

Aislamiento y potencialidades de las células de Teratocarcinoma.-

M. Monzó y X. Andrés.

Departamento de Anatomía Humana. Facultad de Medicina. Universidad de
Barcelona. c/. Casanova, 143. Barcelona-36

Introducción

Los Teratocarcinomas (TC), son tumores que están formados por tejidos derivados de las tres capas embrionarias primitivas, así como, por células indiferenciadas, pluripotentes, denominadas carcinoma embrionario (CE) y responsable de la malignidad del tumor. Experimentalmente los TC, pueden obtenerse por trasplante ectópico, de embriones de ratón de 3½ a 7 días de evolución, Stevens (1970), Solter et al. (1975). Los tumores así obtenidos se mantienen "in vivo", mediante su pasaje intraperitoneal en ratones de la cepa 129/Sv, presentando la particularidad, de que, entre el tercer o cuarto pasaje, se desarrolla una ascitis en el animal huésped, de la que se aíslan unos agregados celulares, que por su parecido morfológico a embriones jóvenes de ratón, se les ha denominado Cuerpos Embrioides, Embryoid Bodies (EB). "In vitro" a partir de ciertas líneas celulares de CE de ratón (Martin, 1977), pueden formarse EB; y más recientemente, se ha descrito una línea celular de CE, en la especie humana, con la misma capacidad (Ducibella et al., 1982). Morfológicamente, se han descrito, tanto "in vivo" como "in vitro", dos tipos de EB; los císticos, formados por una capa de endodermo que rodea a células de CE y a cavidades líquidas, son similares a embriones de ratón de 3½ días; los simples, formados por endodermo que rodea a una gran cantidad de células de CE, y son semejantes a embriones de ratón de 5 a 6 días de evolución (Martin, 1978). Los EB se mantienen "in vivo" mediante pasaje intraperitoneal, siendo las poblaciones inyectadas, morfológicamente mucho más heterogéneas que los dos tipos descritos anteriormente. Nuestro trabajo consiste, en aislar los distintos tipos de EB existentes en una ascitis, estudiar su grado de dependencia morfológica, así como las potencialidades de

cada tipo, cuando son inyectados subcutáneamente en ratones de la cepa 129/Sv.

Material y métodos

1.- Obtención de Cuerpos Embrionarios

Los EB utilizados, son derivados del TC OTT6050, obtenido por Stevens mediante injerto de un embrión de ratón de 6 días, en testículo de ratón a adulto (Stevens, 1970). En nuestro laboratorio mantenemos los EB, mediante pasaje intraperitoneal, cada 20 días, en ratones isogénicos 129/Sv.

2.- Aislamiento de los Cuerpos Embrionarios

A los 20 días post-inyección intraperitoneal de los EB, los animales son sacrificados mediante dislocación cervical, su cavidad abdominal lavada con Hank's BSS, libre de Ca^{++} y Mg^{++} , y el resultado centrifugado en gradientes discontinuos de Ficoll, a 18 g. durante 15' a 4°C. El Ficoll se diluye con Tyrode isotónico y a pH 7,3. Los EB obtenidos en cada una de las bandas de sedimentación, son extraídos y procesados para microscopía óptica y electrónica, según técnicas habituales.

3.- Evolución de los Cuerpos Embrionarios

La población homogénea de EB, aislada en la banda menos densa del gradiente, es inyectada en concentración de $4 \cdot 10^4$ EB/cc, en cavidad peritoneal de ratones 129/Sv; que son sacrificados a los 2, 4, 6, 8, 10 y 12 días post-inyección, sus cavidades abdominales lavadas y el resultado centrifugado en gradientes discontinuos de Ficoll.

4.- Obtención de tumores

Cada tipo morfológico de EB, aislados del gradiente son lavados varias veces con Hank's BSS, y centrifugados, con el fin de eliminar el Ficoll. Inyectados subcutáneamente en animales 129/Sv, que son sacrificados a los 20 días post-inyección, los tumores obtenidos son procesados para microscopía óptica según técnicas habituales.

Resultados

1.- Obtención y aislamiento de los Cuerpos Embrioides

Como resultado del gradiente, se obtienen cuatro bandas de sedimentación, de las que aislamos cuatro tipos morfológicos de EB (Fig.1). Los de las bandas A y B, son similares a embriones de ratón de 3½ días, los de la banda C a embriones de cinco a seis días y los de la última banda, presentan una población que se está autolisando.

