró en este estudio, colagena extracelular, ni fibras reticulares en asociación con las células redondas, lo cual les hizo sugerir que las células redondas pueden diferenciarse hacia células fibroblastoides conforme se incrementa la masa tumoral.

La caracterización ultraestructural encontrada por estos autores ( 65 ), para tumores de catorce días concuerda con la observada aquí: núcleo conteniendo pequeñas cantidades de heterocromatina periférica, con eucromatina distribuida uniformemente en todo el núcleo, y un nucleolo - conspicuo característico de una célula de gran metabolismo ( 60,65 ). Algunas de las variaciones en las características celulares reportadas en la literatura con respecto a las encontradas en el cultivo primario se deben posiblemente a los cambios degenerativos del periodo de regresión (26) estos cambios consisten en una disminución de la cantidad y vacuolación del retículo endoplasmico rugoso, hinchamiento y vacuolación de las mitocondrias, agrupamiento de cromatina nuclear y un ensanchamiento del espa-

cio perinuclear

En las células analizadas después de un mes de cultivo continuo se observaron claramente las características mencionadas anteriormente, encontradas en tumores en proceso involutivo ( 71,72,73 ), Lo que hace suponer que la célula de STVC sufrió cambios morfológicos apreciables en su proceso de estabilización en los cultivos in vitro.

En este estudio se apreciaron en algunas células, partículas de apariencia viral como las descritas por Ajello ( 69 ), Lombard y Cabanie ( 30 ), Adams et al ( 39 ) quienes reportan la presencia de partículas virales del tipo C discutiendo que son de origen incidental. González et al ( 21 ) encuentran partículas intracitoplásmicas, apoyando a Adams con respecto a su origen. Cockeill et al ( 26 ) y Kennedy et al ( 65 ) encuentran estas partículas y además un arreglo lamelar. Gross ( 74 ) sugiere que el STVC puede ser inicialmente inducido por un virus, pero que la expresión viral no es requerida para el mantenimiento de las características de la neoplasia, ni para su transmisión. Es poco probable que las partículas de apariencia viral encontradas en el presente estudio, hayan infectado a las células de la línea durante el cultivo de estas ( 75, 76, 77 ) ya que como se ha mencionado, partículas semejantes son localizadas en el tumor in situ ( 21,30,65,69,74 ).

A diferencia de Kennedy y Yang ( 65 ), tampoco en los cultivos de un mes se observó producción de colágena intracitoplásmica.

El estudio cinético de la línea mostró una variación en la curva de crecimiento empleando células de cultivo primario y la realizada con células al 4° pasaje. Las primeras mostraron un retraso en la producción de la fase exponencial de desarrollo, e inclusive una gran pérdida celular en los primeros días de incubación; esta característica fue encontra-

da por Ronot et al ( 78 ) mencionando que el número de células inactivas para el ciclo celular contadas en la fracción de crecimiento, fue alta en el cultivo primario, explicando esto el gran retraso en el periodo de este tipo de cultivo. Además los análisis de flujo citométrico de ADN obtenidos por métodos matemáticos demuestran que el número de células en  $G_0 \rightarrow G_1$  se incrementa durante el cultivo. En el análisis de células de STVC del cuarto pasaje desapareció casi por completo este retraso.

En las curvas de pérdida celular se encontró un alto índice de correlación con las curvas de crecimiento ( 0.71 y 0.82 para el cultivo 1° y 4° pasaje respectivamente ), similares a lo encontrado por Woo et al ( 79 ) para una línea celular derivada del linfoma de Burkitt. La densidad final de desarrollo fue semejante en ambos estudios (  $12.1 \times 10^5$  y  $12.2 \times 10^5$  cel/ml respectivamente ) después de 10 a 12 días de incubación.

El índice mitótico ( IM ) observado para el cultivo primario, no mostró gran variación en el transcurso del análisis, tan solo se nota un incremento de mitosis en los días previos al surgimiento del desarrollo exponencial. Por otro lado el IM calculado para el cuarto pasaje se observaron algunos hechos; el menor índice correspondió a los días previos y propios de la fase exponencial, y el máximo cuando se ha logrado la densidad final de desarrollo en los cultivos. Estos datos son similares a los reportados por Woo et al ( 79 ) para la línea celular linfóide CONCEPTION.

