

Trabajo Original – Original Article

Estudio Citogenético y Anatomopatológico del Tumor Ascítico Transplantable de Ratón, Sarcoma 180/TG

P. Michelli , J. Celaya , M. Aguilar.

Cátedra de Anatomía Patológica, Escuela de Medicina Luis Razetti, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.

Resumen

El sarcoma 180 /TG o Tio guanina resistente (S 180 /TG) es un tumor ascítico experimental de ratón, transplantable por técnicas de cultivo de tejidos, usado como fuente de líquido ascítico hiperinmune para el diagnóstico serológico de Arbovirus y otros agentes virales. Se estudian las características in Vitro, hallándose una modificación de ellas después de un tiempo prolongado con sucesivos pases periódicos, consistente en la aparición de una mayor adherencia de las células al fondo del recipiente de cultivo. Se muestra la existencia de una relación entre la adherencia de las células al fondo del recipiente de cultivo con el cambio del cariotipo, caracterizado por la identificación de dos nuevos cromosomas metacéntricos marcadores. Se estudian los aspectos citogenéticos y anatomopatológicos.

Palabras claves: Sarcoma, sarcoma 180/TG, Tio guanina resistente, ratones, citogenética, anatomía patológica. *Rev Soc Med Quir Hosp Emerg Perez de Leon* 2007; 38(2):40-45.

Abstract

Sarcoma 180 /TG o Thioguanine resistant is an ascitic transplantable tumour of the mice, by tissue culture techniques. Used as an ascitic liquid hyperimmune source in arbovirosis diagnosis and other viral infections. Cytogenetic and histology were performed. The cultural features and its modifications after prolonged passage were compared with in vivo passage. Better cellular attachment to the glass surface was found after high number of passage. This may be related to a karyotype change of the cells. It's consisting in two metacentric marker chromosomes. The cytogenetic and anatomopathological aspect are studied.

Key Words: Sarcoma, sarcoma 180/TG, Thioguanine resistant, mice, cytogenetic, anatomopathology. *Rev Soc Med Quir Hosp Emerg Perez de Leon* 2007; 38(2):40-45.

Introducción

El sarcoma 180/TG o Tio guanina resistente (S 180 /TG) es un tumor ascítico experimental de ratón, transplantado por vía intraperitoneal usado en los laboratorios de virología, como fuente de líquido ascítico hiperinmune para el diagnóstico serológico de Arbovirus y otros agentes virales.

El s 180/TG constituye un sarcoma resistente que ha sido expuesto a la acción citotóxica de la 6 Tioguanina (6TG), desarrollado a partir de un tumor más agresivo, conocido como Sarcoma 180.

Esta modificación le confiere una menor agresividad biológica, disminución de la velocidad de crecimiento e incremento de la sobrevivencia de los ratones inoculados.

El sarcoma 180 / TG constituye un método práctico para la obtención de grandes volúmenes de fluido inmune que puede sustituir el suero inmune de ratón.

Es inclusive una fuente para la preparación de antígenos por hemaglutinación, o por fijación al complemento, en estudios virales, pruebas de drogas, estudios metabólicos, de resistencia, en el crecimiento de neoplasias malignas en líneas celulares y en la obtención de interferón¹⁻¹⁰.

El estudio de los tumores malignos en animales experimentales para observar su comportamiento, cambios cromosómicos y su correlación histológica in vivo pueden ser útiles para comprender algunos aspectos que pudieran tener aplicaciones clínicas.

Con estas consideraciones se estudia el S 180/TG.

Materiales y Métodos

El tumor fue obtenido de una cepa resistente del laboratorio de Arbovirus del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel", mantenida en congelación y pasada mediante trasplantes sucesivos por vía intraperitoneal.