2.- Evolución de los Cuerpos Embrioides

Cuando se inyecta una población homogénea de EB (Fig. 2) en cavidad peritoneal, y los huéspedes son sacrificados a los dos días, los EB obtenidos sedimentan en su mayoría en la banda B del gradiente. A los cuatro y seis días, sedimentan en las bandas B, C y D. Y a los 8 días, se restablecen las cuatro bandas originales. Morfológicamente, la particularidad más interesante es que a los 8 días, los EB de la banda C, presentan numerosas "constricciones" (Fig.3 y 4), que sugieren puntos de fisión de los EB, y que no han sido observados anteriormente. Los EB de la banda D, presentan signos degenerativos, pero tan solo, en las células diferenciadas de la capa externa (endodermo).

3.- Obtención de tumores

Los tumores obtenidos a los 20 días post-inyección subcutánea de los distintos tipos morfológicos de EB, presentan las siguientes particularidades anatomo-patológicas: Los EB de la banda A del gradiente dan tumores totalmente indiferenciados (Fig. 5). Los de la banda B, presentan "intentos" de diferenciación hacia la línea ectodérmica (Fig. 6). Los EB de la banda C, dan diferenciaciones ectodérmicas, mesodérmicas y endodérmicas, además de presentar células de CE (Fig. 7). Mientras que los EB de la banda D, dan generalmente tumores totalmente indiferenciados.

Conclusiones

Como resultado de nuestras experiencias deducimos los hechos siguientes:

(1) En una ascitis de 20 días de evolución, existen cuatro tipos morfológicos de EB, que pueden ser separados en función de su morfología en gradientes de Ficoll. (2) Los distintos tipos de EB, no son independientes entre sí, sino que hay un patrón de crecimiento que los relaciona. De este modo, las formas más sencillas de EB, son capaces de crecer y dividirse por fisión, dando lugar a cualquier tipo morfológico de EB. Estos resultados estarían de acuerdo con los obtenidos "in vitro" por Pierce y Verney (1961) Hsu y Basakar (1974) observando que los EB císticos, son capaces de evolucionar hasta EB simples. Opinamos que las zonas de fisión, se darán en aquellas áreas del EB, en que las células indiferenciadas de CE, son capaces de diferenciarse hacia endodermo visceral, de hecho, esta capacidad de las células de CE, ha sido observada por Pierce y Verney (1961) Stevens (1960) al estudiar tumores de teratocarcinoma subcutáneos. (3) A cada tipo morfológico de EB, le corresponden unas potencialidades muy concretas, de manera, que los EB más indiferenciados dan lógicamente tumores con un alto grado de malignidad. Pero a medida que los EB crecen van también diferenciándose, apareciendo en consecuencia potencialidades muy diversas, así pues a cada estado de diferenciación, le correspondería un estado de potencialidad histológica, al igual que sucede cuando se inyectan embriones, en distinto estadio de evolución, en zonas ectópicas (Solter et al. 1979 y 1980).

Bibliografía

- DUCIBELLA. T., ANDERSON. D., AALBERG. J., and DEWOLF. W.C. (1982) Cell Surface Polarization, tight Junctions, and Eccentric inner cells Characterize Human Teratocarcinoma Embryoid Bodies. *Develop. Biol.* 94, 197-205.
- HSU. S.A., and BASKAR. E.P. (1977) Differentiation "in vitro" of normal mouse embryos and mouse embryonal carcinoma. *J. Anat. Cancer. Inst.* 53, 177-185.
- MARTIN. G.R., WILEY. L.M., and DAMJANOV. I. (1977) The Development of cystic embryoid bodies "in vitro" from clonal Teratocarcinomas stem cells. *Develop. Biol.* 61, 230-244.
- MARTIN. G.R. (1978) Advantages and Limitations of Teratocarcinoma stem cells as Models of Development. In Martin M. Jhonson (ed). *Development in Mammals*, vol 3. pp.: 225-265. North-Holland. Amsterdam.
- PIERCE. B.G., and WERNEY, E.L. (1961) An "In vitro" and "In vivo" study of differentiation in Teratocarcinomas. *Cancer*. vol 14. nº 5. 1017-1029.
- SOLTER. D., DAMJANOV. I., and KOPROWSKI. H. (1975) Embryo-derived teratoma: a model system in developmental and tumor biology. In Balls, M. and Wild. A.E. (eds). *The early development of mammals*. pp. 243-264 Cambridge University Press, London.
- SOLTER. D., and DAMJANOV. I. (1979) Teratocarcinoma and the expression of oncodevelopmental genes. *Meth. Cancer Res.* 18, 277-323.
- SOLTER. D., DOMINIS. M., and DAMJANOV. I. (1980) Embryo derived Teratocarcinoma. II Teratocarcinogenesis depends of the type of embryonic graft. *Int. J. Cancer.* 25, 341-343.
- STEVENS. L.C. (1960) Embryonic Potency of Embryoid Bodies Derived from a Transplantable Testicular Teratoma of the Mouse. *Develop. Biol.* 2. 285-297
- STEVENS, L.C. (1970) The development of transplantable teratocarcinomas from intratesticular grafts of pre- and postimplantation mouse embryos. *Develop. Biol.* 21, 364-382.

