

El cultivo experimental de tejidos y su importancia en cancerología

por el doctor

Bofill Deulofeu

Profesor auxiliar de la Facultad de Barcelona

Es sobrado conocida la historia de la técnica de cultivo de tejidos, para que en una conferencia como la presente su exposición nos diera datos fundamentales e indispensables para la comprensión de los hechos relacionados con el tema de la misma.

Séanos permitido sólo recordar que, para conseguir cultivos duraderos de una o varias estirpes celulares, precisa guardar ciertas condiciones básicas e ineludibles como las siguientes:

1. *Asepsia*. — De una manera general y en condiciones corrientes, los tejidos implantados no están provistos de armas eficaces contra los microbios. Los medios de cultivo que se emplean para las células, constituyen un excelente material nutritivo para la mayor parte de los microorganismos. La multiplicación de las bacterias a 39° c., es mucho más rápida que la de los tejidos y es por ello que invaden el medio, frenando el crecimiento de las células.

2. *El soporte*. — El crecimiento de un fragmento de tejido (movimiento y multiplicación celulares) no es posible más que en presencia de un substrato o soporte sólido. Este hecho, establecido por LOEB y por HARRISON, constituye hoy un principio directivo al paso que una limitación del método. Si las células nadan en el seno de un medio nutritivo fluído, aceptan la forma esférica y dejan de multiplicarse (HARRISON, LEWIS). Situados en capa delgada sobre una superficie sólida (lámina de vidrio o de mica), se estiran, extienden y emigran sobre la misma, generalmente en capa monocelular. Pero la delgadez de dicha capa impide los trasplantes sucesivos sobre otras superficies sólidas.

Sobre y en el seno de un plasma coagulado, las células crecen y emigran con regularidad, se disponen en varias capas y no adhieren gran cosa a la superficie sólida sobre la que asienta el medio, lo cual hace comodísimos los sucesivos trasplantes. Los autores (CARREL, FISCHER, EPRHUSSI, STRANGWAYS, LAMBERT, etc.),

encontraron como explicación más plausible del hecho la admisión de la existencia de una red de fibrina, sobre la cual, apoyándose, emigrarían las células. Nosotros sometimos el hecho a un control experimental y llegamos a la conclusión de que no existía red alguna de fibrina en los coágulos examinados, pero sí una estructura micelar ultramicroscópica, a la cual se debería el crecimiento celular y por la cual se explicarían asimismo satisfactoriamente las observaciones de P. WEIS sobre las modificaciones que sobre el crecimiento de un cultivo imprimen los estados de tensión mecánica del medio.

3. *Las fuentes de energía.*—En el seno de una delgada capa de plasma se sitúa un fragmento de tejido, éste empieza a proliferar y a aumentar su masa, pero en un tiempo más o menos corto, según la naturaleza del tejido en cuestión, cesa toda actividad constructora de nueva materia viva. Esta actividad, que ha mostrado el fragmento gracias a la presencia de ciertas reservas nutritivas, se conoce con el nombre de *energía residual*.

Se ha procurado por todos los medios imaginables encontrar la naturaleza química de dichas reservas nutritivas. De los innumerables estudios realizados sobre el partícula, sólo se ha adquirido un hecho positivo, a saber, que dichas sustancias están contenidas abundantemente en los extractos de tejidos embrionarios, obtenidos por centrifugación de embriones reducidos a papilla. CARREL propone denominar "trefonas" a dichas sustancias complejísimas, contenidas en el extracto embrionario. De sus investigaciones analíticas parece desprenderse que pertenecen a las proteosas, productos hidrolíticos de las proteínas, caracterizados por un cierto valor de la relación $\frac{N \text{ amínico}}{N \text{ total}}$

4. *La eliminación de los excreta.*—Acabamos de indicar la significación que las sustancias nutritivas poseen para asegurar el crecimiento de verdaderos cultivos tisulares. Ahora debemos señalar que, aun dadas las condiciones óptimas de concentración de trefonas, los tejidos terminan por parar su crecimiento, si del medio en que viven no se separan los metabolitos de desecho. El método más eficaz para eliminarlos consiste en trasladar un fragmento de cultivo en un nuevo medio, previo lavado del tejido en una solución salina.