Se utilizaron 36 ratones blancos suizos, 24 adultos y 12 lactantes, todos de sexo masculino. De estos se tomaron 24 adultos para ser inoculados por vía intraperitoneal (IP), intramuscular (IM) y subcutánea (SC) con el S 180/TG, 12 con tumor mantenido in vivo y 12 in Vitro. Los 12 ratones lactantes fueron inoculados vía IP con tumor mantenido in vivo (Figuras 1 y 2).

El tumor fue transplantado, centrifugando previamente 2 ml de líquido ascítico tumoral a 1500 revoluciones por minuto (r.p.m) durante 10 minutos y resuspendiendo las células al 20% en solución de cloruro de sodio (Na Cl) 0,85% estéril, de la cual se inoculó 0,5 ml a cada ratón (3.300.000 células).

Las células tomadas del líquido ascítico para los cultivos fueron sembradas a 37°C en medio de Eagle's con 10% de suero fetal de ternera en frascos de 120 ml a razón de 30000 células por 1 ml, fueron observadas en microscopio invertido, contadas con cámara de Neubauer y pasadas regularmente a nuevos frascos dos veces por semana, decantando parcialmente el medio con células en suspensión, con tripsinización rápida con Tripsina al 0,1% por 1 minuto a temperatura ambiente y lavado posterior con solución de Hanks y colocadas en un nuevo frasco con medio de Eagle's.

También se utilizaron para el cultivo discos de Petri plásticos de 60 mm en atmósfera con 5% de CO₂. El estudio cromosómico in vivo se hizo en los ratones inoculados IP, 7 días antes con las células tumorales, previo tratamiento con colchicina por 2 horas usando una dosis de 0,04 mg/ml de fluido ascítico (calculado por el tamaño de la ascitis).

El estudio cromosómico *in Vitro* se realizó 18 horas después del último pase, previo

tratamiento con colchicina 2 horas antes (0,02 mg colchicina/10 ml medio). La preparación de las metafases se hizo por el método usual de tratamiento hipotónico con solución de KCl al 0,075%M por 15 minutos y la fijación con metanol: ácido acético 3/1. Las láminas se colorearon con Giemsa.

Para el estudio anatomopatológico se sacrificaron los ratones a los 20-30 días de transplantado el tumor. Los ratones fueron separados en grupos de 4 e inoculados con tumor ascítico y sólido IP, IM, SC y dejados evolucionar hasta su muerte. Los órganos de los ratones autopsiados se fijaron en formalina tamponada al 10%. Las secciones tisulares fueron incluidas en parafina, seccionadas a 3 micras y coloreadas con Hematoxilina - Eosina (H-E), tricrómico de Masson, retículo de Gomory, Sudán negro y Hematoxilina fosfotúngstica (PTAH).

Figura 1. Transplante intramuscular de S 180/ TG Tumor sólido en el miembro posterior izquierdo 18 días después de inoculado.



Figura 2. S 180 /TG tumor ascítico. Ratón a los 22 días de transplantado por vía intraperitoneal.



Resultados

Se realizaron 64 pases de cada cultivo inicial. Las células se multiplicaban rápidamente formando racimos de hasta 15 micras. Se observó además células individuales de 30-40 micras con citoplasma vacuolado, a medida que la acidificación del cultivo era mayor. Cuando el número de pases de cultivo aumentó aparecieron más células que se adherían al vidrio, pero sin llegar a confluir, cambio que comenzó a notarse en el pase 30 y que se hizo más marcado después del pase 40.