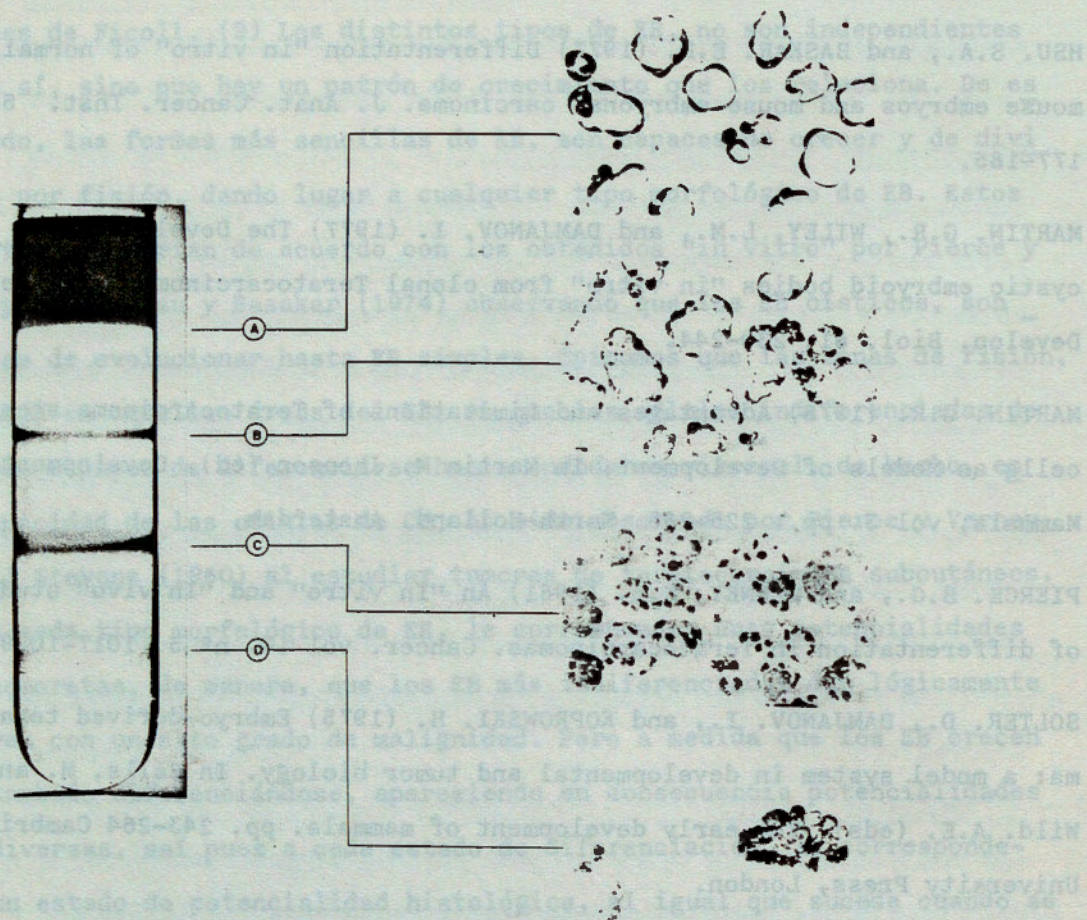


Fig. 1.- Gradiente de Ficoll y aislamiento morfológico de Cuerpos Embrionarios.

