

## EL LINFOMA VENEREO CANINO COMO MODELO DE CANCER EXPERIMENTAL<sup>1</sup>

HÉCTOR MÁRQUEZ-MONTER<sup>2</sup>

Se presenta el estudio experimental de cuatro linfomas venéreos caninos. El estudio histológico y de ultraestructura señala su histogénesis como de células reticulares malignas, por lo que debe llamarse reticulosarcoma. Además, se identificaron partículas semejantes a virus en algunas células neoplásicas y fenómenos de citolisis y autofagia. El estudio citogenético del tumor demostró un número modal y cariotipo semejante al descrito en otras localidades geográficas. Se describe la asociación nuclear de un cromosoma heteroploidico, probablemente marcador, en células neoplásicas en profase.

El estudio inmunológico no demostró la producción de globulinas anormales en el huésped por el tumor, pero se encontró abundante gamaglobulina entre las células tumorales. Finalmente, la actividad reproductiva de las células del tumor, medida por el método autorradiográfico, se consideró elevada y sólo compensada por la citolisis producida probablemente por mecanismos inmunes del huésped o por efecto citocida de un probable virus. (GAC. MÉD. MÉX. 100: 168, 1970).

**E**L LINFOMA venéreo canino o sarcoma venéreo del perro es el tumor transplantable más antiguo.<sup>1</sup> Este tumor fue transplantado en forma experimental por Novisky en 1877 y los resultados de este estudio fueron objeto de su tesis profesional.<sup>2,3</sup> Posteriormente Wehr en 1888 confirmó estos experimentos,<sup>4</sup> y Sticker en 1904 lo caracterizó histoló-

gicamente, de ahí que se le conozca también como sarcoma de Sticker.<sup>5</sup>

Se trata de una neoplasia constituida por células reticulares con tendencia a la diferenciación a linfocitos y células plasmáticas. En la mayoría de los casos el tumor se localiza en la vulva y vagina en la hembra y en el pene en el macho; permanece localizado en este sitio y sólo en un número reducido se disemina y causa la muerte del animal.<sup>6</sup> Su transmisión es por contacto sexual y es posible su trasplante a animales

<sup>1</sup> Trabajo de ingreso a la Academia Nacional de Medicina, presentado en la sesión ordinaria del 15 de octubre de 1969.

<sup>2</sup> Académico numerario, Departamento de Investigación Científica, Instituto Mexicano del Seguro Social.

jóvenes por implantación subcutánea de células.<sup>7</sup> La evolución del tumor es generalmente a la curación espontánea, la cual se ha explicado como debida a un rechazo de tipo inmune por parte del huésped.<sup>8</sup>

Aun cuando se acepta generalmente que se trata de un tumor transplantable, existe todavía la duda acerca de

#### MATERIAL Y MÉTODOS

Se obtuvieron biopsias excisionales de cuatro linfomas venéreos en tres perros y un perro, todos de raza indeterminada, pertenecientes a la División de Cirugía Experimental del Departamento de Investigación Científica del Centro Médico Nacional (Figs. 1 y 2).

Para el estudio histológico, las biop-

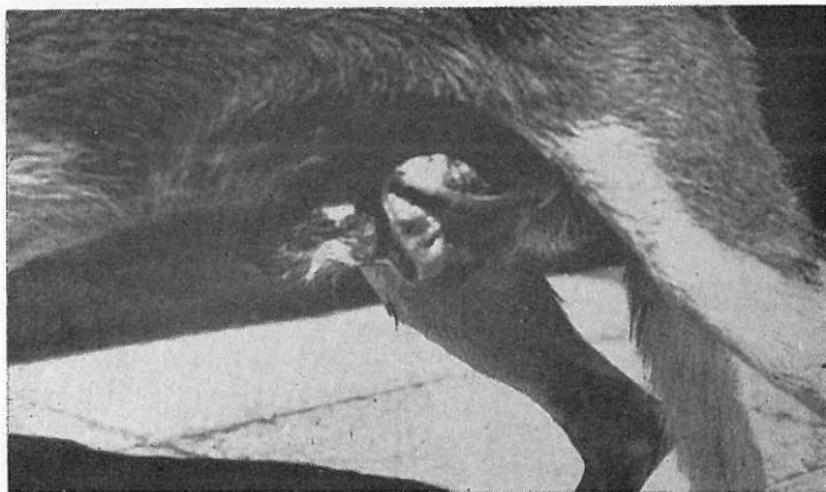


FIG. 1. Aspecto macroscópico de un linfoma venéreo en el pene de un perro.

su etiología viral. Además, su comportamiento peculiar en el sentido de establecer un equilibrio entre el huésped y un tumor maligno, constituyen problemas que merecen la aplicación de técnicas modernas para su estudio.

La existencia de este tipo de tumor en México,<sup>9</sup> ha motivado su estudio como modelo de cáncer experimental, en su aspecto histológico, ultraestructural, citogenético e inmunológico.