En el estudio del cuarto pasaje se prosiguieron los conteos celulares después de presentada la fase de crecimiento exponencial ( fase meseta ) con el objeto de determinar si realmente se detenía el desarrollo o solo era momentáneo, se observó que no existe más proliferación celular, y aunque no se aprecia pérdida celular si notamos un decremento continuo en el índice mitótico correspondiente, sugiriendo esto que la concentra-

ción final de siembra reportada es la máxima proliferación celular que puede alcanzar la línea celular del STVC en estas condiciones.

El análisis cromosómico del tumor venéreo canino aquí reportado muestra características similares en términos de número cromosómico, frecuencia de cromosomas metacéntricos e incidencia de cromosomas marcadores con respecto a otros estudios en varias regiones del mundo ( 33,38,40,47, 51 ).

Las características cariotípicas de las células cultivadas del STVC a largo término fueron: número cromosómico modal de 59 y 15 cromosomas entre sub- y metacéntricos, así como la presencia de dos cromosomas marcadores perfectamente detectables y similares a los observados en otros estudios ( 33,40,47,51 ).

Sin embargo los cromosomas marcadores requirieron una consideración especial, ya que en algunos estudios lo reportado en ellos no correspondió precisamente a lo encontrado aquí. Por ejemplo Adams et al ( 47 ) reportan la presencia de tres cromosomas marcadores ( $CM_g$ ), dos de los cuales coinciden con lo aquí reportado, pero encuentran uno más, metacéntrico grande con constricción secundaria subterminal en ambos brazos, que presentaba la tendencia a desaparecer conforme envejecía la línea celular. El  $CM$  pequeño presentaba la misma tendencia, mientras que por el contrario el  $CM$  con la constricción subterminal única, se hacía más frecuente conforme envejecía la línea.

En nuestro estudio la frecuencia del metacéntrico pequeño mostró una persistencia casi uniforme a lo largo del estudio, no así con la frecuencia del  $CM$  con constricción secundaria subterminal, que mostró un comportamiento muy similar a lo encontrado por Adams y colb ( 47 ).

Por otro lado Thurburn et al ( 33 ) localiza  $CM_g$  acrocéntricos,

con constricción secundaria en tumores venéreos de perros de Jamaica, Oshimura et al ( 51 ) encuentra dos pequeños metacéntricos y un pequeño submetacéntrico. Los cromosomas marcadores reportados por otros investigadores incluyen un gran submetacéntrico con heteropicnosis y un brazo muy largo, y varios metacéntricos perfectos, tanto pequeños como grandes ( 25,40,50 ). No obstante la amplia distribución y frecuencia de aparición, la naturaleza y función de los cromosomas marcadores permanece poco clara.

Concerniente a los mecanismos de transformación cromosómica se ha sugerido que el incremento del número de cromosomas metacéntricos se debe a una posible fusión centrica ( 13,14,50 ).

Se ha encontrado que el número de brazos cromosómicos en las células del STVC es sumamente semejante al observado en células normales, la reducción en su número cromosómico ( hipodiploide ) no se ve acompañada por su disminución equivalente en el contenido de ADN ( 47 ). La similitud en el modelo de bandeado, reportada para varios elementos metacéntricos, entre tumores primarios y transplantados estrechan la idea de una posible fusión centrica ( 51 ).

Las células que lograron desarrollarse en cultivos de agar suave presentaron las características morfológicas anteriormente reportadas ( 27,39,42 ) para células redondas que integran el STVC. El tiempo para obtener colonias de más de cincuenta células es comparable al obtenido en trabajos que estudian el desarrollo en agar suave de diferentes patologías de origen linfoide ( 16,80,81 ).

