

Estudio citogenético del tumor ascítico querin t8 después de diez años de pasajes en serie utilizando hospederos homólogos

Virginia Solís Alyarado*

RESUMEN

Los resultados de nuestro estudio se compararon con un estudio anterior realizado a los cinco años de pasaje del tumor, para determinar los cambios ocurridos dentro de la población tumoral y que son los siguientes:

- El grado de dispersión de la población celular se redujo (34-120 cromosomas)
- La línea celular principal casi diploide se mantuvo conservando la misma clase predominante (46-48), pero tuvo células con número de cromosomas entre 38 y 52; se aumentó la frecuencia de células con número más pequeño de cromosomas (36-46) y se disminuyó la frecuencia de las células con número mayor de cromosomas (48-58).
- La línea secundaria se modificó completamente. Tuvo una dispersión cromosómica menor (76-86 cromosomas), una clase celular predominante de 78-80 cromosomas y en su establecimiento participaron células con números más pequeños de cromosomas.
- Los cromosomas perdidos más frecuentemente fueron telocéntricos y los ganados más frecuentemente metacéntricos.
- Aparecieron siete cromosomas nuevos formados por deleciones de los cromosomas 1 y 2 y translocaciones entre los cromosomas 1 ó 2, 3, 5, 10, 13 y 14.
- Los cromosomas minúsculos mostraron tendencia a aumentar con el aumento del número de cromosomas.

Los datos parecen indicar que el tumor se ha estabilizado bastante y que los procesos selectivos tienden a eliminar las células con números altos de cromosomas, favoreciendo al mismo tiempo a las que tienen un número de cromosomas alrededor del número diploide.

* Escuela de Biología, Universidad de Costa Rica.

INTRODUCCION

La evolución de las poblaciones celulares tumorales es considerada por la mayoría de los autores, como el resultado de una competencia selectiva entre la multitud de líneas celulares, llegando a predominar aquella que es favorecida metabólicamente de un cambio que intervino en un determinado momento en el medio (terapia, pasaje, acumulación de metabolitos, etc.). (8,11,13,17,19) y la cual llega a constituir la línea principal del tumor, siendo la principal responsable del crecimiento de éste (23).

Según Hsu (10), de la línea principal pueden derivar otras líneas tumorales dependiendo de las condiciones del medio.

En un tumor al lado de la línea principal, se encuentran varias líneas colaterales con número de cromosomas diferente y menor frecuencia.

La existencia de un número mayor o menor de líneas colaterales refleja el grado de heterogeneidad del tumor y se traduce por una dispersión mayor del número de cromosomas; expresando las potencialidades fisiológicas sumamente diversas de la misma población celular.

En la caracterización de la línea principal es muy importante la presencia constante de uno o varios cromosomas marcadores, diferentes estructuralmente de los cromosomas de la especie. Su importancia reside en que pueden indicar la naturaleza maligna de las

células que los poseen y el origen común de éstas a partir de una sola célula original; además permiten seguir la evolución de aberraciones suplementarias que afectan la constitución cromosómica (14).

Otra modificación del cariotipo tumoral son los cromosomas minúsculos, que constituyen fragmentos cromosómicos con centrómero (14).

Según Mitelman y Levan (24) hay dos tipos de aberraciones cromosómicas involucradas en el proceso neoplásico. El primero es el resultado de la interacción directa entre el factor(es) oncogénico(s) y el material genético de la célula. Estas aberraciones primarias pueden ser translocaciones, deleciones, duplicaciones, pero probablemente más a menudo son cambios genéticos submicroscópicos. Estos producen una célula transformada, liberada del control del hospedero y con el potencial de una vida indefinida.

Debido al estado de transformación, la población celular en desarrollo puede acumular cambios cromosómicos secundarios, pasivamente y al azar pero sujetos a selección celular, de manera que sólo las células en las que se acumulen aberraciones que les confieran ventaja proliferativa persistirán y dominarán más tarde la población celular.

La presentación de un cambio ambiental, puede trastornar el equilibrio causando cambios de cariotipo en la población tumoral y/o desarrollar una competencia entre las diversas líneas celulares que culmina con la selección de aquélla que posea una estructura genética acorde con los nuevos requerimientos ambientales. Esta línea se multiplica rápidamente, llegando a constituir la línea principal, mientras que las otras líneas celulares coexisten paralelamente con ella como material de reserva, para futuros cambios en el ambiente celular. Cada línea principal del tumor representa la "supervivencia de la más apta" (18,23).

El estudio de cromosomas en tumores ascíticos animales a partir de 1950, suplementado pronto con resultados de efusiones humanas malignas, aclaró las reglas del comportamiento cromosómico en poblaciones celulares malignas avanzadas (18,23).