Esta manipulación se realiza cada 48 o cada 36 horas y comporta cada vez un traumatismo y una variación del volumen del tejido. Por este método es imposible obtener un crecimiento continuo y construir una curva única de crecimiento, extendida sobre un prolongado período de tiempo.

Es, sobre todo, por obviar dicho inconveniente que CARREL propone servirse de otra disposición, en la cual el medio comporta dos fases, una sólida (plasma coagulado), que contiene el tejido cultivado, y otra líquida, que baña continuamente la primera y que es fácilmente renovable. En las condiciones de esta nueva técnica (frascos de CARREL) se consigue el crecimiento continuo de un cultivo, el cual puede durar, para tejidos mesenquimatosos o epiteliales, hasta tres y cuatro semanas.

Toda una serie de esfuerzos (BURROWS, de Haan) han sido dirigidos para encontrar un sistema de irrigación continua. El interés de un tal sistema es evidente. Con todo, hoy por hoy, queda todavía por resolver. Nosotros creemos que es por esta vía que deben proseguir las investigaciones.

5. *Cultivos puros.*—Condición indis-

pensable para obtener resultados cuantitativamente reproducibles y comparables, único método científico de investigación posible, es trabajar con razas celulares puras. Dos métodos principales existen para conseguir las: uno anatómico, otro fisiológico. El primero se funda en la posibilidad, en ciertos casos, de aislar fragmentos de tejidos constituidos por una sola especie celular. Es por este método que FISCHER ha obtenido cultivos puros del epitelio del iris y que EBELING ha aislado el epitelio tiroideo.

El segundo método es de selección fisiológica. Se aprovecha la propiedad que ciertas células poseen, de desplazarse más rápidamente que otras, o de la mayor o menor sensibilidad (o resistencia) de una estirpe celular frente a un factor cualquiera. De esta manera se pueden cultivar las células del retículo esplénico en estado puro: las células amiboideas se desplazan rápidamente hacia la periferie, mientras que las del retículo permanecen juntas al fragmento central transplantado. Las células hepáticas se nutren bien con extracto embrionario calentado, mientras que en tales condiciones los elementos mesenquimatosos del hígado perecen, etc.

Hasta aquí hemos pasado revista de los grandes principios del método. Ahora vamos a ocuparnos de algunas particularidades de los cultivos de células neoplásicas malignas.

Los fibroblastos malignos

Antes de abordar la descripción de los fibroblastos malignos, procedentes de las diversas neoplasias, es necesario considerar los cultivos de fibroblastos que CARREL, en 1924, aisló del sarcoma de Peyton Rous de las gallinas. Como se sabe, este sarcoma fusocelular está constituido por células de

tipo fibroblástico, entre las cuales se encuentra una gran cantidad de células amiboides. CARREL ha intentado poner en claro el papel desempeñado por estas dos clases de elementos diferentes en la génesis del tumor. A tal fin trató de cultivar por separado las dos razas. Administrando a fragmentos del tumor, extracto embrionario en cantidad suficiente, se consigue hacer desaparecer por emigración las células amiboides y destruir las restantes eligiendo concentraciones adecuadas de extracto embrionario. De esta manera ha conseguido CARREL obtener una estirpe de fibroblastos procedentes del sarcoma de Rous y cultivada durante tres meses. Las inoculaciones de dichos fibroblastos a los animales sanos, sólo fueron positivas durante la primera semana; más adelante dejaron de aparecer los sarcomas de inoculación. Como por otra parte tanto el mismo CARREL como FISCHER demostraron que los elementos amiboides conservaban en cultivo indefinidamente la malignidad, concluyeron dichos investigadores que los fibroblastos del sarcoma de Rous no eran los elementos portadores de la malignidad, sino simplemente fibroblastos banales. La formación de sarcomas a partir de los cultivos jóvenes (1.ª semana), debe explicarse por la presencia sea de elementos de otra naturaleza sea por algunos fibroblastos enfermos que más tarde mueren o curan rápidamente.

Sarcoma 10 de la "Crocker Foundation". — Mientras en el sarcoma de Rous el elemento enfermo es el macrófago, en el de Crocker de la rata es el fibroblasto el que asume la malignidad.