El desarrollo celular se ve sumamente afectado por la presencia de factores promotores de crecimiento, como el suero procedente de la misma especie y de la placa alimentadora conteniendo células productoras de estimulante del crecimiento ( en este caso leucocitos ) ( 18,82 ).



De las series de cultivo realizadas, en ausencia de algun estimu-  
lante solo una de ellas presentó desarrollo ( cuadro 2 ) y una eficiencia  
de placa muy baja (0.02%). De las series estimuladas la que presentó una  
mayor respuesta fue la estimulada con leucocitos más plasma humanos. Pike  
y Robinson ( 16 ) obtienen los mejores resultados de crecimiento en agar  
suave de células linfoides, con capa alimentadora conteniendo leucocitos  
más plasma humano, no así con cada uno de ellos por separado. Se ha obser-  
vado que estas células alimentadoras son capaces de producir algun tipo  
de sustancia o factor que promueve el desarrollo celular ( 83,84,85,86 ),  
estos factores estan presentes en el plasma ( 82 ), y al no aislar de este  
los leucocitos ( ni plaquetas ) propiciamos el suministro de una produc-  
ción de este o estos factores ( 16 ). Estas sustancias promotoras del cre-  
cimiento celular presentan algunas similitudes funcionales con hormonas  
como la insulina ( 83, 85 ).

En el estudio se emplearon perros donadores de plasma, clínica-  
mente sanos y que no hubieran presentado la neoplasia anteriormente, para  
evitar la presencia de anticuerpos que interfieran con el desarrollo en el  
agar ( 87,88 ).

Una observación importante fue el rechazo de tipo humoral por par-  
te del hospedero, hacia el tumor venéreo ( 89 ), además de la respuesta me-  
diada por células ya observada anteriormente durante el periodo reconocido  
como involución o regresión espontánea ( 44,46 ).

En cuanto a la clonación de la línea celular esta produjo pobla-  
ciones, muy semejantes, esto comprobado en base a los estudios cromosómi-  
cos y citológicos ( 47 ). Estas células presentaban características de cre-  
cimiento similares a los cultivos celulares ya establecidos ; ante estas  
razones y en base a los postulados de Hamburger y Salmon ( 17, 47, 90, 91 )

acerca del origen clonal de las colonias en agar suave, se sugiere que las colonias aquí obtenidas presentan las características de una población celular de origen monoclonal.

Una peculiaridad del tumor venéreo canino es su relativamente fácil desarrollo por trasplante a un organismo homólogo u hospedero genéticamente relacionado ( 19,28,35,45,46,65,92,93,94 ). Sin embargo en el presente trabajo solo se logró obtener un desarrollo tumoral en un perro susceptible, por inoculación subcutánea; los posteriores intentos no tuvieron éxito. Situación semejante encontró Adams y colb. en 1968 y 1961 ( 39,47 ) los cuales fracasaron en sus intentos de producir el tumor venéreo canino por inoculación de células cultivadas in vitro en perros susceptibles, empleando inoculaciones intravenosas, subcutáneas e intraperitoneales, logrando solo un desarrollo tumoral por inoculación de dichas células en la cámara anterior del ojo de un perro, obteniendo una masa tumoral a los diez días posteriores al trasplante, sugiriendo al igual que Paul ( 95 ) y Southam ( 96 ) que por alguna característica aun no conocida, varias líneas celulares establecidas no producen crecimiento tumoral por reinoculación en un hospedero homólogo. Más recientemente Adams et al ( 47 ) lograron el crecimiento tumoral a partir de su línea celular, en hospederos heterólogos inmunosupresos. Epstein et al ( 64 ) menciona que la fácil homotransplantabilidad del tumor venéreo canino no es debida enteramente a la constancia y estabilidad de su singular cariotipo, sino más bien como consecuencia de un incremento de la resistencia de las células del tumor espontáneo a la respuesta del hospedero isoinmune, característica que no ha sido reportada en células del tumor venéreo canino cultivadas in vitro.