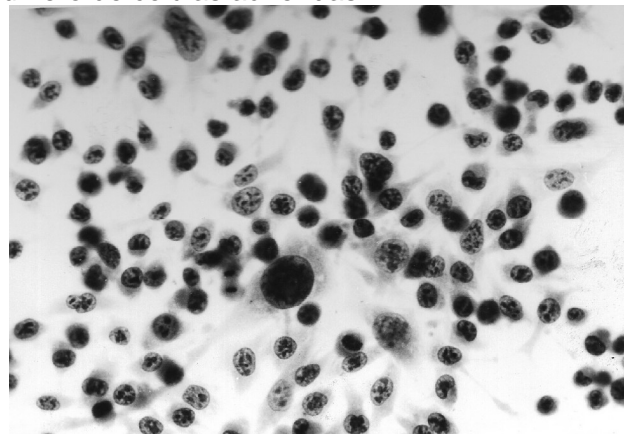
Las células vacuoladas disminuyeron conforme aumentaba el número de pases. El decantamiento de las células hizo más notable el número de células con adherencia, por eliminación de aquellas sin capacidad de adherirse. En el pase 50 se identificó una monocapa parcial de células adheridas con escasas células en suspensión. La morfología de las células en microscopio invertido era variable fusiforme, estrellada, irregular o epiteliode; aunque predominó la primera.

Se realizó estudio citogenético al tumor ascítico original para compararlo con el obtenido del tumor cultivado in Vitro contando el número de cromosomas en metafase tratando de establecer un número modal y de evidenciar la aparición de cromosomas marcadores. Se encontraron 97 metafases, con repetición de los números modales en 68 y 70 cromosomas. Ambos números modales ocupaban el 23% y 20% de todas las metafases contadas, el resto de las mitosis mostraron varios números de cromosomas que no se repitieron con la misma constancia. Se realizaron estudios de clonación en el tumor ascítico tomando células individuales con pipeta Pasteur y colocándolas en cápsula de Petri, en estufa con atmósfera de CO₂ al 5%.

Los alteraciones cromosómicas del tumor original (antes de los pases in Vitro) fueron 2 cromosomas metacéntricos M1 y fragmentos minutos M2. En pocas células se observó la presencia de otros 2 metacéntricos M3 algo más pequeños que los M1. La frecuencia con que estos cromosomas alterados aparecieron en la metafase del tumor ascítico fue M1:

25%, M2: 48%, M3: 3%. Los estudios cromosómicos del tumor ascítico cultivado mostraron características similares al tumor original hasta el pase 44 - 57 con incremento de la capacidad de adherencia y modificación del cariotipo con frecuente aparición de cromosomas metacéntricos marcadores M3 (Figura 3). El número modal más frecuente se mantuvo entre 68 y 70. La frecuencia con la que se observó los marcadores en el tumor cultivado fue: M1: 26%, M2: 47%, M3: 41%.

Figura 3. Cultivo en pase 57. Incremento del número de células adheridas.



Se obtuvieron varias clonas del tumor cultivado con 68, 70 y 69 cromosomas; con 2 cromosomas metacéntricos designados como M1 y los minutos M2. La clonación del tumor (pase 56) mostró clonas 68, 66, 70 y 71 cromosomas en 3 de ellas (66, 68 y 70) se encontraron los 2 nuevos cromosomas metacéntricos (M3), además de las observadas en el tumor ascítico.

Los ratones inoculados por vía intraperitoneal mostraron ascitis marcada, máxima a los 20 días (15-20 ml). La autopsia de estos ratones con tumor ascítico original evidenció engrosamiento tumoral del peritoneo y la serosa de todos los órganos abdominales. En las secciones histológicas se observó células tumorales en la cápsula hepática, esplénica, renal bilateral; también alrededor del páncreas, de los músculos abdominales y diafragma; sin embargo las células tumorales estaban en la superficie de los órganos. No se encontró metástasis fuera

de la cavidad abdominal en los ratones adultos.

Los ratones inoculados IM presentaban después de 2 semanas una masa de 2,5 cm. de diámetro. Dejados evolucionar sobrevivieron hasta las 4 semanas, sin incremento en el crecimiento tumoral. En la necropsia el tumor era sólido con 90% de necrosis a predominio central en relación a su volumen total. No se encontró metástasis. Los ratones inoculados vía subcutánea en el dorso, a los 20 días tenían una lesión tumoral de 0,8 cm. En la autopsia el tumor estaba viable, con escasa necrosis en la parte próxima a la piel, la cual estaba ulcerada. No se encontró metástasis.

