

TRABAJOS ORIGINALES

CULTIVO *IN VITRO* DE TUMOR DEL CUERPO CAROTIDEO*

DRES. ISAAC COSTERO**
Y AGUSTÍN Z. CHÉVEZ**

HACE pocos meses llegamos al convencimiento de que el llamado tumor del cuerpo carotídeo conserva los caracteres anatómicos de receptor nervioso, y está perfectamente organizado en una estructura tan intrincada como la del cuerpo carotídeo normal.¹ Desde entonces planeamos aprovechar todas las oportunidades que se nos ofreciesen para cultivar el tumor *in vitro*. Como ya hemos explicado en otro lugar,² la técnica de las explantaciones resulta de gran utilidad para desentrañar estructuras complejas, ya que las células cultivadas se separan lentamente unas de otras y presentan así, bajo el microscopio, su morfología y sus relaciones recíprocas en simplificación progresiva. Al cabo de algunas semanas, las células cultivadas se han adaptado a las condiciones experimentales y sólo conservan ciertas cualidades morfológicas al mismo tiempo que desarrollan formas peculiares de motilidad. En los cultivos que no sobrepasan los 100 días de supervivencia, morfología y movimientos celulares pueden considerarse como intrínsecos de cada variedad celular.

OBSERVACIONES

Durante los 6 primeros días de cultivo los fragmentos explantados no sufren modificaciones dignas de mención; aquí y allá, en contados lugares, emergen unos muy pocos elementos mesenquimatosos con caracteres de fibroblastos, o asoma eventualmente alguna célula amiboidea, ya sea linfocito o macrófago. El esponjamiento que de ordinario presentan los tejidos explantados durante estos sus primeros días *in vitro* es mínimo en el caso del tumor carotídeo. La emigración de elementos mesenquimatosos y amiboideos se establece firmemente durante la segunda semana de supervivencia, y continúa después en forma normal, pero siem-

* Trabajo de Sección (Anatomía e Histología patológicas), leído por su autor en la sesión del 14 de marzo de 1962.

** Del Departamento de Anatomía Patológica del Instituto Nacional de Cardiología.

pre con moderada intensidad. En rigor llama la atención que los cultivos de quimiodectoma yuxtacarotídeo proporcionan pocos fibroblastos, linfocitos y macrófagos ordinarios.

CÉLULAS PRINCIPALES

Unas pocas células principales del tumor se desarrollan en los bordes de los fragmentos explantados, en contacto inmediato con el medio de cultivo; pero en número mucho mayor crecen perfectamente cuando quedan independientes del fragmento matriz, ya sea aisladas, ya formando pequeños grupos. A propósito de esta interesante característica histofisiológica del quimiodectoma yuxtacarotídeo conviene señalar que se trata de un tumor encefaloide muy jugoso. Por bien afilada que esté la cuchilla y aunque se corte con el mayor cuidado, durante la disección de la neoplasia se desprende gran cantidad de serosidad turbia, constituida por líquido intersticial en el que flotan numerosas células. Precisamente estas células desprendidas con tan poco esfuerzo durante las maniobras de la disección resultan las más adecuadas para desarrollarse *in vitro*. Por ello conviene incluso exprimir el tumor suavemente y sembrar gotitas del jugo intersticial así obtenido, cosa fácil si se usa una pipeta fina.

Todas las células principales que quedan aisladas en el medio de cultivo tienen al principio forma esferoidal. No se adaptan por estereotropismo a la superficie lisa del cubreobjetos, tal como lo hacen de ordinario las demás variedades celulares; y por ello brillan intensamente cuando se las ilumina con el sistema de contraste de fases, o que facilita su visualización aun a pequeños aumentos.