---

CONCLUSION

## C O N C L U S I O N E S

En el presente trabajo se encontro que las células del sarcoma transmisible venéreo canino in vitro tienden a perder la inhibición por contacto, formando agrupamientos o apilamientos típicos de células tumorales y células transformadas, siendo la morfología de estas en cultivos a largo termino (8 meses) fibroblastoide con abundante citoplasma y con características ultraestructurales muy semejantes a las ya observadas en células alargadas predominantes en el STVC en proceso de involución. Se observo la persistencia del número cromosómico modal de la neoplasia (59 - cromosomas) a través del cultivo in vitro, así como el periodo de tiempo de doblaje de la población celular (40.1 hrs).

Con la técnica de agar semisólido, empleada en el crecimiento de células tumorales de origen linfoide, se logró demostrar que las células del STVC se reproducen en un desarrollo monoclonal, con una eficiencia de placa de  $0.035 \pm 0.011\%$  con una capa alimentadora de leucocitos de perro y que - las células integrantes de dichas colonias conservan sus características cariotípicas y morfológicas, y pueden posteriormente seguir desarrollandose sobre una matriz de vidrio. La capacidad de las células de la línea para - producir el tumor en un hospedero homólogo susceptible, no quedo completamente dilucidada .

**BIBLIOGRAFIA**

---

## B I B L I O G R A F I A

- 1 Willmer E.N. (edt) 1965 Cells and tissues in culture. vol. I y II. Academic press London.
- 2 Fogh J. (edt) 1975 Human tumor cells in vitro. Plenum press New York.
- 3 Mulligan R.M. 1951 Syllabus of human neoplasm. Lea & Febige Philadelphia.
- 4 Stulberg C.S., Coriell L.L., Kniazeff A.J. y Shannon J.E. 1970 The animal cell culture collection. En Advances in tissue culture In vitro. Waymouth C. edt. vol.5 The Williams & Wilkins Co. Baltimore p. 1 - 11
- 5 García G.G. 1981 El canceroso. El cáncer. Policromía. México D.F.
- 6 Hamm A.W. 1969 Histology. 6 th. edc. J.B. Lippincott . Philadelphia .
- 7 Paul J. 1965 Cell and tissue culture. E & Livingstone LTD. 3th.end. London.
- 8 Easty G.C. y Easty D.M. 1976 Scientific fundations of oncology . Yearbook Publ. Chicago.

- 9 Lamerton L.F. y Fry R.J.M. 1963 Cell proliferation. Blackwell scientific publication. Oxford. p. 18-25
- 10 Littlefield J.M. 1976 Variation, senescence and neoplasia in cultured somatic cell. Cambridge, Mass.
- 11 Dipaola J.A. y Popescu N.C. 1976 Relationship of chromosome changes to neoplastic cell transformation. Amer.J. Pathol. 85 : 709 - 715
- 12 Harris R.J. 1964 Cytogenetics of cell in culture. Academic press. N.Y.
- 13 Ishihara T., Moore C.E. y Sandberg A.A. 1962 The in vitro chromosome constitution of cells from human tumor. - Cancer Res. 22 : 375 - 378
- 14 Sandberg A.A., Takagi N. y Kato H. 1968 Cytogenetic studies of normal y neoplastic cell in vitro. En: The proliferation and spread of neoplastic cells. (The University of Texas M.D. Anderson Hospital and Tumor Institute at Houston. 21st. Annual Symposium on Fundamental Cancer Research). The Williams & Wilkins Co. p. 99 - 109
- 15 Bittar E. 1964 Cell pH. Butterworths Eds. Washington.
- 16 Pike B.L. y Robinson W.A. 1970 Human bone marrow colony growth in agar-gel. J.Cell.Physiol. 76 : 77 - 86
- 17 Hamburger A.N. y Salmon S. 1977 Primary bioassay of human tumor stem cells. Science 197 : 461
- 18 Marsh J.C., Levitt M. y Katzenstein A. 1972 The growth of leukocyte colonies in vitro from dog bone marrow. J.Lab Clin.Med. 79 : 1041 - 1048

