

## SEPARACIÓN Y PURIFICACIÓN DE CÉLULAS DEL TUMOR VENÉREO TRANSMISIBLE CANINO ESPONTÁNEO, EN GRADIENTE DE DENSIDAD DE POLISUCROSA Y DIATRIZOATO DE SODIO

### SEPARATION AND PURIFICATION OF CELLS FROM SPONTANEOUS CANINE TRANSMISSIBLE VENEREAL TUMOR IN A DENSITY GRADIENT OF POLYSUCROSE AND SODIUM DIATRIZOATE

CARLOS GONZÁLEZ; RAQUEL CEPEDA; ESTEFANÍA FLORES; GINO CATTANEO; KAREN COLARTE

#### SUMMARY

*The canine venereal transmissible tumor (TVT) is a non differentiated round cell neoplasm frequently described on mucous membranes, specially of genital organs. The allotransplantability of this tumor has drawn the attention of researchers interested in transplant rejection mechanisms and immune response. The cytology of this tumor is similar in some aspects to that of lymphocytes and macrophages, in fact it was formerly known as venereal lymphosarcoma or Sticker's sarcoma. More recently, immunophenotypic markers of histiocytic origin have been detected on TVT cells. However, these studies are not conclusive due to the fact that the tumor is normally infiltrated by numerous leucocyte cells, including histiocytes from the host that are not easily distinguished from tumor cells. In this work it is proposed that TVT cells can be separated, in tumor cell suspensions, from leucocytes in a density gradient. The results show that TVT cells can not only be separated from most leucocytes in a polysucrose and sodium diatrizoate gradient, but also that it is possible to improve the percentage of viability, possibly as damaged cells are easily destroyed by osmotic changes.*

**KEY WORDS:** Venereal transmissible, cells separation, density gradient.

**PALABRAS CLAVE:** Tumor venéreo transmisible, separación celular, gradiente de densidad.

#### INTRODUCCIÓN

El Tumor Venéreo Transmisible (TVT) del canino es una neoplasia de células redondas indiferenciadas, que se ubica sobre membranas mucosas, especialmente de órganos genitales (Vermooten, 1987; Rogers, 1997). Se caracteriza por ser aloplantable en forma natural (Feldman, 1987), lo que ha motivado la atención de los investigadores, quienes lo han considerado un modelo interesante para estudiar mecanismos de transplantabilidad y respuesta inmune (Alberts y cols., 1994).

A pesar de que se han publicado trabajos sobre inmunobiología (González y cols., 2000), análisis de cromosomas (Idown, 1984) e inmunofenotipo (Marchal y cols., 1996), aún no se ha logrado establecer con certeza el origen histogénico de este tumor ni aclarar los mecanismos con que cuenta para evadir la respuesta inmune y posterior rechazo en su presentación espontánea.

En las investigaciones de inmunofenotipo se han detectado moléculas marcadoras de estos tumores,

pero no está claro si estas moléculas son expresadas por subpoblaciones de células tumorales o más bien por leucocitos mononucleares del hospedador infiltrativos en el tumor (Marchal y cols., 1996).

Es necesario considerar que la morfología de estas células tumorales es similar en algunos aspectos a linfocitos (Maxey, 1996), por esto, antiguamente se le conocía como linfosarcoma venéreo, sarcoma de Sticker o granuloma venéreo (Booth, 1994). Otros autores lo denominaron histiosarcoma por asimilarse a histiocitos (Bloom y cols., 1951). Algunos de esos estudios no han sido suficientemente concluyentes (Woimant y Chaffaux, 1977), en parte, por el hecho de no contar con un sistema adecuado para la separación de estas células tumorales.

La fracción de leucocitos mononucleares puede ser separada de leucocitos polimorfos nucleares y eritrocitos en gradiente de densidad por poseer distinta densidad y tamaño (Boyum, 1968). Por lo tanto, es esperable que las células del TVT sean, también, susceptibles a ser separadas por centrifugación en gradiente de acuerdo a las características

ya nombradas, con la finalidad de obtener una población celular más homogénea.

La posibilidad de contar con un sistema confiable, que permita obtener células purificadas viables del tumor, facilitaría obtener sistemas más aptos para el cultivo celular.

Por otra parte, la menor resistencia que presenten las células no viables frente a cambios osmóticos permitiría, además, obtener una población celular de mayor viabilidad.

Estudios previos han usado métodos de disociación enzimáticos con tripsina y colagenasa (Okamoto y cols., 1996), que tienen como desventajas no sólo el obtener una suspensión celular heterogénea, sino también entregar baja viabilidad celular y alterar la estructura antigénica.

Considerando las características citológicas e histopatológicas, es esperable que las células del TVT, al igual que leucocitos mononucleares, puedan ser separados de eritrocitos y leucocitos polimorfos nucleares al someterlos a una gradiente de centrifugación.

Estudios previos de TVT, cuya finalidad era recolectar células tumorales viables, han utilizado métodos químicos usando tripsina y colagenasa y agentes quelantes de calcio (EDTA) o mecánicos como desmenuzar el tumor (Okamoto y cols., 1996). Tales métodos, sin embargo, tienen algunas desventajas incluyendo error en la homogeneidad celular, baja viabilidad celular, manipulación compleja. Okamoto y cols., en el año 1996 realizaron un trabajo de aislamiento de células de TVT basándose en el método de centrifugación en gradiente de densidad, para aislamiento de células de TVT, después de desmenuzar el tumor, logrando así obtener células neoplásicas viables. Sin embargo, no se han realizado investigaciones para determinar cuál es la densidad óptima de la solución para obtener los mejores registros de aislamiento, pureza y rendimiento de estas células tumorales y tampoco se han utilizado tumores espontáneos ni regresivos.