En cualquier momento del desarrollo en los cultivos, las células principales esféricas pueden emitir una prolongación densa y perfectamente definida, que crece como si fuera cilindroeje (Harrison²⁹); esto es, mediante movimientos protoplásmicos iniciados en forma de delicados filipodios. En algunos de nuestros registros cinematográficos la velocidad de crecimiento longitudinal de una de dichas prolongaciones se calculó en 0.6 mm. en 24 horas. Se originan así característicos elementos monopolares, idénticos a los descritos por nosotros en los cortes histológicos. Sólo cuando la prolongación alcanza gran longitud puede mostrar dos o tres dicotomías, pero de ordinario se mantiene la célula como rigurosamente monopolar durante toda su supervivencia *in vitro*. Merece la pena señalar que la prolongación emitida durante el cultivo por las células principales del tumor, inicialmente redondas, alcanza a menudo 0.40 mm. sin dividirse, lo que representa aproximadamente 35 veces al diámetro medio del pericarion. En algunas de nuestras preparaciones, la prolongación de una sola célula midió 1.5 mm. de longitud, lo que corresponde a más de 120 veces al diámetro del cuerpo celular; esta larga prolongación se dividía en dos ramas a 0.78 mm. del núcleo, cada una con longitudes semejantes, de 0.68 mm. y de 0.60 mm.

Resulta bastante común descubrir células que emiten sendas prolongaciones opuestas. Estamos entonces ante las dos posibilidades siguientes.

1) Se trata de una sola célula bipolar; su prolongación más larga y vigorosa es capaz de crecer activamente, aumentando en longitud durante varios días en dirección centrífuga con relación al fragmento matriz. La otra prolongación, en cambio, surge más por estiramiento del protoplasma somático que por crecimiento verdadero. Son células principales que se desplazan en los cultivos desde el fragmento matriz hacia el medio, de la manera descrita por Hogue^{9,10} y Costero y Pomerat¹² para las neuronas y los astrocitos en los cultivos de tejido nervioso humano normal. En otras palabras, son células principales emigrantes que se desprenden de los bordes del tejido explantado. Su forma bipolar es transitoria pues, tan pronto como se establecen en el cultivo y la emigración cesa, recogen en pocas horas su prolongación centripeta y quedan sólo con la centrífuga; todo el proceso de dicha retracción fue registrado cinematográficamente. No sólo se distinguen las dos prolongaciones de estas células emigrantes por su estructura, su duración y su curso diferentes, sino también por el lugar de donde parten, ya que la prolongación permanente nace casi siempre de la porción citoplásmica del cuerpo celular, es decir, del polo opuesto al que contiene el núcleo excéntrico.

2) Las dos prolongaciones que crecen en sentido opuesto son equivalentes y pertenecen a diferentes células principales cuyos cuerpos están tan próximos entre sí que resulta difícil reconocer sus límites, en ciertos casos aun usando preparaciones coloreadas. El comportamiento posterior de estas células bipolares espurias aclara con seguridad su doble composición, ya que las células tienden a separarse con el tiempo o, al menos, a señalar sin dudas sus límites recíprocos.

En relación con la forma de desarrollo de las células principales del tumor carotídeo que aparecen en los cultivos formando asociaciones, conviene señalar otra circunstancia que les es peculiar: la notable tendencia a que las prolongaciones, originadas en células diferentes aunque vecinas inmediatas, se adosen íntimamente durante todo o gran parte de su trayecto. Si no se observa la imagen con mucho interés, parece una sola célula con prolongaciones mucho más vigorosas que las demás. Análisis cuidadoso, observación durante varios días o registro cinematográfico demuestran su composición multicelular. Este adosamiento de las prolongaciones es con frecuencia perfecto; sólo a veces puede distinguirse con el contraste de fases, mejor aún con las impregnaciones argénticas, que la prolongación no es simple en ninguna parte de su trayecto; esto es, que se trata de adosamiento y no de fusión. Pero en la mayoría de los casos debe esperarse a que la evolución natural del cultivo separe las células para comprobar la naturaleza fasciculada de la prolongación común.

Grupos celulares de mayor tamaño que los mencionados hasta ahora sobreviven rara vez en los cultivos. Sin embargo, los hay con más de 20 células de los

que parten 4 o 6 troncos de prolongaciones en direcciones divergentes. Estas agrupaciones representan lobulillos del tumor que se conservaron casi completos en el medio de cultivo y nos volveremos a ocupar de ellos más adelante. Son como una especie de minúsculo fragmento matriz perfectamente conservado, y de ellos se desprenden algunas células principales.