- 19 Stewart H.L., Snell K.C. y Schieler S.M. 1955 Transplantable and transmissible tumors of animals. Sect.12 fasc. 40. Armed Forces Institute of Pathology, Washington D.C.
- 20 Nomenclature of neoplastic disease 1970 Department of anatomical pathologic. The University of Texas. M.D. - Anderson Hospital and Tumor Institute of Houston. Texas Medical Center. p. 58 - 71
- 21 González A.A. y Hernández J.P. 1972 An electron microscopy study of ten cases of canine transmissible venereal tumor. Patología 10 : 113 - 124
- 22 Hernández J.P., González A.A. y de la Vega C. 1973 Ultrastructural and histochemical pattern of regressin canine venereal lymphoma after cyclophosphamide treatment. J.Natl.Cancer.Inst. 51 : 1187 - 1192
- 23 Rust J.H. 1949 Transmissible lymphosarcoma in the dog. J.Am.Vet.Med.Assoc. 114 : 528 - 537
- 24 Bloom F., Paff G.H. y Novack C.R. 1951 The transmissible venereal tumor of the dog. Studies indicating that the tumor cells are mature end cells of reticulo-endothelial origin. Am.J.Pathol. 27 : 119 - 127
- 25 Brown N.C. 1981 Transmissible venereal tumor in the dogs California Vet. 35 : 6 - 18
- 26 Cockeill J.M. y Seasley J.N. 1975 Ultrastructural characteristics of canine transmissible venereal tumor at various stages of growth and regression. Am.J.Vet. Res. 36 : 677 - 683



- 27 Duncan J.R. y Prsse K.W. 1979 Cytology of canine cutaneous round cell tumors. Mast cell tumor, histiocytoma, lymphosarcoma and transmissible venereal tumor. - Vet.Pathol. 16 : 673 - 681
- 28 Cohen D. 1974 The mechanism of transmission of the transmissible venereal tumor of the dog. Transplantation 17 : 8 - 19
- 29 Parejo J.S. 1970 Estudio experimental de la contagiosidad del linfosarcoma de Sticker. Arch.Zootechnia. 19 : 167 - 171
- 30 Lombard C. y Cabanie P. 1968 Le sarcome de Sticker. Rev.Med.Vet. 119 : 565
- 31 Ndiritu G.G., Mbowa S.W. y Sayer P.D. 1977 Extragenitally located transmissible venereal tumor on dogs. Mod.Vet. Prac. 58 : 940 - 951
- 32 McCleod C.G. y Lewis J.E. 1972 Transmissible venereal tumor with metastasis in three dogs. J.Am.Vet.Med.Assoc. 161 : 199 - 208
- 33 Therburn M.J., Gwynn R.V.R., Ragbeer M.S. y Lee B.I. 1968 Pathological and cytogenetic observations on the naturally occurring canine venereal tumor in Jamaica (Sticker's tumor). Br.J.Cancer. 22 : 720-727
- 34 Moulton J.E. 1961 Tumors of the urogenital system and mammary gland. En: Tumors in domestic animals. Berkeley CA. University of California Press. p. 164 - 185
- 35 Johnson R.E., Cameron T.P. y Kinard R. 1968 Canine Lymphoma as a

- potential model for experimental therapeutics.  
Cancer Res. 23 : 2562 - 2568
- 36 Prier J.E. 1963 Nutritional requirements for cultivation of the canine transmissible sarcoma cell. Cancer Res. 23 : 695 - 699
- 37 Prier J.E. y Johnson J.H. 1964 Malignancy in a canine transmissible venereal tumor. Jpn.Am.Vet.Med.Assoc. 145 : 1092 - 1098
- 38 Prier J.E. 1966 Chromosome patten of canine transmissible sarcoma cell in culture. Nature 12 : 724 - 727
- 39 Adams E.W., Carter L.P. y Sapp W.J. 1968 Growth and maintenance of the canine venereal tumor in continuous culture. Cancer Res. 28 : 753 - 759
- 40 Murray M., James Z.H. y Martin W.B. 1969 A study of the cytology and karyotype of the canine transmissible venereal tumor. Res.Vet.Sci. 10 : 565 - 568
- 41 Zarrouck K. 1980 Transmissible venereal tumor of the dogs (Sarcoma Sticker's). Point Vét. 11 : 73 - 80
- 42 Mohanty G.C. y Rajya B.S. 1977 Growth and morphological characteristics of canine venereal tumor cell in vitro Vet.Pathol. 14 : 420 - 426
- 43 Cabanie P., van Haverbeke G. y Magnol J.P. 1973 Etude ultrastructurale du sarcoma de Sticker du chien á différents stades de son evolution. Revue Med.Vet. 124 : 1239 - 1243
- 44 Chandler J.P. y Yang T-J. 1981 Canine transmissible venereal sarcoma: distribution of T and B lymphocytes in -