Los ratones lactantes exhibieron metástasis pulmonares alrededor de los hilios pulmonares (Figuras 4 y 5).

Figura 4. Metástasis pulmonares en ratón lactante. H-E 100X.

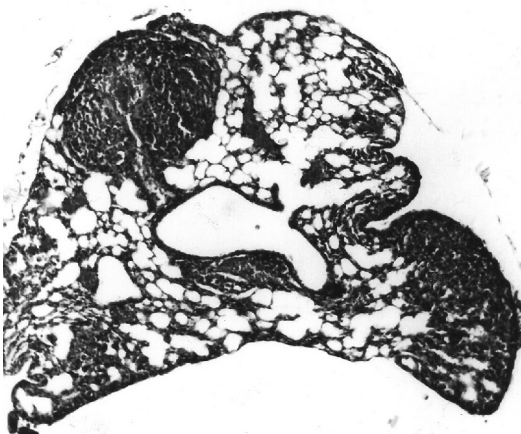
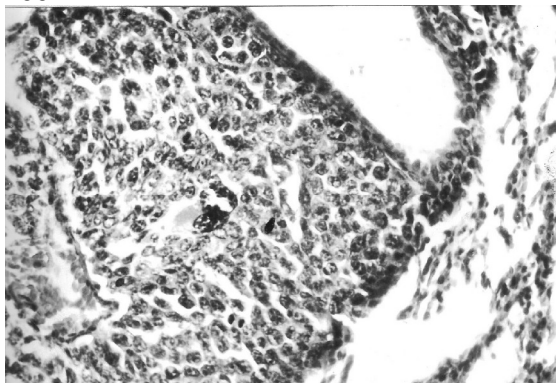


Figura 5. Metástasis en pulmón. Las células tumorales se disponen alrededor de un vaso sanguíneo y próximas a la pared de un bronquio. H-E 400X.



En las secciones histopatológicas el tumor era muy celular, monomórfico, constituido por células de tamaño uniforme entre 15-20 micras, con citoplasma eosinófilo débil, anisonucleosis, con 2 o 3 nucleolos. Se identificaron células con 2 o tres núcleos. Presencia de mitosis atípicas, multipolares y necrosis. La coloración de retículo de Gomory puso de manifiesto abundantes fibras de reticulina en el tumor de disposición pericelular, el PAS fue negativo, el tricrómico de Masson mostró colágeno moderado focal. El PTAH, Sudán negro y Giemsa resultaron negativos en las células neoplásicas. No hubo diferencias en el aspecto histológico del tumor transplantado a partir del tumor original ascítico y el tumor cultivado.

Discusión

Los tumores malignos como las líneas celulares estables cultivadas, constan de poblaciones celulares heterogéneas, cada una de estas líneas puede tener un cariotipo diferente. Las células de cada población o clona serían distintas a las de otra, en cualidades como morfología, velocidad de crecimiento, mayor o menor capacidad de adhesión al fondo del recipiente al ser cultivadas. En conjunto las características de un tumor o de una línea celular dependerá de las clones que predominen en número de células sobre las demás¹¹⁻¹².

El estudio del cariotipo de un tumor o cultivo, de manera cuantitativa, proporciona una imagen de la población celular y de las clones predominantes (número modal). El estudio cromosómico del tumor ascítico mostró una modificación del cariotipo con células con 2 cromosomas metacéntricos (M1 y M3), además de los otros marcadores mencionados, con un incremento de las metafases que tenían 66 cromosomas (Fig. 6-7). Este cambio genotípico coincidió con un cambio fenotípico de incremento de la adhesión al vidrio¹³. Situación que obedecería a un cambio clonal por selección *in Vitro*, debido a que las nuevas condiciones favorecen el desarrollo de unas clones sobre otras, aunado al hecho que la población celular con ésta característica se perpetuo en

el tiempo con el aumento del número de pases y disminución consecuente de las células con menor propiedad de adherencia, las cuales además eran más susceptibles al medio ácido con tendencia a la vacuolización y degeneración.