El estado presente de la citogenética del cáncer en lo referente a los tumores experi-

mentales puede ser resumido de la siguiente manera:

Los cromosomas cambian durante la oncogénesis formando patrones cromosómicos predeterminados, influenciados por el agente inductor, que evidentemente programa el cariotipo para una secuencia específica de cambios cromosómicos, diferentes para los distintos agentes. Esto implica íntima interacción entre la materia hereditaria de la célula huésped y los agentes inductores. La variación cromosómica significativa afecta solamente un pequeño número de cromosomas específicos, mientras los demás no son alterados y toman parte únicamente en disturbios accidentales (18).

Cuadro 1
Distribución del número de copias por célula de cada tipo de cromosoma normal, en 14 células ascíticas pertenecientes a la línea principal.

Tipo de cromosoma	Número de copias por célula				
	0	1	2	3	4
1	1	12	1		
2	1	12	1		
3		3	7	4	
4		5	9		
5		8	5	1	
6		9	5		
7		7	6	1	
8		7	6	1	
9	1	5	5	3	
10		8	5	1	
11		1	11	2	
12		3	10	1	
13	1	4	9		
14		1	12	1	
15		4	5	5	
16		2	11	1	
17		7	6	1	
18		3	9	2	
19		2	8	2	2
20		2	3	5	4
X		13	1		
Y	1	9	4		

MATERIAL Y METODOS

Se utilizaron machos de ratas Wistar (Bratislava) de aproximadamente 150 g. para el mantenimiento del tumor ascítico, de la siguiente manera: Se recogió el líquido ascítico por punción intraperitoneal y se preparó una suspensión celular en suero fisiológico, de la cual se inoculó 1 ml (10-20) 10^3 células a la rata huésped. De esta manera fue pasado el tumor de un huésped a otro por diez años, al cabo de los cuales se realizó este estudio.

El líquido ascítico usado para el estudio fue obtenido a partir de 10 ratas inoculadas con el tumor 15 días antes de obtener las muestras.

Dos horas antes de recoger el líquido ascítico las ratas fueron inoculadas intraperitonealmente con una solución de colquicina al 0,02% en suero fisiológico, en una dosis de 5 ug./g. de peso.

El líquido ascítico se recogió por punción intraperitoneal y se sometió a un tratamiento hipotónico de 30 minutos con agua destilada a 37°C.

Se efectuaron tres fijaciones sucesivas de 30 minutos cada una a 4°C con una mezcla de alcohol metílico absoluto : ácido acético glacial 3 : 1.

Como controles se utilizaron tres ratas Wistar machos de aproximadamente 150 g., las cuales fueron inyectadas intraperitoneal-

mente con una solución de colquicina 0,02% en suero fisiológico, correspondiente a una dosis de 5 ug./g. de peso. A la hora y media los animales fueron sacrificados y se les extrajo la médula del fémur. Esta fue colocada en una solución de KCl 0,5% a 37°C y dejada 30 minutos. Se le hizo tres fijaciones sucesivas de 30 minutos cada una con alcohol metílico absoluto : ácido acético glacial 3 : 1.

Tanto las láminas obtenidas del tumor ascítico como las del grupo control, fueron incubadas 4 horas en una solución 0,25 M de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ en agua bidestilada, a 63°C y enjuagadas tres veces en agua destilada. Se dejaron secar y se tiñeron por 10 minutos en una solución de Giemsa con la siguiente composición: 5 ml Giemsa, 2 ml solución de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ al 5%, 93 ml agua destilada. Por medio de este tratamiento se obtuvo bandeó G de los cromosomas normales y tumorales.

Las metafases de buena calidad fueron fotografiadas, además se hizo conteo del número de cromosomas y cromosomas minúsculos a 309 células tumorales escogidas al azar.

Las fotografías fueron cariotipadas según el modelo patrón (1973) (5) y según el modelo propuesto por Levan (16), Fig. 1.

Se determinó el número de copias de cada tipo de cromosoma y el posible origen de los cromosomas con reestructuraciones, utilizando 14 cariotipos de la línea principal del tumor.

Los resultados del estudio se compararon con los obtenidos por Cirnu (1971) (3) luego de efectuar un estudio del tumor al cabo de 5 años de pasajes en hospederos homólogos.

Cuadro 2

Distribución del número de copias por célula de los cromosomas con reestructuraciones, en 14 células ascíticas pertenecientes a la línea principal.

Tipo de cromosoma	Número de copias por célula				
	0	1	2	3	%
A = del (1) (q)	1	7	5	1	93
B = t (5q; 13 q)	12	2			14
C = t (? 1-2q; 14 p)	12	2			14
D = t (3 q; 10 q)	11	3			21
E = del (2) (q)	9	4	1		36
F = t (? 1-2q; 14 q)	8	6			43
G = t (? 1-2q; 13 q)	11	3			21

RESULTADOS

El análisis del número de cromosomas mostró que el grado de dispersión se redujo (34-120 cromosomas) comparado con el anterior estudio (36-176 cromosomas) (3), Fig. 1.