Comparando los cultivos de fibroblastos, procedentes del sarcoma de Crocker, con los de fibroblastos de la rata normal, se constata que ambas clases de cultivos casi

no se distinguen desde el punto de vista morfológico. Como detalles diferenciales, sólo se han descrito una mayor refrangibilidad del protoplasma y un mayor tamaño de los fibroblastos malignos comparados con los normales.

La arquitectura de las colonias de fibroblastos sarcomatosos es idéntica a la de los normales. El límite de crecimiento de la colonia en presencia de extracto embrionario es mayor: los fibroblastos sarcomatosos no inhiben su crecimiento hasta los 10 a 12 días o sea hasta el momento que la colonia alcanza un diámetro de unos 15 a 20 milímetros, mientras que los fibroblastos normales de la rata no proliferan activamente más que hasta los 6 días alcanzando en este momento un diámetro de 8 a 10 milímetros.

La energía residual de las dos razas celulares medida por la duración de la vida y el crecimiento en ausencia de extracto embrionario se revela como sensiblemente igual en los dos casos.

Únicamente los fibroblastos sarcomatosos fluidifican el plasma de rata y producen alrededor de la zona de crecimiento una cantidad de ácido (revelada por el viraje del rojo de fenol añadido al medio de cultivo) incomparablemente superior a la producida por los fibroblastos normales. La concentración óptima de iones H., para la proliferación de los fibroblastos malignos, corresponde a un $\text{pH} = 7,5$, mientras que los fibroblastos normales presentan su crecimiento máximo con un $\text{pH} = 7,3 - 7,4$. Los fibroblastos sarcomatosos pueden ser mantenidos permanentemente en cultivo, mediante una mezcla de peptonas, péptidos y ácidos amínicos. Los ácidos amínicos solos, no son capaces de subvenir las necesidades nutritivas de los fibroblastos sarcomatosos. Pero si además de ácidos amínicos se añade glutatión, ceni-

zas de hígado y hemoglobina, entonces crecen por largo tiempo los fibroblastos malignos en tal medio sintético.

El fibroblasto maligno del sarcoma de Jensen.—Al igual que en el sarcoma de Crocker son los fibroblastos del sarcoma de Jensen los que acarrear los caracteres de malignidad. Estas células son muy sensibles al extracto embrionario que sólo toleran después de un período previo de adaptación. Los productos de la digestión de hígado de vaca constituyen el único medio en el cual los fibroblastos proliferan mejor que en el suero de rata.

El mixosarcoma de las gallinas.—KIMURA ha aislado y entretenido durante un tiempo considerable los elementos de otro tumor, un mixosarcoma de las gallinas, descrito en 1910 por FUJINAMI e INAMOTO. La estructura de esta neoplasia es casi idéntica a la de un mixosarcoma humano.

El tejido cultivado no se distingue de los fibroblastos ordinarios; la única diferencia, consiste en una producción abundante de sustancia intercelular mucosa. KIMURA ha podido mantener durante tres meses una línea de cultivos del mixosarcoma que nos ocupa. Durante todo el tiempo, los cultivos conservaron su malignidad.

Cultivos de Carcinoma. — La técnica que A. Fischer ha elaborado para el cultivo de células carcinomatosas, está fundada sobre el mismo principio que el cultivo del sarcoma de Rous. La primera estirpe constituida por FISCHER proviene de un adenocarcinoma del ratón blanco (estirpe de Frankfurt, carcinoma de Ehrlich). El cultivo se realiza en un medio compuesto a partes iguales de una mezcla de 75 % de plasma de rata, 25 % de plasma de gallina

y extracto embrionario o proteosas: esta mezcla permite un buen crecimiento de las células carcinomatosas y presenta al propio tiempo la ventaja de no fluidificarse por la acción fermentativa de las células malignas. El crecimiento se hace todavía mejor si se añaden fragmentos de tejido homo o heterólogo al cultivo. Estos fragmentos de tejido son muy rápidamente destruidos por las células del carcinoma, las cuales se infiltran casi siempre en for-

ma de gruesos cordones. Debe hacerse notar que la malignidad no depende de la presencia de estroma, puesto que se cultivan epitelios puros con malignidad manifiesta. Interesante es el hecho de que los epitelios normales formen cultivos dotados de mucho más rápido crecimiento que los cultivos cancerosos. FISCHER lo explica admitiendo que las células cancerosas, mucho más lábiles que las normales, mueren y degeneran.