- blood draining, lymph nodes and tumours at different stages of growth. Br.J.Cancer 44 : 514 - 519
- 45 Koike T., Kudo T., Otomo K. y Sekai T. 1979 Successively transplanted canine transmissible sarcoma. Gann 70 : 115 - 119
- 46 Otomo K., Koike T., Kudo T. y Sekai T. 1981 Histological and ultrastructural findings of regressing canine transmissible venereal tumor after repeat transplantation. Jpn.J.Vet.Sci, 43 : 823 - 829
- 47 Adams E.W., Carter L.P. y Sapp W.J. 1981 Cytogenetic observations on the canine venereal tumor in long-term culture. Cornell Vet. 71 : 336 - 341
- 48 Bansur P.K. y Gilman J.P. 1966 Chromosomal studies in canine lymphosarcoma. Cornell Vet. 56 : 451 - 453
- 49 Benjamin S.A. y Noronha F. 1967 Cytogenetic studies in canine lymphosarcoma. Cornell Vet. 57 : 526 - 529
- 50 Miles C.O., Moldavannu D.G. y Moore A. 1970 Chromosome analysis of canine lymphosarcoma: two cases involving probably centric fusion. Amer.J.Vet.Res. 31 : 783 - 787
- 51 Oshimura M., Sasaki M. y Makino S. 1973 Chromosomal banding pattern in primary and transplanted venereal tumor of the dog. J.Natl.Cancer Inst. 51 : 1197 - 1199
- 52 Instituto Mexicano del Seguro Social 1974 Mortalidad por tumores en la República Mexicana. Subdirección General

## Médica.

- 53 Lemert K., Caesar R. y Miller H.K. 1967 Electron microscopic studies of germinal centers in man. En: Germinal centers in immune responses. Proceedings of a symposium held at the University of Bern. Switzerland, 1966. Cottier H. et al, eds. Springer Verlag N.Y.Inc. p. 49 - 71
- 54 Swartzendruber D.C. 1967 Observations on the ultrastructure of lymphatic tissue germinal centers. En: Germinal centers in immune responses. Proceedings of a symposium held at the University of Bern. Switzerland, 1966. Cottier H. et al, eds. Springer Verlag N.Y.Inc. p. 71 - 82
- 55 Jung M.H., Johnson R.E., Maguire D.J. y Pratt M.S. 1978 In vitro growth of ovine squamous cell carcinoma. Aust. J.Exp.Biol.Med.Sci. 56 : 373 - 378
- 56 Afzelius B.A. 1962 Chemical fixatives for electron microscopy. En: The interpretation of ultrastructure Harris R.J.C. vol.I Academic press. p. 1 - 20
- 57 Mercer E.H. y Birbeck M.S. 1979 Manual de microscopía electrónica para biólogos. 2a. edc. H.Blume. Madrid.
- 58 Sharma A.H. y Sharma A. 1965 Chromosome techniques. Butterworths. London p. 248 - 267
- 59 Smetana K. y Busch H. 1974 The nucleolus and nucleolar DNA. En: The cell nucleus. Busch H. ed. Vol. I Academic press p. 75 - 141
- 60 Hayflick L. 1973 Subculturing human diploid fibroblast -