Figura 6. Cariotipo del tumor no cultivado. El primer par lo forman dos cromosomas metacéntricos (M1) y el último los dos minutos (M2).

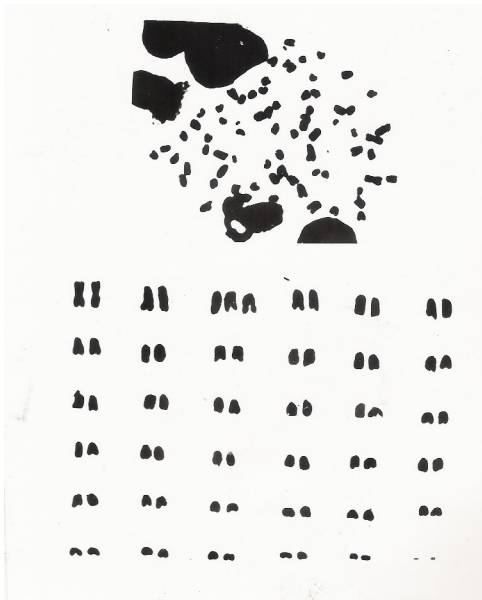
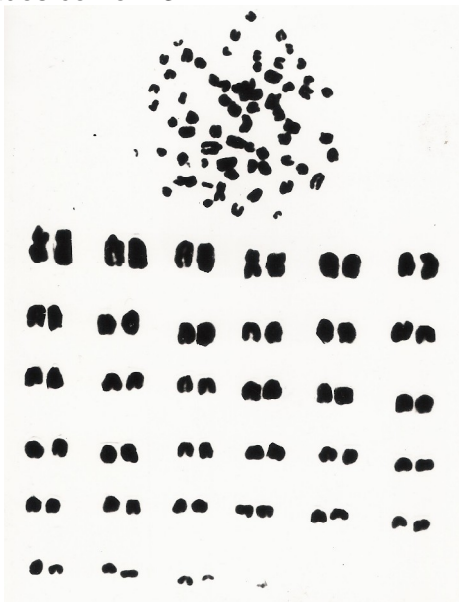


Figura 7. Cariotipo del tumor cultivado en el pase 57. Se identifican los cromosomas M1, M2 y otro par de cromosomas metacéntricos (par número 4) designados como M3.



El cambio en el cariotipo con la aparición de los cromosomas metacéntricos encontrados, sugiere que se han formado por fusión centromérica en virtud de que se identifica después del cultivo un aumento del número de células que en su metafase muestran 66 cromosomas¹⁴⁻¹⁵.

No se encontraron cambios en el comportamiento biológico tumoral, después del período de cultivo prolongado. Los ratones morían en el mismo período de tiempo y no se encontraron alteraciones en el grado de extensión o invasión tumoral. Los ratones lactantes mostraron mayor invasión y metástasis pulmonares esta mayor susceptibilidad seguramente se debe a la inmadurez inmunológica. La histopatología demostró un tumor de estirpe mesenquimal con aspecto de células fusiformes o reticulares atípicas. Sin embargo es conveniente la realización de estudios enfocados en el pronóstico de estas poblaciones que combinen técnicas de clonación, de cariotipo con bandeado, ultraestructurales e inmunohistoquímicas; ya que no existen hasta el momento publicaciones en las que se analicen tales observaciones y debido al tamaño de la muestra empleada no nos permite realizar mayores conclusiones.