Las biopsias se fijaron en formol amortiguado a un pH de 7, y se incluyeron en forma rutinaria en parafina, para tinciones con hematoxilina y eosina, retículo, azul de toluidina a pH 5 y ácido periódico-Schiff. Para el estudio con microscopio electrónico, se subdividieron los fragmentos en pequeños cubos de 2 mm<sup>3</sup>, los que se fijaron de inmediato en tetróxido de osmio de acuerdo con el método de Milloning.<sup>10</sup> Después de

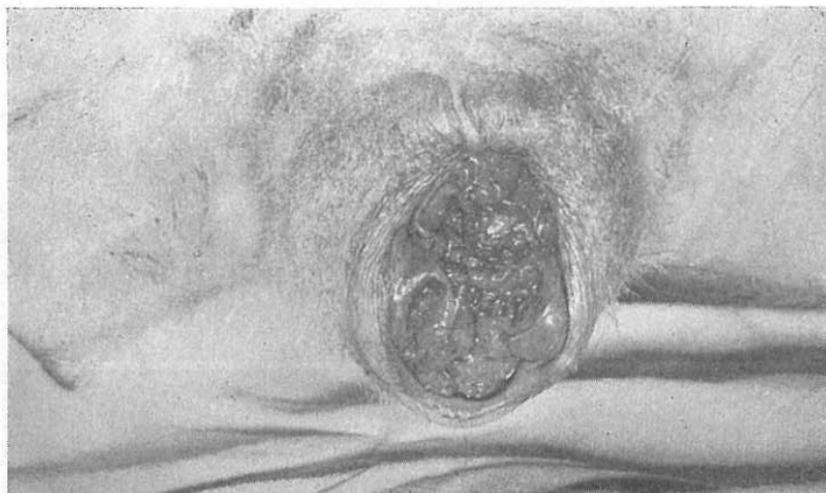


FIG. 2. Linfoma venéreo en la vulva de una perra. Nótese el aspecto vegetante y nodular del tumor. Este animal y el anterior tienen una evolución aproximada de tres y seis meses, respectivamente.

fijados se deshidrataron en alcoholes de concentración ascendente y se incluyeron en Epon-Araldita en forma convencional. Algunos fragmentos se incubaron en medio F-10 por tres días con objeto de acentuar el estado de citolisis y así favorecer el desenmascaramiento de un posible virus.

Otros fragmentos frescos del tumor se utilizaron para el estudio citogenético por el método directo. Este consiste en la fragmentación fina del tumor para obtener dispersión de células aisladas, su incubación en medio F-10 con Colcemid por 2:30 horas y posteriormente en una solución hipotónica de ClK al 0.3% por 20 minutos, fijación subsecuente en Carnoy y elaboración de frotis por secado al aire y tinción con colorante de Giemsa. El

control cromosómico normal se hizo mediante el cultivo de linfocitos hemáticos de los mismos animales, según modificación al método de Moorhead y colaboradores.<sup>11</sup>

Para el estudio inmunológico se empleó el método de inmunoelectroforesis utilizando suero de perros portadores del tumor y medio de cultivo en donde se habían incubado células tumorales, contra antisuero anticanino de conejo. El método inmunofluorescente de Coons<sup>12</sup> se empleó con gamaglobulina anticanina de conejo, marcada con isotiocianato de fluoresceína, sobre cortes frescos del tumor hechos a 4 micras en un criotomo American Optical, para determinar la presencia de gamaglobulina canina en células tumorales.

Finalmente, para determinar la ac-

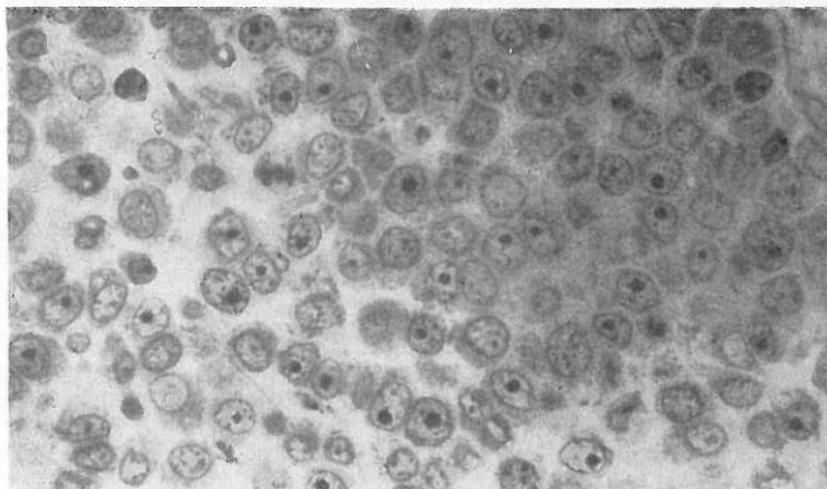


FIG. 3. Microfotografía del tumor de un corte a  $2 \mu$  de material incluido en Epon-Araldita. Existe uniformidad de los núcleos vesiculares con cromatina grumosa y nucléolos prominentes; en el campo se observa una mitosis. Tinción de azul de toluidina X25.

tividad reproductiva de las células tumorales, se incubaron éstas con timidina tritiada New England Nuclear a concentración de  $1 \mu\text{Ci/ml}$  de medio F-10 por 4 horas; después de fijadas se procesaron por el método convencional de autorradiografía con emulsión Kodak NTB3. Para expresar los resultados se tabularon células marcadas y no marcadas por el isótopo, en forma porcentual.