- cultures. En: Tissue culture methods and applications. Kruse P.F. et al ed. Academic press N.Y. p. 220 - 227
- 61 Herland A.A., Wolman S.R. y Europa D. 1978 Preparation and light-microscopic examination of fixed hematopoietic cell in soft agar. Am.Clin.Pathol. 70 : 760 - 765
- 62 Meyskens F.L., Thompson S.P. y Moon T.E. 1984 Quantitation of the number of cellwithing colonies in semisolid medium and their growth as oblate spheroids. Cancer Res. 44 : 271 - 276
- 63 Salmon S.E. y Buick R.N. 1979 Preparation of permanent slides of intact soft-agar colony cultures of hematopoietic and tumor stem cells. Cancer Res. 39 : 1133 - 1135
- 64 Epstein R.B. y Bennett B.T. 1974 Histocompatibility typing and course of canine venereal tumors transplanted into unmodified random dogs. Cancer Res. 34 : 788 - 792
- 65 Kennedy J.R., Yang T-J. y Allen P.L. 1977 Canine transmissible venereal sarcoma: electron microscopic changes with time after transplantation. Br.J.Cancer - 36 : 375 - 379
- 66 Eagle H. 1968 Growth-regulatory effects of cellular interactions in vitro, and their relevance to cancer. En: The proliferation and spread of neoplastic cells. The Williams & Wilkins Co. p 7 - 19

- 67 Sinkovics J.C., Guörkey F., Kuysk C. y Siciliano M.J. 1978 Growth of human tumor cells in established cultures. - En: Methods in cancer res. Busch H. ed. vol. XIV Academic press p; 243 - 258
- 68 Drommer W., y Schulz L.C. 1969 Vergleichende licht- und elektronenmikroskopische untersuchungen an übertragbaren venerischen sarkom und histiozyten des hundes. Pathol Vet. 6 : 295 - 300
- 69 Ajello P. 1960 Alcuni aspetti ultrastrutturali della cellula del tumor di Sticker. Atti. della Soc. Ital della Sci. Vet. 14 : 528 - 534
- 70 Frost J.K. 1969 The cell in health and disease. An evaluation of cellular morphologic expression of biologic behavior. The Williams & Wilkins Co. p. 51 - 60 y 124 - 130
- 71 Haguenu F. 1969 Ultrastructure of the cancer cell. En. The biological basis of medicine. Bittar E. ed. Vol V. Academic press. p. 433 - 485
- 72 Yang T-J. y Kennedy J.R. 1976 Rosette formation of human erythrocytes on canine transmissible venereal sarcoma cells. AmJ. Pathol. 83 : 359 - 364
- 73 Mercer E.H. 1965 The evolution of intracellular phospholipid membrane systems. En: The interpretation of ultrastructure. Harris R.J.C. ed. Academic press p. 369 - 384
- 74 Ross L. 1970 The contagious venereal dogs sarcoma. En: Oncogenic Viruses. N.Y. Pergamon press. p. 65 (ci-

- tado en Kennedy et al (65)).
- 75 Barile M.F. 1973 Mycoplasmal contamination of cell cultures: Mycoplasma-virus-cell culture interactions. En: Contamination in tissue culture. Føgh J. ed Academic press. p 132 - 141
- 76 Coriell L.L. 1973 Methods of prevention of bacterial, fungal and other contaminations. En: Contamination in tissue culture. Føgh J. ed. Academic press p. 30 - 52
- 77 de Harven E. 1973 Identification of tissue culture contaminants by electron microscopy. En: Contamination in tissue culture. Føgh J. ed. Academic press p. 206 - 219
- 78 Ronot X., Hecquet C., Jaffray P., Guiquet M., Adolphe M., Fontagne I y Lechat P. 1983 Proliferation kinetic of rabbit chondrocytes in primary culture and first passage. Cell Tissue Kinet. 16 : 531 - 536
- 79 Woo K.B., Funkhauser W.K., Sullivan C. y Alabaster O. 1980 Analysis of the proliferation kinetics of Burkitt's lymphoma cells. Cell Tissue Kinet. 13 : 591 - 601
- 80 Persky B., Thompson S.P., Meyskens F.L.Jr y Hendrix M.J. 1982 Methods for evaluating the morphological and immunohistochemical properties of human tumor colonies growth in soft agar. In vitro 18 : 929 - 936
- 81 Salmon S.E. 1978 Direct cloning of human tumor stem cells

cells in vitro : overview and background. Program Human Tumor Cloning. Tucson Arizona.