La clase predominante de la línea celular principal fue la misma en los dos estudios (46 a 48 cromosomas), mientras que la clase predominante a la línea tumoral secundaria cambió de 92 a 94 cromosomas en el estudio anterior, a 78-80 cromosomas en este estudio.

Aunque la clase predominante de la línea

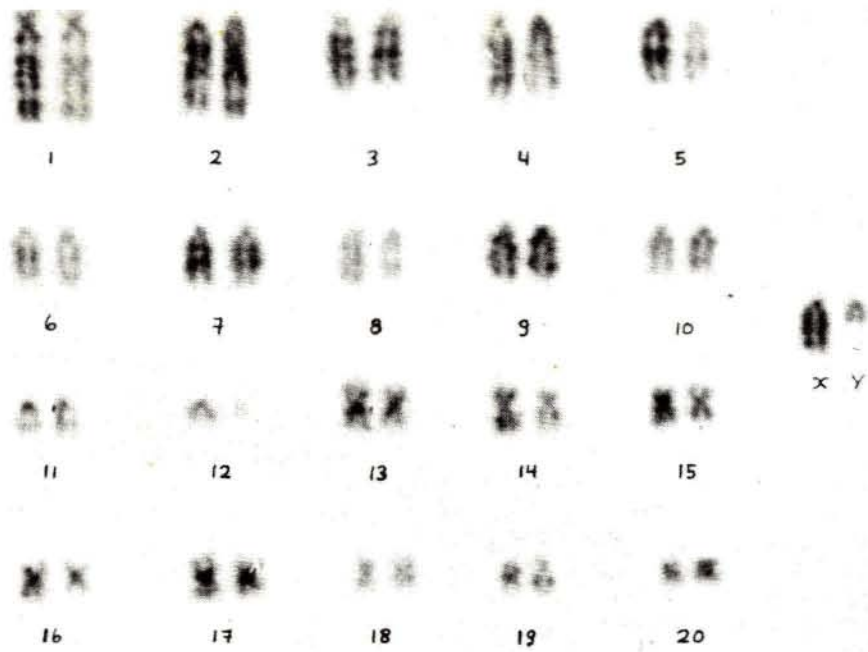


FIGURA 2

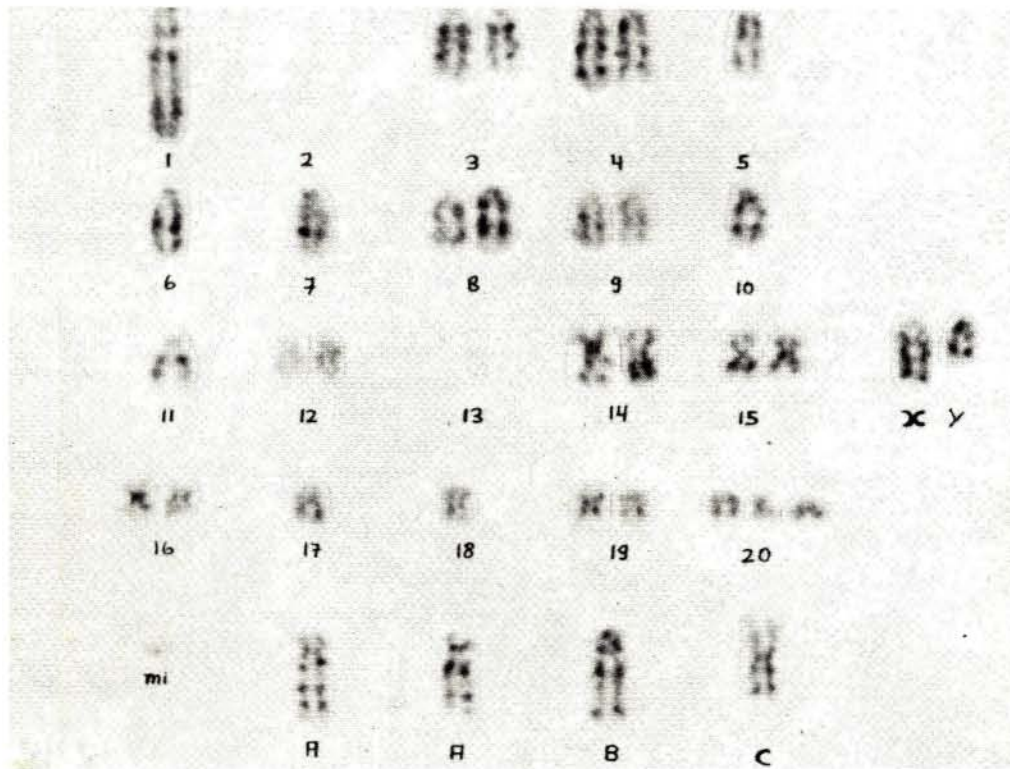


FIGURA 3

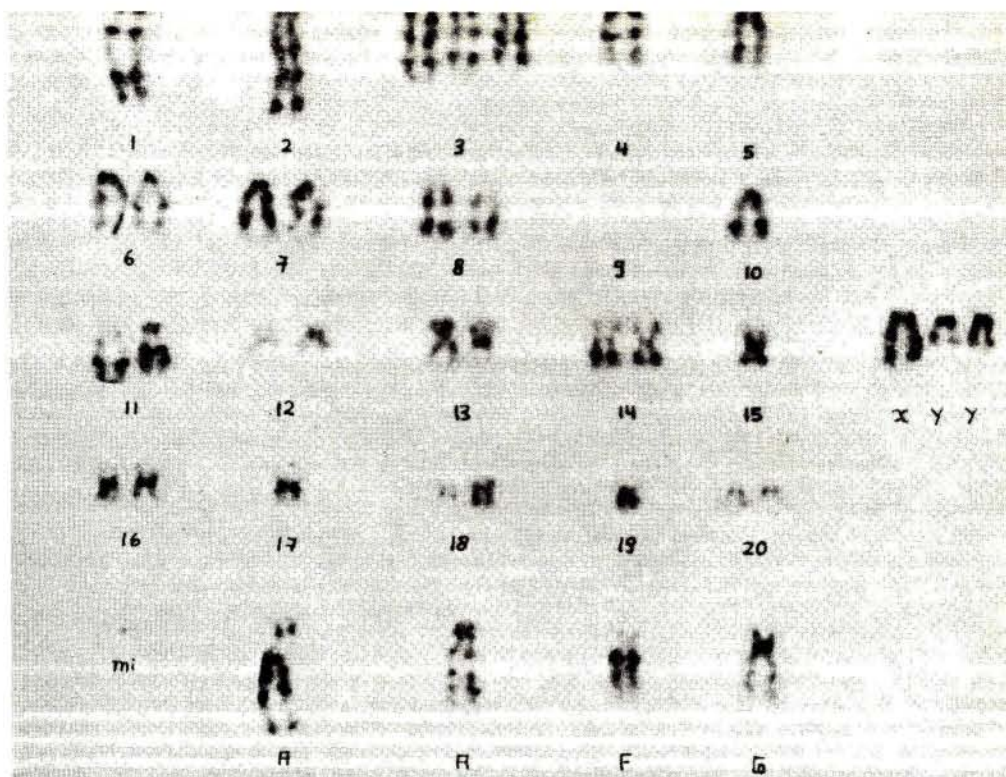


FIGURA 4

tumoral principal se mantuvo, dentro de las clases tumorales menos importantes numéricamente, se produjo un aumento de frecuencia de las células con números menores de cromosomas (36 a 46) y una disminución de la frecuencia de las clases celulares con números mayores de cromosomas (48 a 58).

La línea tumoral secundaria se modificó completamente en lo referente a importancia numérica, dispersión celular y cambio de la clase predominante, participando en su establecimiento células con números menores de cromosomas.

Los cromosomas que se perdieron más frecuentemente fueron los telocéntricos y los que se ganaron más frecuentemente fueron los metacéntricos (Cuadro 1).

Se encontraron siete cromosomas con reestructuraciones formados por posibles deleciones y translocaciones entre diferentes cromosomas (Cuadro 2, Figs. 3, 4, 5).

Los cromosomas minúsculos mostraron una tendencia a aumentar con el aumento

del número de cromosomas, de 1 a 4 por célula.

DISCUSION

La constitución cromosómica del tumor ascítico no se mantuvo igual después de diez años de pasajes en serie, aunque se conservó la misma clase predominante.

Los cambios encontrados indican la existencia todavía de procesos evolutivos, que lleven a la selección de las células más capaces de multiplicarse en el medio intraperitoneal, con el consiguiente ajuste estructural del cariotipo.

En los tumores mantenidos por trasplante mucho tiempo, la línea principal es relativamente estable, mientras que en los recién establecidos va variando.

Las experiencias realizadas por Koller (1960) (14) con el tumor ascítico Yoshida, mostraron que, dependiendo del lugar en el cual se trasplantó el tumor (subcutáneamente o intraperitonealmente), la frecuencia

de las células de la línea principal varió, llegando a tener una frecuencia cuatro veces mayor en la región subcutánea.