#### RESULTADOS

*Histología y ultraestructura.* En algunos cortes del tumor se incluyó pared vaginal, la cual estaba constituida por epitelio plano estratificado atrófico. El tumor estaba formado por células redondas o irregularmente poliédricas, de núcleos redondos, vesiculosos, con cro-

matina grumosa y nucléolo prominente. Algunas células presentaban abundante citoplasma basófilo y núcleo excéntrico que recordaban la forma de células plasmáticas. Se encontraron numerosas mitosis y células con signos de degeneración (Fig. 3). Se apreció moderada vascularización del tumor y con la tinción del retículo se apreciaron delgadas bandas de retículo, separando amplios conglomerados de células neoplásicas. No se apreció invasión vascular, y las células tumorales y el espacio intersticial fueron negativas para la metacromasia producida por el azul de toluidina y también fueron Schiff negativos.

Con el microscopio electrónico las células tumorales mostraron frecuentemente pérdida de la cohesión y en general núcleo indentado y lobulado, con

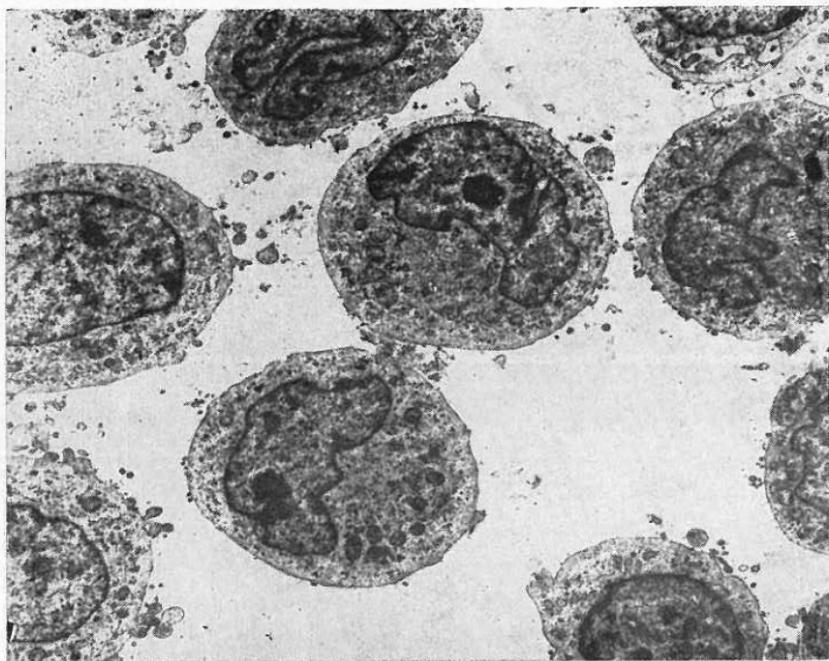


FIG. 4. Microelectrografía que muestra células neoplásicas reticulares con núcleo irregular, distribución irregular de la cromatina y nucléolo prominente. Característicamente las células neoplásicas tienden a mostrar pérdida de la cohesión que las une entre sí en condiciones normales.

cromatina dispuesta en gruesos grumos y con uno o varios nucléolos (Fig. 4). El citoplasma mostró lisosomas, mitocondrias de aspecto normal y retículo endoplásmico poco prominente y de tipo rugoso. No se apreció prominencia del aparato de Golgi. Algunas células mostraron abundante retículo endoplásmico con numerosas cisternas, con imagen correspondiente a células plasmáticas. En el citoplasma de algunas células se apreció citofagocitosis correspondiente a células con franca picnosis nuclear y fenómenos de gene-

rativos del citoplasma (Fig. 5). En estas células se encontraron formas de desintegración nuclear en las que se identificaron partículas de 300 a 400 Å, de centro osmiofílico, rodeado de un halo claro y de un contorno denso a los rayos de electrones. Estas partículas eran escasas, de tamaño irregular y en ocasiones se encontraron en vesículas citoplásmicas incluidas en una matriz de moderada densidad electrónica (Fig. 6).