No podemos terminar la descripción del comportamiento de las células principales del quimiodectoma en los cultivos, sin mencionar que, cuando se registran sus movimientos en películas cinematográficas impresionadas a la velocidad de 1 a 4 imágenes por minuto se comprueba, por una parte, la falta de movimientos activos de traslación y, por otra parte, la existencia de contracciones pulsátiles. Sólo en el momento de abandonar el fragmento matriz, las células principales pueden desplazar lentamente el cuerpo celular, que contiene el núcleo, a lo largo de la prolongación centrífuga, en tanto desarrollan una prolongación centrípeta transitoria que luego recogen, lo que les permite salirse al medio de cultivo. Otros movimientos de reptación semejantes a los descritos por Hogue⁹ en las neuronas se pueden ver también en algunas células principales cultivadas.

De especial interés son los movimientos pulsátiles que, en las células principales del quimiodectoma, son muy semejantes a los de la oligodendrogía (Canti, Bland y Russell,⁵ Lumsden y Pomerat⁷). Parece que otras células neurogénicas tienen también movimientos semejantes, aunque no tan intensos, en especial los astrocitos del sistema nervioso central (Pomerat⁸) y las células de Schwann de los nervios periféricos (Pomerat⁴⁶). En el caso del quimiodectoma yuxtacarotídeo, los movimientos pulsátiles se desarrollan rítmicamente en el polo protoplásmico del pericarion y no jalan de la prolongación, como parece suceder en la oligodendrogía, sino que desplazan el citoplasma somático hacia la expansión inyectando en ella las mitocondrias y pequeñas granulaciones, que así las recorrerán continuamente en dirección distal. Aparentemente la zona protoplásmica de estructura granulosa, con frecuencia aurófila y de figura como estrellada que ocupa gran parte del polo protoplásmico del cuerpo celular, actúa como un centro contráctil de la célula. Un análisis delicado de los movimientos pulsátiles rítmicos de las células principales de los quimiodectomas merece más amplias investigaciones.

CÉLULAS AMIBOIDEAS GRANULOSAS

Si las células principales del quimiodectoma yuxtacarotídeo se reconocen fácilmente en los cultivos *in vitro*, no sucede lo mismo con las células argentafines. Del fragmento matriz emigran a veces importante número de células amiboideas de gran tamaño, cargadas con granulaciones muy brillantes al contraste de fases y aparentemente distintas de los macrófagos ordinarios. Estos, cargados de grasa, pigmento hemático u otras sustancias de origen extracelular, son relativamente escasos en los cultivos de tumor carotídeo.

Cualidades morfológicas presentes en las células granulosas que les acercan a las células argentafines son las siguientes:

a) Las granulaciones pueden pegnarse con soluciones amoniacaes de plata en condiciones semejantes a las de argentafinidad.

b) Los movimientos de traslación son mínimos, sobre todo si se comparan con los movimientos de gesticulación, que son intensos, variados y continuos.

c) El polimorfismo es notable; tan pronto aparecen con granulaciones de tamaño variable y formas pseudopódicas, como con endoplasma granuloso y exoplasma hialino repartido en prolongaciones múltiples y profusamente ramificadas, o se muestran alargadas como células en bastoncito (Río Hortega³⁰) o con formas angulosas recordando las de los fibroblastos. Es posible que la falta de técnicas adecuadas, en cuya búsqueda estamos ahora trabajando, no nos permita distinguir si entre estas células granulosas existen dos o más variedades celulares.

d) Las células pseudopódicas emiten amplias membranas ondulantes parecidas a las de los macrófagos ordinarios, mientras que las otras tres variedades morfológicas descritas se parecen más, en las películas cinematográficas, a la microglía y a las células de los cultivos de neurinoma (células tipo B de Antoni³¹) también presentes en los neurofibromas (Río Hortega³²).