Las modificaciones que se producen después del trasplante, a veces pueden formar líneas tumorales nuevas desde el punto de vista metabólico y citogenético, que las diferencian del tumor primario, como es el caso de las tres sublíneas ascíticas del adenocarcinoma mamario T A 3, analizadas por Levan en 1956 (15).

En nuestro caso, el grado de dispersión se redujo, resultado parecido al obtenido por Haushka y Levan (12) con los tumores ascíticos Krebs y Landschutz de ratón, llegando a la conclusión que el trasplante en hospederos homólogos limita el grado de dispersión debido a las semejanzas metabólicas, genéticas y de histocompatibilidad entre el animal donante y el hospedero.

Sobre el significado de la poliploidía en la evolución citogenética de los tumores existen varias opiniones.

Según Levan (15) y Hsu (10) las células poliploides tienen dentro de la población tumoral mayor resistencia y posibilidades de sobrevivir en condiciones desfavorables, confiriéndole además la capacidad de desarrollarse en hospederos con fenotipo diferente.

Es posible que en el caso de este tumor ascítico, las células poliploides le confirieron ventaja metabólica a la población tumoral en los primeros años de pasajes en serie, cuando la cavidad intraperitoneal era un medio todavía extraño para las células y al cual debía adaptarse, siendo seleccionadas, aunque en menor grado, al lado de las células casi diploides, ocasionando la gran dispersión de la población celular, así como la mayor frecuencia celular de la línea secundaria casi tetraploide, en el primer estudio comparado con el nuestro.

Puesto que los pasajes en serie se hicieron en hospederos homólogos, el ambiente para las células fue en general el mismo. Probablemente las células poliploides ya no corresponden a los requerimientos metabólicos y tienden a ser eliminadas progresivamente.

Por el contrario, las células casi diploides mantuvieron una frecuencia alta, testificando su selección como las más favorecidas por las condiciones fisiológicas imperantes en el medio intraperitoneal.

De cualquier modo la poliploidía debe tener un papel importante en la neoplasia, por la frecuencia alta que presenta en algunos tumores (36).

Después de diez años de pasajes, el tumor sufrió modificaciones en la distribución de los cromosomas por grupos morfológicos, que afectó de manera diferente cada grupo de cromosomas.

Una observación similar se ha realizado en tumores humanos, en los cuales se ha observado un aumento numérico de los cromosomas submetacéntricos del grupo C, al mismo tiempo que una disminución en el número de cromosomas telocéntricos D y G (20, 38). Este fenómeno es muy evidente en las leucemias humanas (27, 28, 32, 33).

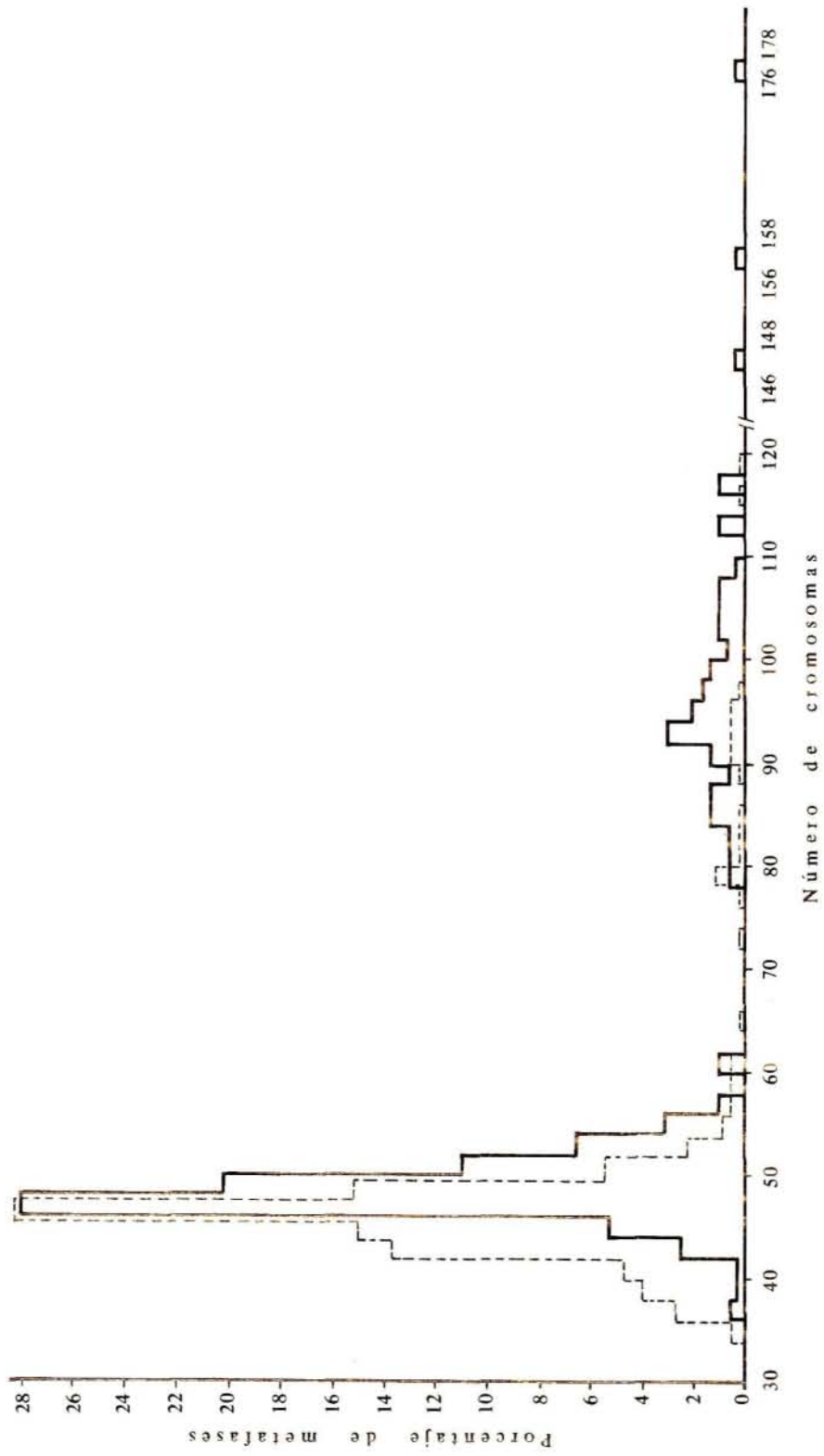
En nuestro estudio aparecieron siete cromosomas nuevos, de los cuales los más característicos son el cromosoma A: del (1) (q) y el F: t (? 1-2 q; 14q).