*Citogenética.* Los cariotipos procedentes de linfocitos hemáticos muestra-

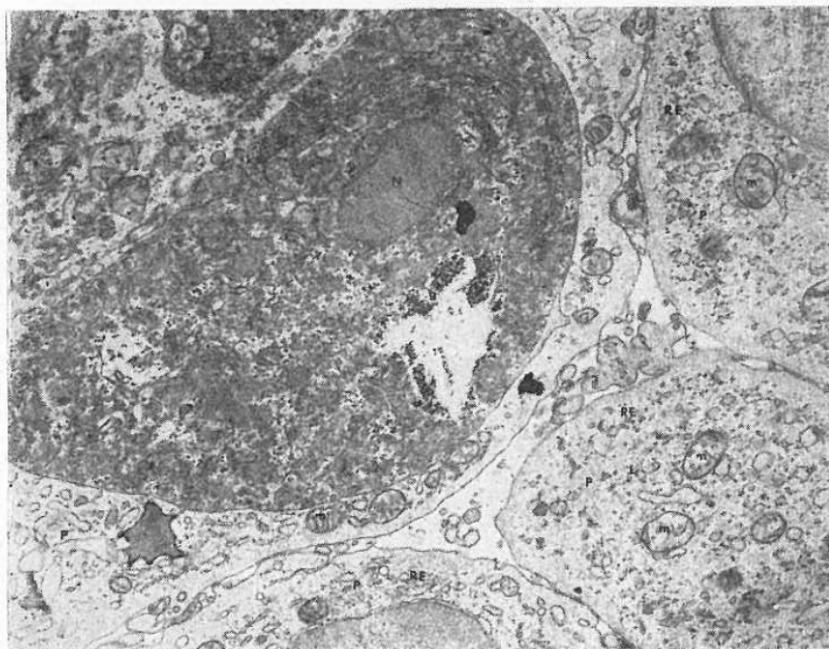


FIG. 5. Microelectrografía que muestra varias células neoplásicas (P), con abundante citoplasma, mitocondrias (m), y retículo endoplásmico vesiculoso (RE). Una de las células muestra fagocitosis de una célula tumoral en fase de desintegración (C), con granos de glucógeno en una vacuola citoplásmica (g), mitocondrias mal preservadas y núcleo (N) con su membrana mal conservada y pérdida de su densidad electrónica.

ron un patrón normal de 78 cromosomas y complemento gonosómico de XX para las hembras y XY para el macho. Con excepción de los gonosomas, todos los cromosomas caninos corresponden a formas acrocéntricas de diferente tamaño.

El número modal cromosómico de las células tumorales correspondió a 59 cromosomas en todos los casos. La morfología del cariotipo fue diferente de las células normales por la presencia de 15 cromosomas submetacéntricos, o metacéntricos, incluyendo a un cro-

mosoma con una zona de heteropicnosis negativa en sus ramas largas, por lo que se le consideró como un marcador, y el resto formado por cromosomas acrocéntricos. No se pudieron identificar en las mitosis estudiadas gonosomas, ni sexocromatina en células tumorales en interfase.

Un hallazgo interesante fue un cromosoma metacéntrico o submetacéntrico, posiblemente un marcador con heteropicnosis temprana y asociación nucleolar en células en profase (Fig. 7).

*Inmunología.* Los cortes frescos del

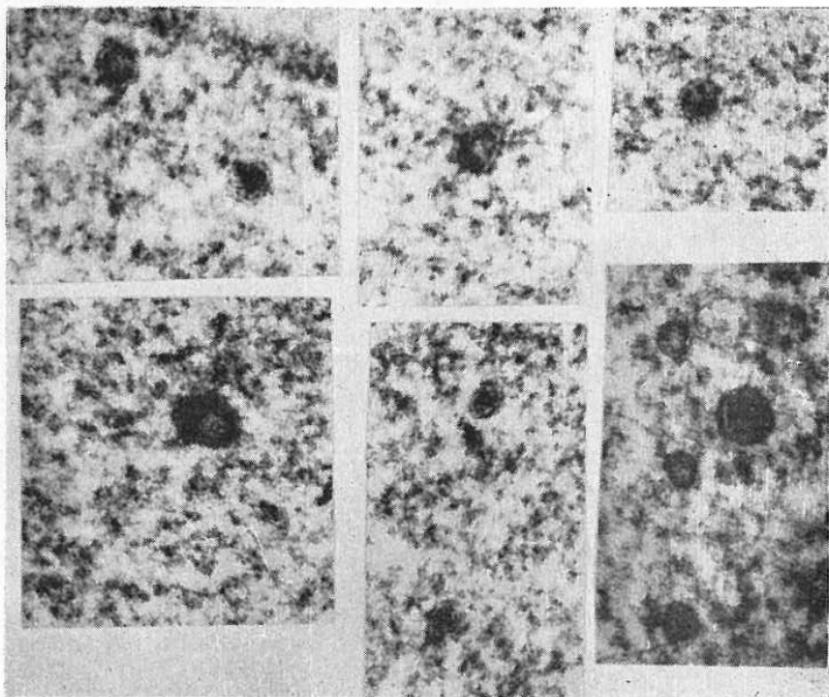


FIG. 6. Conjunto de partículas semejantes a virus. Miden un promedio de 300 a 450 Å, con núcleo denso, rodeado en algunas por un halo claro y otra zona de mayor densidad electrónica.

tumor incubados con antigamaglobulina de conejo contra perro, marcada con isotiocianato de fluoresceína, mostraron abundantes depósitos de gamaglobulina de perro entre las células tumorales, sin que se pudiera localizar en el citoplasma de éstas. La especificidad de la reacción se demostró por el bloqueo con antigamaglobulina de conejo sin marcaje, la cual produjo resultados negativos a la incubación subsiguiente con antigamaglobulina marcada (Fig. 8)

El patrón inmunolectroforético del

suero de animales portadores del tumor no demostró la producción de algún tipo de globulina anormal producida por las células tumorales (Fig. 9). Por otra parte se identificó escasa gamaglobulina, también por este mismo método, en el sobrenadante de células tumorales incubadas *in vitro* por varios días.