FIBRAS BULBOSAS

La presencia de fascículos de fibras largas, delgadas, con frecuencia moniliformes, da a algunos de los cultivos de quimiodectoma claro parecido con los de tejido nervioso. Dichas fibras nacen de células principales situadas en los bordes del fragmento matriz y recorren considerables distancias. A diferencia de las fibras nerviosas, las del quimiodectoma tienden a formar troncos gruesos por adosamiento de varias prolongaciones semejantes, según quedó explicado antes.

DISCUSIÓN

Después de nuestro trabajo anterior¹ y de los resultados del cultivo *in vitro* del quimiodectoma yuxtacarotídeo, parece inadecuado considerar al tumor como formado por estructuras endocrinas.

Si las células argentafines segregan alguna substancia, si tal substancia interviene en la función específica del receptor, y cual sea su papel particular en caso afirmativo, son problemas cuya solución completará el conocimiento histofisiológico del órgano sin alterar su naturaleza neurogénica.

La presencia de células principales esferoidales y apolares en el medio de cultivo plantea la posibilidad de que existan también en el tumor, es decir, que las células principales del quimiodectoma sean monopolares y apolares. Esta posibilidad es difícil de comprobar en los cortes histológicos, donde todas las células

principales parecen monopolares; por ello nos parece más probable que las células esféricas de los cultivos representen un artefacto, y pensamos que pudieron perder su prolongación durante las maniobras de la siembra.

Un hecho bien singular es el adosamiento de las prolongaciones; revisando los cortes histológicos, en los que nos pasó inadvertido, comprobamos que también en ellos se produce con notable frecuencia. Las prolongaciones adosadas no se funden ni se trenzan, sino que recorren largos trayectos paralelas entre sí e íntimamente ensambladas hasta parecer una sola fibra relativamente gruesa. Sin duda el adosamiento de las prolongaciones contribuye también a formar largos fascículos translobulillares presentes en los cortes histológicos de quimiodectoma.

Nunca hemos descubierto en los cultivos fibras nerviosas.

Los movimientos pulsátiles de las células principales cultivadas *in vitro* no tienen interpretación que nos parezca posible. Los semejantes de la oligodendroglía y de los anficitos han sido considerados por Pomerat⁸ como "might afford an important mechanism for the local movement and transport of the tissue juices influencing the nutritional state of the axoplasm and for the maintenance of optimal physicochemical conditions in the adjacent myelin sheath. The possibility that amphyocytes in peripheral ganglia are actually oligodendroglia which may also pulsate extends the suggestion that satellite cells may produce a massaging effect of importance to the movement of metabolites in the area of the neuronal perikaryon". Puesto que las células quimiorreceptoras no abrazan a cilindroejes ni a neuronas, como lo hacen oligodendroglía y anficitos, podría extenderse la teoría mecánica de Pomerat suponiendo que la pulsación rítmica del cuerpo celular favorece en los quimiorreceptores las corrientes plasmáticas en su prolongación que, por su exquisita sensibilidad a la hipoxia, debe necesitar de rápido recambio metabólico. Pero estas ideas no pasan por el momento de ser puramente especulativas, ya que no tenemos aún confirmación de lo que sucede a los movimientos contráctiles *in vivo*.

REFERENCIAS

1. Costero, I. y aBrosso Moguel, R.: "Structure of the carotid body tumor". *Am. J. Path.*, 1961, 38: 127-141.
2. Costero, I., Pomerat, C. M., Jackson, I. J., Barroso Moguel, R., y Chévez, A. Z.: "Study of meningioma cells." *J. Nat. Cancer Inst.*, 1955, 15: 1319-1339.
3. Lembeck, F.: "5-Hydroxytryptamine in a carcinoid tumor. Letter to the editor." *Nature*, London, 172: 910-911, 1953.
4. De Castro, F.: "Sur la structure de la synapse dans les chemocepteurs, leur mécanisme d'excitation et rôle dans la circulation sanguine locale." *Acta. physiol. scand.*, 1951, 22: 14-43.
5. Canti, R. G., Bland, J. O. W., y Russell, D. S.: "Tissue culture of gliomata. Cinematograph demonstration." *Proc. Ass. Res. Nerv. & Ment. Dis.*, 1935, 16: 1-24.
6. Lumsden, C. E., y Pomerat, C. M.: "Normal oligodendrocytes in tissue culture." *Exper. Cell Res.*, 1951, 2: 103-114.
7. Pomerat, C. M.: "Pulsatile activity of cells from the human brain in tissue culture." *J. Nerv. & Ment. Dis.*, 1951, 114: 430-440.