- 82 Niessley S.P. y Pledger W.J. 1981 Plasma components in growth and development: workshop report. En: Control of cellular division and development. Cunningham D. et al eds. Alan R. Liss. Inc. Part A p. 507 - 509
- 83 Bradshaw R.A. y Rubin J.S. 1980 Polypeptide growth factors: some structural and mechanistics considerations. En: Control of cellular divisions and development. Conningham D. et al eds. Alan R. Liss.Inc. - Part A p. 193 - 198
- 84 Heldein C.H. y Westermark B. 1984 Growth factors: mechanism of action and relation to oncogenes. Cell 37 : 9 - 23
- 85 Pardee A.B., Chertington P.V. y Medrano E.E. 1981 On deciding wich factor regulate cell growth. En: Control of cellular divisions and development. Conningham D. et al etds. Alan R. Liss. Inc. Part A p 495 - 499
- 86 Ross R. 1981 The platelet-derivet growth factor: a perspective. En: Control of cellular divisions and development. Conningham D. et al eds. Alan R. Liss Inc. Part A p. 503 - 510
- 87 Cartaud J.P. 1965 Some immunological aspects of the transmissible venereal tumor of the dog. En: Comparative physiology and pathology of the skin. Rook A.J. & Walton G.S. eds. F.A. Davis Co. p. 685 -



692

- 88 Powers R.D. 1968 Immunological properties of canine transmissible venereal sarcoma. *AmJ.Vet.Res.* 29 : - 1637 - 1642
- 89 Cohen D. 1972 The detection of humoral antibody to - to the transmissible venereal tumor of the dog. *Inter.J.Cancer.* 10 : 207 - 213
- 90 Hamburger A.N. y Salmon S. 1977 Primary bioassay of human myeloma stem cells. *J.Clin.Invest.* 60 : 846 - 851
- 91 Kuroki T. 1977 Agar plate culture and Lederberg-style replica plating of mammalian cells. En: *Methods in cell biology.* Prescott D.M. ed. vol. XII . Academic press. N.Y. p. 157 - 163
- 92 Cohen D. 1973 The biological behavior of the transmissible venereal tumor in immunosuppressed dogs. *European J.Cancer* 9 : 253 - 259
- 93 Cohen D., Chapman A.L., Ebert J.W. y Boop W.J. 1976 Cellular transmission of canine lymphoma and leukemia in beagles. *J.Natl.Cancer Inst.* 45 : 1013 - 1019
- 94 Kudo T., Koike T., Otomo K. y Sekal T. 1981 Growth and regression course of canine transmissible sarcoma transplanted into beagles and mongrel dogs. *Jpn.J.Vet.Sci* 43 : 421 - 425
- 95 Paul J. 1962 The cancer cell in vitro : A review. *Cancer Res.* 22 : 431 - 436
- 96 Southam C.M. 1968 Factors influencing the growth of tumor autotransplants. En: *The proliferation and spread*

of neoplastic cells. The University of Texas,  
M.D. Anderson Hospital and Tumor Institute at  
Houston, 21st. Annual symposium on fundamental  
cancer research. The Williams & Wilkins Co. Bal  
timore p. 583 - 592

Hago patente mi agradecimiento, a la valiosa  
colaboración prestada en la realización de este trabajo, a las si-  
guientes personas :

Dr. Pablo Hernández-Jáuregui Alvarez .

Biol. Emma Lucia Espinosa Larico .

M. en C. Ma. Cristina Revilla Monsalve .

Biol. Eduardo Bello Padilla .

M. en C. Judith Tellez Martinez .

Q.F.B. Patricia Rebolledo Camacho .

M. en C. Mario A. Altamirano Lozano .