*Actividad reproductiva.* La incubación de células tumorales en medio con timidina tritiada por 4 horas, mostró la incorporación de isótopo en por-

cientos que variaron de a 10 a 16%. El resto de las células no presentó captación, ni tampoco hubo captación por

parte de cromosomas en metafase. (Fig. 10).

## COMENTARIO

Del estudio histológico con microscopio de luz y con el microscopio electrónico, se considera que la mayor parte del tumor está formado por células reticulares de aspecto maligno: dispersión de la cromatina nuclear, nucléolo prominente, mitosis numerosas, mitocondrias normales, retículo endoplásmico poco prominente con ribosomas libres y aparato de Golgi poco desarrollado, así como pérdida de la cohesión entre las células neoplásicas. Por consiguiente el tumor debe considerarse como reticulosarcoma desde el punto de vista morfológico. Por otra parte, el componente celular integrado



FIGURA 7-A

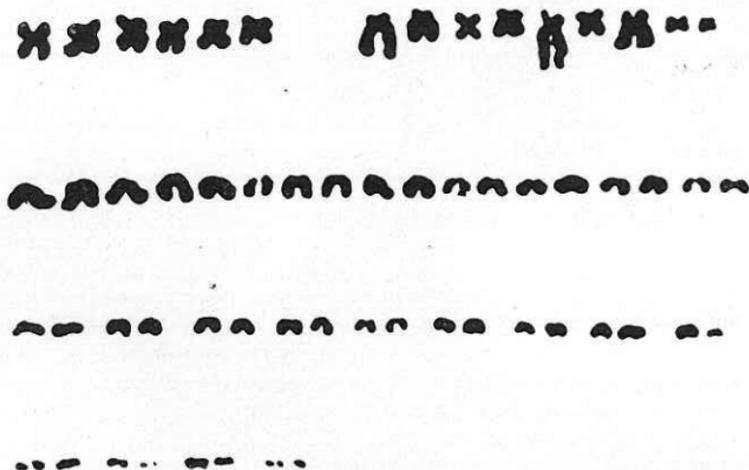


FIGURA 7-B

FIG. 7. A: Cariotipo normal de una perra. B: Cariotipo de una célula tumoral. C: Grupo de marcadores submetacéntricos con una zona de heteroplicnosis negativa en sus ramas largas. D: Cromosoma grande heteroplicnótico con asociación nucleolar.



FIGURA 7-C.

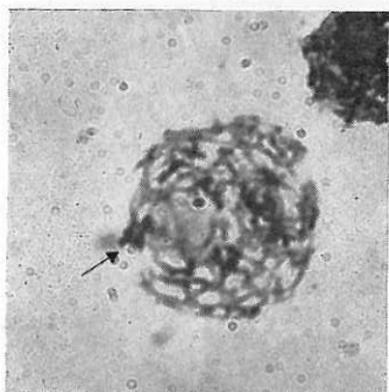


FIGURA 7-D

por linfocitos pequeños y células plasmáticas, puede explicarse por dos posibilidades: bien se trata de formas de transición y maduración de las células reticulares o bien son células inflamatorias intercurrentes entre las células neoplásicas. En favor de la primera posibilidad y de acuerdo con los estudios de ultraestructura de Lombard y

Canabí<sup>13</sup> y Lombard y colaboradores,<sup>14</sup> y con microscopio de luz por Thornburn y asociados,<sup>15</sup> existe el hecho de que se encontraron células plasmáticas con buena diferenciación citoplásmica, pero con caracteres inmaduros del núcleo. La presencia de células degeneradas o necrobióticas en el citoplasma de células reticulares neoplásicas, señala su capacidad fagocitaria.

En relación al hallazgo de partículas semejantes a virus, es conveniente mencionar que ya estudios preliminares por Ajello y Gimbo,<sup>16</sup> así como posteriormente por otros autores,<sup>14, 15</sup> las han descrito también. Por otra parte, los estudios encaminados al aislamiento de virus del tumor han sido infructuosos.

Además, la transmisión del tumor por partículas subcelulares como lo ha descrito Ajello,<sup>17</sup> y con ácido nucleico por Thiery,<sup>18</sup> no se ha podido reproducir por Karlson y Mann,<sup>7</sup> ni en nuestro laboratorio. Por consiguiente, queda