8. Hogue, M. J.: "The movement of human fetal brain cells in tissue cultures." *Ant. rec.*, 1947, 97: 344.
9. Costero, I.: "Experimentelles Nachweis der morphologischen und funktionellen Eigenschaften und des mesodermischen Characters der Mikroglia." *Zeitschr. ges. Neurol. Psychiat.*, 1931, 132, 371-406.
10. Costero, I., y Pomerat, C. M.: "Cultivation of neurons from the adult human cerebral and cerebellar cortex." *Am. J. Anat.*, 1951, 89: 405-468.
11. Pomerat, C. M., y Costero, I.: "Tissue cultures of cat cerebellum." *Am. J. Anat.*, 1956, 99, 211-248.
12. Geschickter, C. F.: "Tumors of the peripheral nerves." *Am. J. Cancer*, 1935, 25: 377-410.
13. Murray, M. R.: "Demonstration of Schwannian origin of tumors of the nerve sheaths". *Arch. Neurol. Psychiat.*, Chicago, 1939, 42, 1175.
14. Murray, M. R., y Stout, A. P.: "Characteristics of human sympathetic ganglion cells cultivated in vitro." *Anat. Rec.*, 1942, 89: 492.
15. Murray, M. R., y Stout, A. P.: "The glomus tumor. Investigations of its distribution and behavior, and the identity of its «epithelioid» cells". *Am. J. Path.*, 1942, 18: 183-203.
16. Murray, M. R., y Stout, A. P.: "Characteristics of the sympathicoblastoma cultivated in vitro." *Cancer Res.*, 1946, 6: 501.
17. Murray, M. R., y Stout, A. P.: "A sympathetic ganglioneuroma cultivated in vitro." *Cancer*, New York, 1948, 1: 242-247.
18. Murray, M. R., y Stout, A. P.: "The classification and diagnosis of human tumors by tissue culture methods." *Texas Rep. Biol. and Med.*, 12: 898-915, 1954.
19. Stout, A. P., y Murray, M. R.: "Neuroepithelioma of the radial nerve with a study of its behavior in vitro." *Rev. canad. biol.*, 1941, 1: 651-659.
20. Cameron, G.: *Tissue Culture Technique*. New York Acad. Press Inc., 1950.
21. Rose, G.: "A separable and multipurpose tissue culture chamber." *Texas Rep. Biol. and Med.*, 12: 1074-1083, 1954.
22. Rose, G.: "A separable and multipurpose tissue culture chamber." *Texas Rep. Biol. logical Histology including Directions for the Performance of Autopsies and for Microphotography*. W. B. Saunders Co., Philadelphia and London, 1936.
23. Del Río Hortega, P.: "El método del carbonato argéntico. Revisión general de sus técnicas y aplicaciones en histología normal y patología." *Arch. Histol. norm. y pat.*, 1: 165-205, 329-361, 1942-1943; 2: 231-244, 577-604, 1943-1945. Buenos Aires.
24. Maximov, A. A.: "The cultivation of connective tissue of adult mammals in vitro." *Arch. anat. histol. embriol.*, 1916, 1: 105-162.
25. Lewis, W. H.: "Macrophages and other cells of the deep fascia of the thigh of the rat." *Carnegie Inst. Wash. Contrib. Embryol.*, núm. 116, 1929, 20: 193-212.
26. Paff, G. H., Bloom, F., y Reilly, C.: "The morphology and behavior of mast cells obtained from mastocytomas and cultivated in vitro." *Anat. Rec.*, 1947, 97: 360.
27. Paff, G. H., Montagna, W., y Bloom, F.: "Cytological studies of normal, and tumor cast cells in tissue and in vitro." *Cancer Res.*, 1947, 7: 798-801.
28. Harrison, R. G.: "The outgrowth of the nerve fiber as a mode of protoplasmic movement." *J. Exper. Zool.*, 1910, 9: 787-846.
29. Pomerat, G. M.: Personal communication.
30. Del Río Hortega, P.: "La microglia y su transformación en células en bastoncito y en cuerpos granuloadiposos." *Trab. Lab. Invest. biol. Univ. Madrid*, 1920, 18: 37-83.
31. Weiss, P., y Hsi, Wang: "Transformation of adult Schwann cells into macrophages." *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 58: 273-275, 1945.
32. Antoni, N. R. E.: *Ueber Rückenmarkstumoren und Neurofibrome Studien zur pathologischen Anatomie und Embryogenese (mit einem klinischen Anhang)*. J. F. Bergmann, München und Wisbaden, 1920.
33. Del Río Hortega, P.: "Estudio citológico de los «neurofibromas» de Recklinghausen (lemmocitomas). I. Células específicas." *Arch. Histol. norm. path.*, 1942, 1: 373-414.
34. Mulligan, R. M.: "Chemodectoma in the dog." (Abstract). *Am. J. Path.*, 1950, 26: 680-681.
35. Von Euler, U. S., y Liljestrand, G.: "Chemical stimulation of the carotid sinus and the regulation of respiration." *Skand. Arch. Physiol.*, 1936, 74: 101-127.