Levan (16) encontró también en la rata blanca el cromosoma 1 implicado en la formación de otros cromosomas, uno de ellos representado por un cromosoma 1 deletado del (1) (q35) en un tumor inducido químicamente con 3-4 benzopireno y el otro formado por una deleción intersticial, del (1) (cen \longrightarrow q 21) en un sarcoma inducido con 7-12 dimetilbenzo (α) antraceno. Además observó los cromosomas 3 y 5 implicados en la formación de cromosomas nuevos en tumores inducidos con las dos sustancias anteriores y una más, el 20-metil-colantreno.

La participación preferencial de algunos cromosomas en la formación de cromosomas nuevos tanto en los tumores espontáneos como en los inducidos, no es al azar. Los agentes oncogénicos pueden atacar regiones cromosómicas específicas y determinar los patrones cariotípicos de las células malignas (23).

En la aparición de cromosomas nuevos pueden participar mecanismos diferentes como translocaciones, inversiones, deleciones, translocaciones Robertsonianas, pero obligatoriamente se debe producir la fractura de uno o varios cromosomas seguido de reunión o no de los fragmentos (8, 11, 30).

Cada tumor tiene un patrón de cariotipo específico, diferente incluso de otros tumores originados en el mismo tejido u órgano (20). En general, casi todos los tumores presentan cromosomas nuevos, pero



hasta ahora han tenido carácter constante sólo el marcador Ph¹ (Philadelphia) característico de la mayoría de pacientes con leucemia crónica mieloide (2, 25, 31), el cual se ha presentado también en casos aislados de leucemia aguda linfocítica y leucemia aguda mieloide (1, 6, 26, 29, 37), y el marcador 14 q+ presente en la mayoría de pacientes con linfoma Burkitt (21).

En otros tumores aparecen y desaparecen estos cromosomas nuevos con la evolución del tumor. En nuestro caso, únicamente los cromosomas A y E se mantuvieron durante la evolución del tumor, los otros cinco aparecieron en su transcurso.

La conclusión a la que se ha llegado en varias investigaciones recientes es que la participación de los cromosomas en el desarrollo de la neoplasia no es un fenómeno al azar (9, 18, 22, 23, 24, 34). En un estudio hecho de 856 casos de 15 diferentes tumores humanos, se observó que las aberraciones cromosómicas tienden a agruparse en 12 cromosomas específicos del cariotipo (24).

Según los mismos autores, los cromosomas más frecuentemente afectados llevan material genético que posiblemente es importante para la regulación de la proliferación celular y que requiere ser manipulado en el proceso de transformación maligna. Resultados similares han sido obtenidos en tumores experimentales espontáneos e inducidos.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco su valiosa colaboración al Dr. Ioan Moraru, a la Dra. Liliana Georgian, a la Dra. Cornelia Geormaneanu, a las asistentes médicas Grapina Vrabie y Mariana Suba, del Instituto de Patología y Genética Médica Dr. Víctor Babes, Bucarest.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Ayraud, N., Dujardin, P. y P. Audoly. Leucémie aigüe lymphoblastique avec chromosome Philadelphie. Role probable d'une translocation 14-22. *Nouv. Presse Med.*, 4: 3013, 1975.