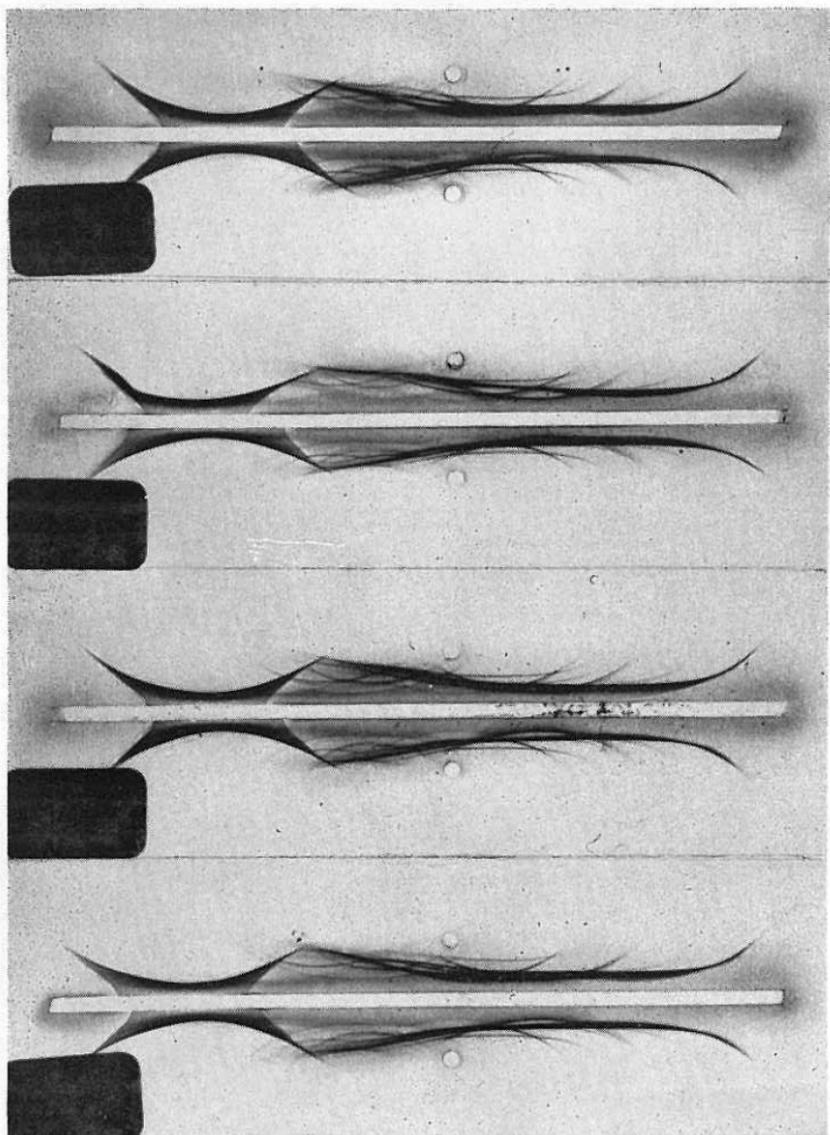


Fig. 8. Tinción de un corte del tumor con antigamaglobulina de conejo antiperro, marcada con fluoresceína. Los depósitos de gamaglobulina corresponden a zonas blancas brillantes de espacios intercelulares y sin depósito en el citoplasma de las células neoplásicas correspondientes a zonas oscuras X1000.

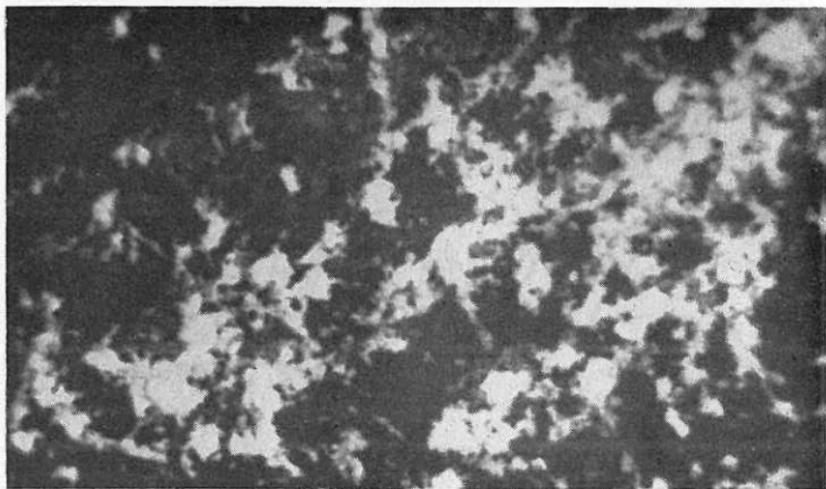


FIG. 9. Inmunoelectroforetogramas de suero de perros portadores del tumor. No se observan globulinas anormales. Las bandas inferiores corresponden a sueros testigos normales.

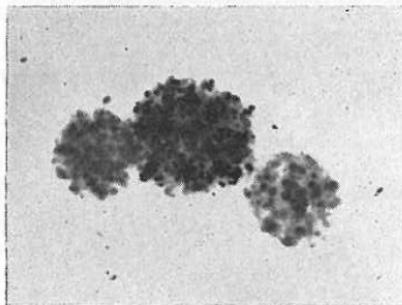


FIG. 10. Microfotografía de una autorradiografía que muestra núcleos con captación de timidina tritiada, manifiesta por la presencia de granos de plata reducida. X100.

aún en duda, hasta que no existan mejores métodos encaminados al aislamiento de virus oncogénicos, su identificación definitiva como agentes etiológicos de este tumor.