36. Alvarez-Buylla, R.: "Estudio oscilográfico de la actividad eléctrica de los quimiorreceptores del seno carotídeo en el perro." *An. Esc. Nac. Cien. Biol.*, 6: 161-173, 1950.
37. Alvarez-Buylla, R.: "Actividad quimiorreceptora del seno carotídeo." *Arch. Inst. Cardiol. Méx.*, 21: 408-421, 1951. Lab.
38. Alvarez-Buylla, R.: "Importancia fisiológica de las zonas reflexogénicas del seno carotídeo." Symposium sobre el tumor del cuerpo carotídeo. *Gaceta Méd. México*, 1960, 90: 671-677.
39. Glenner, G., Crout, J. R., y Roberts, W. C.: *Arch. Path.* (en prensa).
40. Marchand, F.: "Beiträge zur Kenntnis der normalen und pathologischen Anatomie der Glandula carotica und der Nebennieren." *Internat. Beitr. wiss. Med., Festschr. Virchow*, 1891, 1: 38-71.
41. Holmgren, H., y Wilander, O.: "Beitrag zur Kenntnis der Chemie und Funktion des Ehrlichschen Mastzellen." *Zeitschr. mikr. anat. Forsch.*, 1937, 42: 242-288.
42. Riley, J. F., y West, G. B.: "The presence of histamine in tissue mast cells." *J. Physiol.*, 1953, 120: 528.
43. Hebdon, A., y Snellman, O.: "Isolation and analysis of the large cytoplasmic granules of tissue mast cells." *Exper. Cell. Res.*, 1955, 9: 148.
44. Donald, K. W.: "Oxygen poisoning in man." *Brit. Med. J.*, 1947, 1: 667-672, 712-717.
45. Heymans, C., y Neil, E.: *Reflexogenic Areas of the Cardiovascular System*. J. A. Churchill, Londres, 1958.
46. Meijling, H. A.: "Bau und Innervation von Glomus caroticum und Sinus caroticus." *Acta Neerland. Morph.*, 1938, 1: 193-288.
47. Martínez, M.: "Contribución a la histología normal y patológica del globo carotídeo." *Bol. Soc. Biol. Concepción (Chile)*, 1939, 13: 107-131.
48. Hollinshead, W. H.: "A cytological study of the carotid body of the cat." *Am. J. Anat.*, 1948, 73: 185-214.