Referencias

1. Lee SH, Sartorelli AC. Conversion of 6-thioguanine to the nucleoside level by purine nucleoside phosphorylase of sarcoma 180 and sarcoma 180/TG ascites cells. *Cancer Res.* 1981;41(3):1086-1090.
2. Lee MH, Huang YM, Agrawal KC, Sartorelli AC. Inhibitors of alkaline phosphatase of Sarcoma 180/TG. *Biochem Pharmacol.* 1975; 24(11-12):1175-1178.
3. Lee MH, Sartorelli AC. Solubilization and partial purification of alkaline phosphatases of sarcoma 180-TG ascites cells. *Biochim Biophys Acta.* 1974;358(1):69-81.
4. Sartorelli AC, Fischer DS, Downs WG. Use of sarcoma 180/TG to prepare hyperimmune ascitic fluid in the mouse. *J Immunol.* 1966;96(4):676-682.
5. Bygrave FL, Anderson TA. Ruthenium red-insensitive calcium transport in ascites-sarcoma 180/TG cells. *Biochem J.* 1981;200(2):343-348.
6. Buckley SM, Casals J. Mouse interferon in ascitic fluids. *Appl Microbiol.* 1974;28(2):319.
7. Bezerra DP, Castro FO, Alves AP, Pessoa C, Moraes MO, Silveira ER, Lima MA, Elmiro FJ, Costa-Lotufo LV.

- In vivo growth-inhibition of Sarcoma 180 by piplartine and piperine, two alkaloid amides from Piper. *Braz J Med Biol Res.* 2006;39(6):801-807.
8. Chasseing N, Rumi L.S, Couto A, Lederkremer R.M. Acción de un polisacàrido aislado del hongo *Cyrtaria johowii* sobre el crecimiento del sarcoma 180 en ratones. *Medicina(B. Aires).*1983; 43(2): 147-152
 9. Kanno S, Tomizawa A, Hiura T, Osanai Y, Shouji A, Ujibe M, Ohtake T, Kimura K, Ishikawa M. Inhibitory effects of naringenin on tumor growth in human cancer cell lines and sarcoma S-180-implanted mice. *Biol Pharm Bull.* 2005;28(3):527-30
 10. Aranowska K, Graczyk J, Checinska L, Pakulska W, Ochock J Antitumor effect of Pt(II) amine phosphonate complexes on sarcoma sa-180 in mice. Crystal structure of cis-dichlorobis (diethyl-4-pyridylmethylphosphonate-kappaN) platinum (II) hydrate, cis-[PtCl₂(4pmp_e)₂].H₂O. *Pharmazie.* 2006 ;61(5):457-60.
 11. Schmidt NJ, Lennette EH. Virology on the bookshelf. Application of tissue culture technics to diagnostic virology in the public health laboratory. *Am J Public Health.* 1961;51:511-6.
 12. Rasheed S, Nelson-Rees WA, Toth EM, Arnstein P, Gardner MB. Characterization of a newly derived human sarcoma cell line (HT-1080). *Cancer.* 1974;33(4):1027-33.
 13. Fisher HW, Puck TT, Sato G. Molecular Growth Requirements of single mammalian cells: The action of fetuin in promoting cell attachment to glass. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1958;44(1):4-10.
 14. Wright DH, Peel S, Cooper EH, Hughes DT. Transmissible venereal sarcoma of dogs. A histochemical and chromosomal analysis of tumours in Uganda. *Rev Eur Etud Clin Biol.* 1970;15(2):155-60.
 15. Melendez B, Diaz-Uriarte R, Cuadros M, Martinez-Ramirez A, Fernandez-Piqueras J, Dopazo A, Cigudosa JC, Rivas C, Dopazo J, Martinez-Delgado B, Benitez J. Gene expression analysis of chromosomal regions with gain or loss of genetic material detected by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer.* 2004 ;41(4):353-365.
- Autor Corresponsal:** Pedro Michelli, Cátedra de Anatomía Patológica, Escuela de Medicina Luis Razetti, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.

This document was created with Win2PDF available at <http://www.win2pdf.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.
This page will not be added after purchasing Win2PDF.