El epitelio de recubrimiento de las vías urinarias (Urotelio)

en los anfibios. I. Aspecto morfológico de los cuerpos embrioides

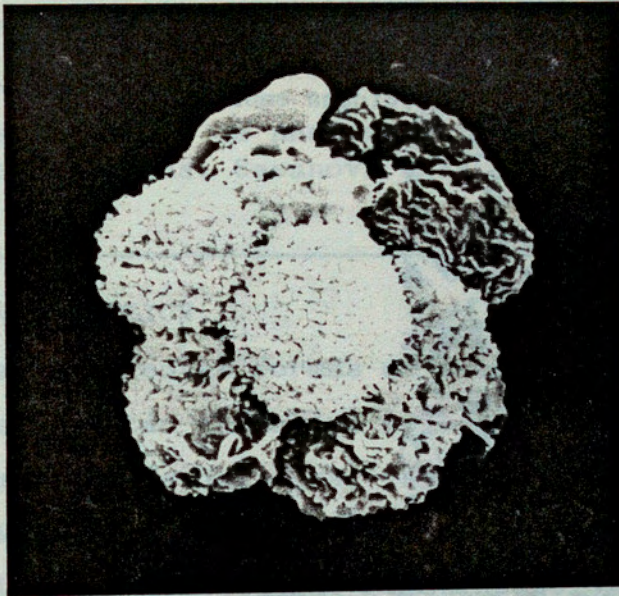


Fig. 2.- Aspecto morfológico de los cuerpos embrioides, aislados en la banda A del gradiente e inyectados intraperitonealmente.

Fig. 3.- Aspecto morfológico de los cuerpos embrioides, a los 8 días en cavidad peritoneal

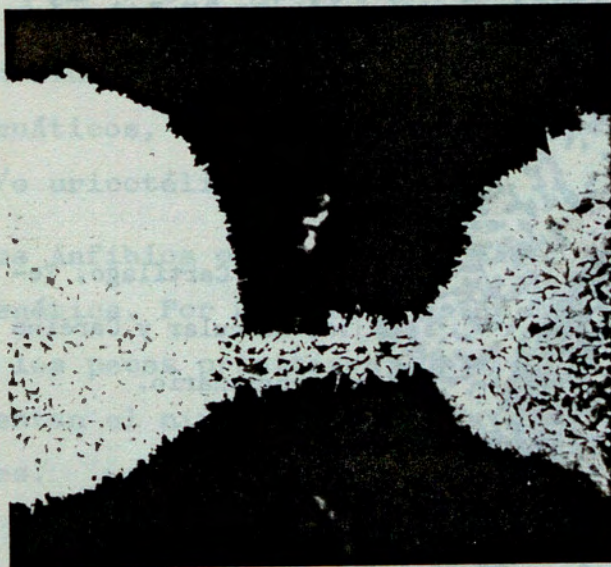
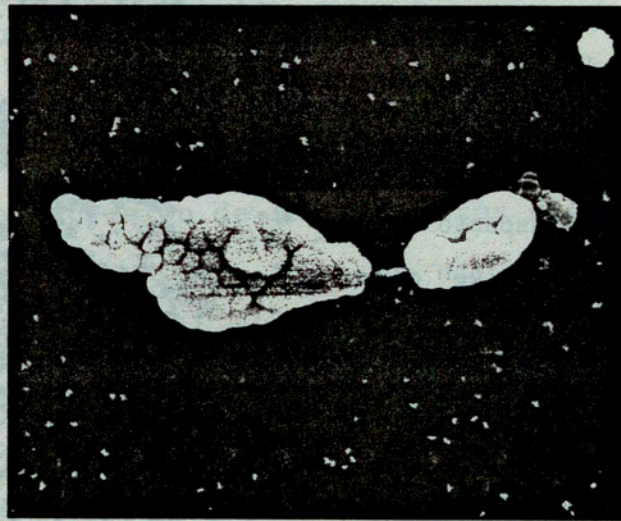


Fig. 4.- Detalle zona de fisión de la Fig. 3.