Los estudios cromosómicos mostraron

un número modal de 59, con un cariotipo semejante a los descritos en mitosis de estos mismos tumores por Makino en Japón,<sup>19</sup> Weber y colaboradores en los Estados Unidos<sup>20</sup> y por Thornburn y asociados en Jamaica.<sup>15</sup> No se ha podido confirmar, por otra parte, la utilidad del empleo de los gonosomas como marcadores en transplantes de tumores entre animales de diferente sexo,<sup>20</sup> para probar la naturaleza transplantable del tumor, según lo describió Samsó.<sup>21</sup> La semejanza de los cariotipos de tumores estudiados en diferentes lugares geográficos, como lo demuestra el presente estudio, señala uniformidad en la población celular del tumor. La forma constante del cariotipo en tumores malignos sólo se ha descrito en la leucemia mieloide en el humano, originalmente por Nowell y colabora-

dores,<sup>22</sup> y en el reticulosarcoma en el criceto sirio por Cooper y asociados.<sup>23</sup>

El hallazgo de un cromosoma metacéntrico grande con heteropicnosis temprana, probablemente un marcador, en asociación nucleolar estrecha, observado en células neoplásicas en profase, sugiere futuros estudios encaminados a determinar posibles variaciones en la estructura química del

ácido nucleico ribosomal en estas mismas células, ya que existen partes de los cromosomas, específicamente encargadas de dirigir la síntesis de este ácido nucleico ribosómico en el nucléolo, según se ha descrito en la especie humana por Ohno y colaboradores.<sup>24</sup>

El método de inmunofluorescencia demuestra gamaglobulina canina entre las células neoplásicas, pero no demuestra su producción por ellas, debido a que no se identificó esta globulina en el citoplasma celular. Esto concuerda con el hecho generalmente conocido de que la involución espontánea del tumor se debe a un fenómeno de rechazo, probablemente mediado por inmunidad humoral y celular. Este fenómeno ha sido estudiado por Powers,<sup>8</sup> quien describe que animales previamente portadores del linfoma, se tornan resistentes a una nueva inocu-

lación de células tumorales. La inmunidad desarrollada por animales curados puede ser operante contra células tumorales o bien contra algún virus, cualesquiera que sea la etiología de la neoplasia. El estudio inmunoelectroforético demostró que no existe ninguna globulina anormal en el suero de animales portadores del tumor, a diferencia de lo observado en ciertos pade-

cimientos neoplásicos en los que el sistema inmune se encuentra comprometido, como sucede en el mieloma múltiple en el hombre y en el ratón. El estudio por inmunoelectroforesis del medio de cultivo en el que se incubaron células tumorales, mostró escasa cantidad de gamaglobulina; sin embargo se requiere un estudio más minucioso, como es el marcaje con un isótopo precursor de la globulina gama y su incorporación subsecuente a la incubación, para estar seguro de que la síntesis se efectúa por las células tumorales y que su presencia en el medio de cultivo no es el resultado de contaminación con suero acompañante a las mismas células.

TABLA I

## NUMERO DE CROMOSOMAS POR CELULA EN METAFASE

Caso	50	51	54	55	56	57	58	59	60	100	120	Total
1			1	3			2	24		1		31
2	1		1		2	2		22	1			29
3		1	1				3	14			4	23

midina marcada. Este fenómeno de síntesis, se sabe, constituye una parte del ciclo celular o fase S, que precede a la mitosis. Por consiguiente, uno esperaría un notable crecimiento tumoral en poco tiempo; sin embargo, la gran frecuencia de citolisis hace suponer que existe un equilibrio entre las células neoplásicas que se reproducen y las que se destruyen, para mantener un crecimiento tumoral moderado o estabilizado. Además, la destrucción celular puede deberse al mecanismo inmune del portador o bien por la acción citocida de un posible virus oncogénico.

Finalmente, como han señalado Johnson y colaboradores,<sup>25</sup> este interesante tumor canino, también constituye un excelente modelo experimental para el estudio de respuesta tumoral a drogas citotóxicas como también se ha empleado para demostrar su erradicación total mediante radioterapia.

El autor expresa su agradecimiento al Dr. Pablo Hernández Jáuregui por la obtención de biopsias y el estudio clínico de los animales; al Dr. Amador González Angulo, por su asesoría en los estudios de ultraestructura y al Dr. Roberto Kretschmer por las facilidades otorgadas en su laboratorio. Agradece también la ayuda técnica proporcionada por las señoritas Q.B.P. Martha López Osuna, Elvira Ruiz Frago y Isabel Ruiz de Chávez; por la elaboración del material fotográfico a los señores Enrique Rivera y Armando Alcaraz, y por la transcripción del manuscrito a la Srita. Lucía Ponce de León Basave.