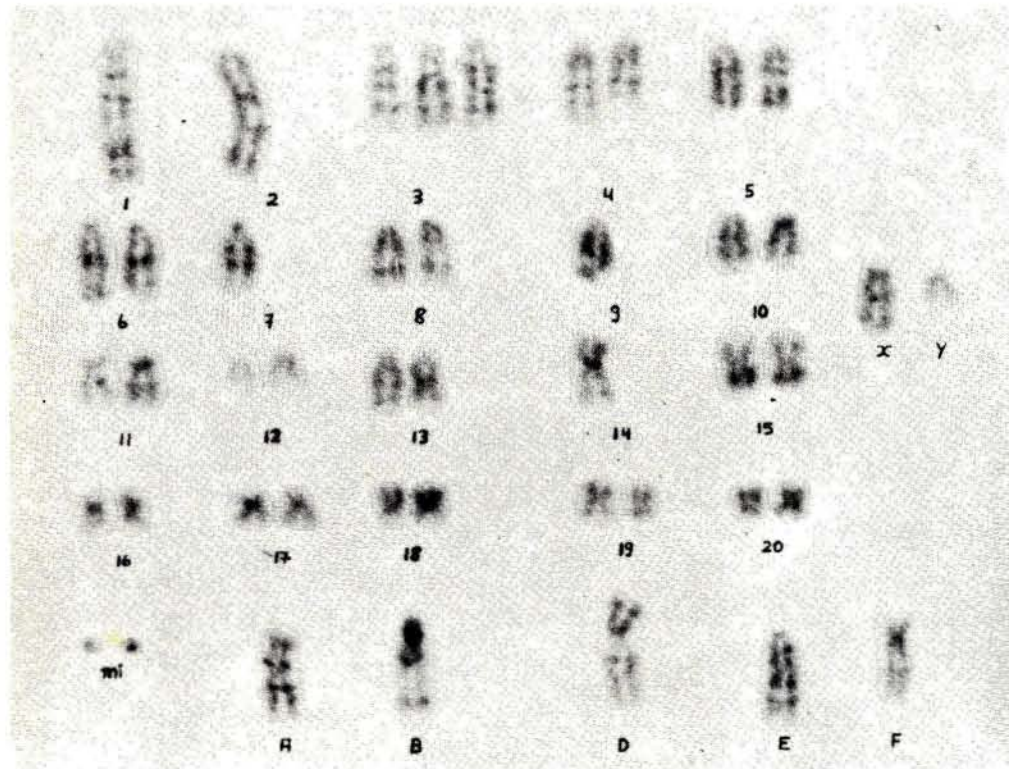


FIGURA 5

- 2.- Caspersson, T., Gahrton, G., Lindsten, J. y L. Zech. Identification of the Philadelphia chromosome as a number 22 by quinacrine mustard fluorescence analysis. *Exptl. Cell Res.*, 63: 238, 1970.
- 3.- Cirnu-Georgian, L. Analyse cytogénétique de l'ascite Guérin T 8 après cinq ans de passages en série. *Bull. de Cancer*, 58: 485, 1971.
- 4.- Committee for a Standardized Karyotype of *Rattus norvegicus*. *Cytogenet. Cell. Genet.*, 12: 199, 1973.
- 5.- Den Berghe, H. van, Louwagie, A., Broeckaert van Orshoven, A., David A., Verwilghen, R., Michaux, J.L. y G. Sokal. Philadelphia chromosome in human multiple myeloma. *J. Natl. Cancer Inst.*, 63: 11, 1979.
- 6.- Ford, C.E., Hamerton, L. y H. Mole. Chromosomal changes in primary and transplanted reticular neoplasms of the mouse. *J. Cell. Compar. Physiol.*, 52: suppl. 1: 235, 1958.
- 7.- Hardnden, D.G. The relationship between induced chromosome aberrations and chromosome abnormality in tumour cells. In: *Human Genetics. Excerpta Médica*, Amsterdam, p.p. 355-366, 1977.
- 8.- Hsu, T.C. Chromosomal evolution in cell populations. *Int. Rev. Cytol.*, 12: 69, 1961.
- 9.- Hsu, T.C., Billen, D. y A. Levan. Mammalian chromosomes in vitro. XV. Patterns of transformation. *J. Natl. Cancer Inst.*, 27: 215, 1961.
- 10.- Hauschka, T.S. y A. Levan. Cytologic and functional characterization of single cell clones isolated from the Krebs-2 and Ehrlich ascites tumors. *J. Natl. Cancer Inst.*, 21: 77, 1958.
- 11.- Hauschka, T.S., Grinnell, S.T., Revesz, L. y G. Klein. Quantitative studies on the multiplication of neoplastic cells in vivo. Influence of doubled chromosome number on the growth rate and final population size. *J. Natl. Cancer Inst.*, 19: 13, 1957.
- 12.- Koller, P.C. *The Role of Chromosomes in Cancer Biology*. Springer Verlag, New York, p.p. 7-87, 1972.
- 13.- Levan, A. The significance of polyploidy for the evolution of mouse tumors. Strains of the T A 3 mammary adenocarcinoma with different ploidy. *Exptl. Cell Res.*, 11: 613, 1956.
- 14.- Levan G. Nomenclature for G-bands in rat chromosomes. *Hereditas*, 77: 37, 1974.
- 15.- Levan, A. y J.J. Biesele. Role of chromosomes in cancerogenesis as studies in serial tissue culture of mammalian cells. *Ann. Y.Y. Acad. Sci.*, 71: 1022, 1958.
- 16.- Levan A. Levan G. y F. Mitelman. Chromosomes and cancer. *Hereditas*, 86: 15, 1977.
- 17.- Makino, S. y K. Kano. Cytological studies of tumors. IX. Characteristic chromosomal individuality in tumor strain cells in ascite tumors of rats. *J. Natl. Cancer Inst.*, 13: 1213, 1953.