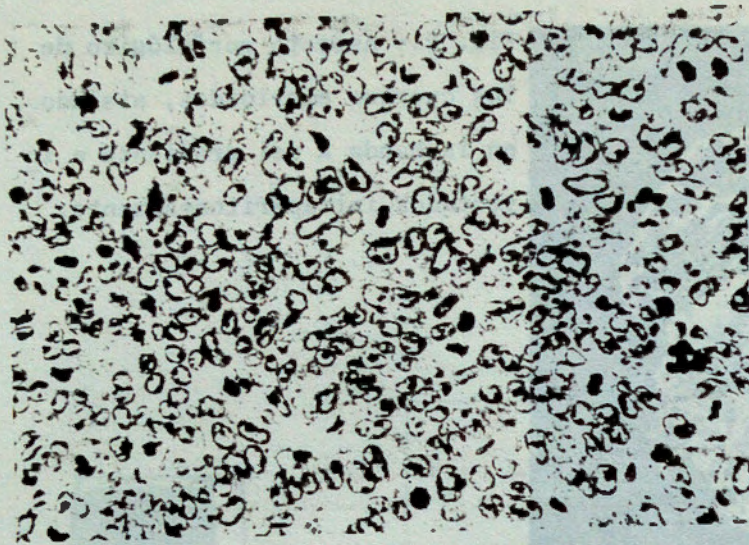


Fig. 5.- Células de carcinoma embrionario.

Fig. 6.- Aspecto de "Neuroepitelio-like" denominado "Roseta Neural"

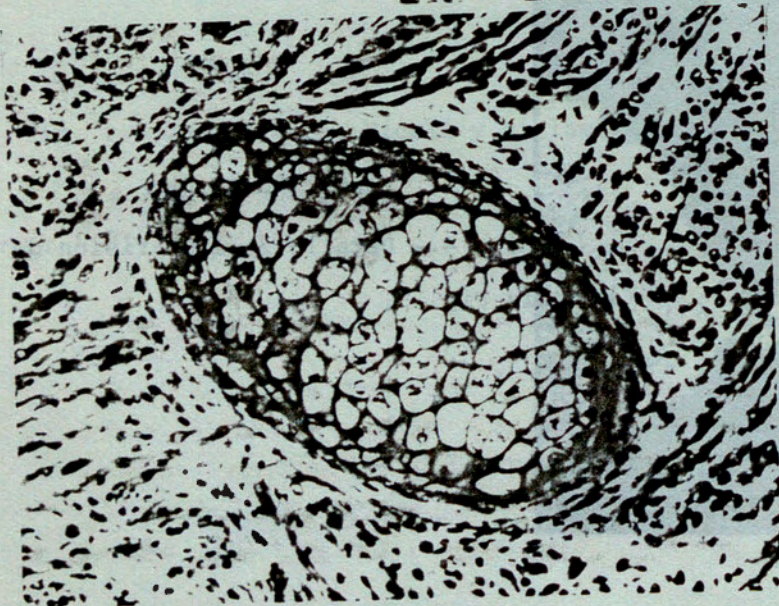
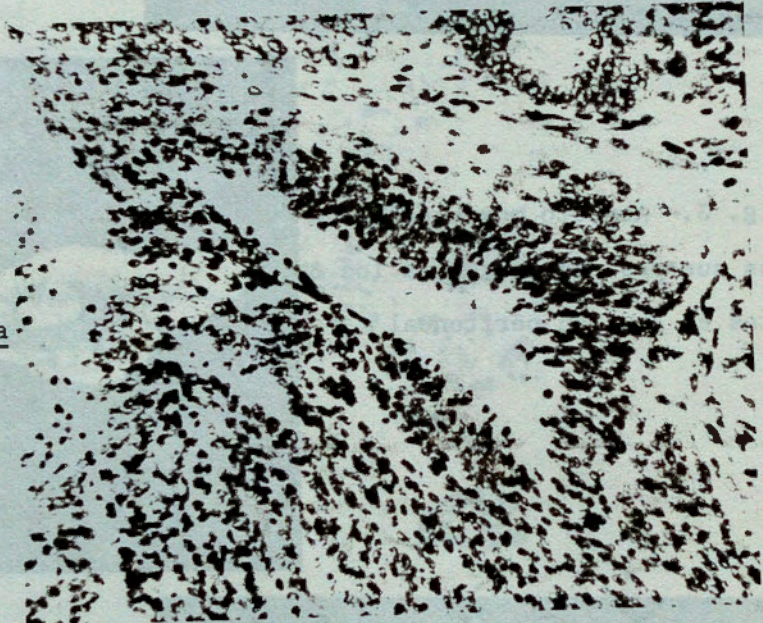


Fig. 7.- Cartilago, Tejido Muscular y Carcinoma embrionario.