#### REFERENCIAS

1. Shimkin, M. B. y Novinsky, M. A.: *A note on the history of transplantation of tumors*. Cancer 8: 653, 1955.
2. Novinsky, M. A.: *K voprosu o privanii zlokachestvennich novoobrazovani (eksperimentalnoi issledovani)*. (Sobre el problema de la inoculación de neoplasias malignas) (investigaciones ex-

perimentales). Tesis, San Petersburgo. 1877. Citado por Shimkin.<sup>1</sup>

3. Novinsky, M. A.: *Zur Frage über die Impfung der krebsigen Geschwülste*. Centralbl. f. d. med. Wissensch. 14: 790, 1876. Citado por Stewart y colaboradores.<sup>6</sup>
4. Wehr, C.: *Demonstration der durch Impfung von Hund auf Hund erzeugten Carcinomknöchten*. Zentralbl. f. Chir. 15: (supl. No. 24)8, 1888. Citado por Stewart y colaboradores.<sup>6</sup>
5. Sticker, A.: *Transplantables Lymphosarkom des Hundes. Ein Beitrag zur Lehre der Krebsübertragbarkeit*. Ztsch. f. Krebsforsch. 1: 413, 1904.
6. Stewart, H. L.; Snell, K. C.; Dunham, L. J. y Schylen, S. M.: *Transplantable and transmissible tumors of animals*. Armed Forces Institute of Pathology. Washington, 1953, p. 364.
7. Karlson, A. G. y Mann, F. C.: *The transmissible venereal tumors of dogs: observations of forty generations of experimental transfers. En Virus as Causative Agents in Cancer*. Ann. New York Acad. Sci. 54: 1197, 1952.
8. Powers, R. D.: *Immunologic properties of canine transmissible venereal sarcoma*. Am. J. Vet. Res. 29: 1637, 1968.
9. Estudillo Cartagena, J. J.: *Estudio clínico e histopatológico de neoplasias en órganos genitales de canídeos. (Tumor transmisible venéreo)*. Tesis, Universidad Veracruzana, Facultad de Medicina Veterinaria, 1968, p. 4.
10. Millonig, G.: *Further observations on a phosphate buffer for osmium solutions in fixation*. Fifth International Congress for Electron Microscopy. Academic Press, Vol. 2: 8, 1962.
11. Moorhead, P. S.; Nowell, P. C.; Mellman, W. J.; Batipps, D. M. y Hungerford, D. A.: *Chromosome preparations of leucocytes cultured from human peripheral blood*. Exptl. Cell Res. 20: 613, 1960.
12. Coons, A. H. y Kaplan, M. H.: *Localization of antigen in tissue cells: II. Improvements in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody*. J. Exp. Med. 91: 1, 1950.
13. Lombard, C. y Canabí, P.: *Considérations sur la nature et recherches sur l'ultrastructure de sarcoma de Sticker du chien*. Bull. du Cancer 54: 357, 1967.
14. Lombard, C.; Canabí, P. e Izard, J.: *Images évolutif l'aspect de virus dans les cellules du sarcome de Sticker*. J. Microscopie 6: 81, 1967.

15. Thornburn, M. J.; Gwynn, R. V. R.; Ragbeer, M. S. y Lee, B. I.: *Pathological and cytogenetic observations on the naturally occurring canine venereal tumour in Jamaica (Sticker's tumour)*. Brit. J. Cancer 22: 720, 1968.
16. Ajello, P. y Gimbo, A.: *Presenza di particelle virali nelle cellule del tumore de Sticker*. Atti. Soc. Ital. Sc. Vet. 19: 736, 1965.
17. Ajello, P.: *Transmissione del tumore de Sticker con materiale acellulare*. Nuova Vet. 36: 179, 1960.
18. Thiéry, G.: *Pouvoir cancérigène des thymonucléoprotéines extraites du sarcoma de Sticker*. Comp. Rend. Soc. Biol. 144: 745, 1950.
19. Makino, S.: *Some epidemiologic aspects of venereal tumors of dogs as revealed by chromosome and DNA studies*. Ann. New York Acad. Sci. 108: 1106, 1963.
20. Weber, W. T.; Nowell, P. C. y Hare, W. C. D.: *Chromosome studies of a transplanted and primary canine venereal sarcoma*. J. Nat. Cancer Inst. 35: 537, 1965.
21. Samsó, A.: *Recherches expérimentales sur le sarcoma de Sticker*. Thèse de Doctorat de Sciences Naturelle, Paris, 1965. Citado por Lombard y colaboradores.<sup>14</sup>
22. Nowell, P. C. y Hungerford, D. A.: *A minute chromosome in human chronic granulocytis leukemia*. Science 132: 1497, 1960.
23. Cooper, H. L.; MacKay, C. M. y Banfield, W. G.: *Chromosome studies of a contagious reticulum cell sarcoma of the Syrian hamster*. J. Nat. Cancer Inst. 33: 691, 1964.
24. Ohno, S.; Kaplan, W. D. y Kinoshita, R.: *Nucleolus organizers in the causation of chromosomal anomalies in man*. Lancet 2: 123, 1961.
25. Johnson, R. E.; Cameron, T. P. y Kinard, R.: *Canine lymphoma as a potential model for experimental therapeutics*. Cancer Res. 28: 2562, 1968.