- 18.- Makino, S., Sasaki, M.S. y A. Tonomura. Cytological studies of tumors. XL. Chromosome studies in fifty-two human tumors. *J. Natl. Cancer Inst.*, 32: 741, 1964.
- 19.- Manolov, G. y Y. Manolova. Marker band in one chromosome 14 from Burkitt lymphoma. *Naure*, 237: 33, 1972.
- 20.- Mark, J. Chromosomal abnormalities and their specificity in human neoplasms. An assessment of recent observations by banding techniques. *Adv. Cancer Res.*, 24: 165, 1977.
- 21.- Mitelman, F. Cytogenetics of experimental neoplasms and non-random chromosome correlations in man. *Clinics in Haematol.*, 9: 195, 1980.
- 22.- Mitelman, F. y G. Levan. Clustering of aberrations to specific chromosomes in human neoplasms. III. Incidence and geographic distribution of chromosome aberrations in 856 cases. *Hereditas*, 89: 207, 1978.
- 23.- Nowell, P.C. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukaemia. *Science*, 132: 1497, 1960.
- 24.- Oshimura, M. y A.A. Sandberg. Chromosomes and causation of human cancer and leukemia. XXV. Significance of the Ph¹ (including unusual translocations) in various acute leukemias. *Cancer*, 40, 1149, 1977.
- 25.- Pedersen, B. The karyotype evolution in chronic granulocytic leukaemia. I. The chromosomes gained and lost during initiation of the evolution. *Eur. J. Cancer*, 9: 503, 1973.
- 26.- Pedersen, B. The karyotype evolution in chronic granulocytic leukaemia. II. The chromosome and karyotype pattern of advanced evolution. *Eur. J. Cancer*, 9: 509, 1973.
- 27.- Propp, S. y F.A. Lizzi. Philadelphia chromosome in acute lymphocytic leukaemia. *Blood*, 36: 353, 1970.

- 28.— Raicu, P. *Genetica. Editura Didactica si Pedagogica, Bucuresti*, p.p. 353-404, 1974.
- 29.— Rowley, J.D. A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa stain. *Nature*, 243: 290, 1973.
- 30.— Rowley, J.D. Missing sex chromosomes and traslocation in acute leukaemia. *Lancet*, ii: 835, 1974.
- 31.— Rowley, J.D. Nonrandom chromosomal abnormalities in hematologic disorders of man. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 72: 152, 1975.
- 32.— Rowley, J.D. A possible role for nonrandom chromosomal changes in human hematologic malignancies. In: *Chromosomes Today*. Eds. A. De La Chappelle y M. Sorsa. Elsevier, North-Holland Biomedical Press, Amsterdam. p.p. 345, 1977.
- 33.— Sandberg, AA., Yamada, K., Kikuki, Y. y N. Takagi. Chromosomes and causation of human cancer and leukaemia. III. Karyotypes of cancerous effusions. *Cancer*, 20: 1099, 1967.
- 34.— Secker-Walker, L.M. y J.D. Hardy. Philadelphia chromosome in acute leukemia. *Cancer*, 38: 1619, 1977.
- 35.— Stenis, H. van. Chromosomes and cancer. *Nature*, 209: 811, 1966.