Con la finalidad de determinar la mejor densidad de separación de células de TVT que entregue la mayor pureza, viabilidad y rendimiento celular, se utilizó el método de aislamiento de células de TVT mediante gradiente de centrifugación de densidad, utilizando diferentes densidades. Se realizó la separación de células del TVT mediante disociación mecánica y posterior centrifugación en gradiente de densidad conteniendo polisucrosa y diatrizoato de sodio, utilizando TVT espontáneo y regresivo a diferencia de estudios anteriores.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### MATERIAL

#### Animales:

Se utilizaron 10 caninos adultos (sexualmente maduros), sin distinción de sexo ni raza, que presentaron TVT espontáneo de ubicación genital, en fase progresiva y regresiva, el cual fue diagnosticado en el Servicio de Cirugía y confirmado a través de examen citológico e histopatológico, en el laboratorio del Servicio de Anatomía Patológica de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

Se entenderá por TVT en fase progresiva al tumor que se encuentra en crecimiento, sin tratamiento quimioterápico previo y que cumpla con los criterios citológicos para esta etapa (Lombardi, 1995). Por el contrario, la fase regresiva será la etapa posterior a 7 días de aplicada la primera quimioterapia con vincristina (Pérez y cols., 1978).

#### Tratamiento:

Los pacientes fueron tratados cada 7 días en el Servicio de Cirugía con sulfato de vincristina en dosis de 0,03 mg/kg, administrado vía endovenosa, hasta el séptimo día en que se obtuvo la biopsia del tumor regresivo.

#### Obtención de la muestra:

De cada paciente se extrajeron dos muestras de tejido tumoral:

- 1° En fase progresiva, luego de la inspección clínica y antes de iniciar el tratamiento quimioterápico.
- 2° En fase regresiva se obtuvo al séptimo día de realizada la primera sesión de quimioterapia.

### MÉTODO

#### Toma de muestra:

Se extrajeron muestras de tejido tumoral de aproximadamente 1 cm<sup>3</sup> en ambas fases, las cuales se trasladaron en medio de cultivo RPMI 1640 (H y Q<sup>R</sup>) al laboratorio del Servicio de Anatomía Patológica, lugar donde se realizó el diagnóstico histopatológico a través de un examen citológico y, posteriormente, el procesamiento de las muestras.

#### Examen citológico:

Los frotis fueron teñidos con Giemsa de acuerdo a la metodología convencional (López y col., 1982) para confirmar el diagnóstico de TVT.

### Obtención de las distintas densidades de la gradiente de centrifugación:

Se utilizaron cuatro gradientes de densidad distinta: 1.077, 1.060, 1.040, 1.020; para obtener las tres últimas se utilizó la siguiente fórmula:

$$1,077 A + 100 - A = D \text{ requerida}$$

Donde:

A = Volumen de Histopaque<sup>R</sup> -1077 que se necesita para realizar la dilución.

Se obtuvieron tres diluciones, las cuales tenían la siguiente densidad.

Los volúmenes requeridos fueron:

Densidad de 1,06 g/ml = 7,8 ml de Histopaque<sup>R</sup> -1077 con 2,2 ml de agua destilada

Densidad de 1,04 g/ml = 5,2 ml de Histopaque<sup>R</sup> -1077 con 4,8 ml de agua destilada

Densidad de 1,02 g/ml = 2,6 ml de Histopaque<sup>R</sup> -1077 con 7,4 ml de agua destilada

### Purificación:

1. Las muestras obtenidas fueron pesadas y maceradas en medio de cultivo RPMI 1640. El macerado fue puesto en un tubo centrífugo con 50 ml del medio, se dejó decantar por cinco minutos para luego extraer el sobrenadante.
2. El sobrenadante se centrifugó a 8 x g por 5 minutos a 18°C.
3. El pellet que se obtuvo se resuspendió en 10 ml de medio de cultivo RPMI 1640.
4. Se determinó viabilidad y concentración celular pregradiente de densidad, en cámara de Neubauer, utilizando azul tripán al 2%.
5. La suspensión celular, obtenida en el punto 3, fue fraccionada en volúmenes iguales de Histopaque<sup>R</sup> -1077 en las cuatro densidades preestablecidas, mediante centrifugación a 4 x g por 30 minutos a 18°C.
6. Las células tumorales fueron recuperadas de la interfase obtenida en cada una de las gradientes de densidad.
7. La interfase fue lavada con medio de cultivo mediante centrifugación a 10 x g por 5 minutos a 18°C.
8. Se determinó viabilidad y concentración celular postgradiente de densidad, en cámara de Neubauer con azul tripán al 2%.

### Frotis:

Se obtuvieron concentraciones celulares ajustadas a 1 x 10<sup>6</sup> ml de cada dilución utilizada en ambas fases para realizar frotis en citocentrífuga Eppendorff a 1000 r.p.m. por cinco minutos a temperatura ambiente.

### Análisis de resultados:

Se hizo un análisis cuantitativo de todas las muestras.

El recuento celular, para cada dilución utilizada, se realizó en un microscopio óptico marca Nikon modelo Eclipse A 600, 400x, en cinco campos, y se obtuvo el porcentaje promedio.

Los porcentajes fueron transformados a números absolutos mediante transformación del arco seno.

Los datos obtenidos antes y después del tratamiento fueron analizados mediante análisis de varianza de dos criterios.

## RESULTADOS

**1. Viabilidad celular:** En ambas fases tumorales se observa que los mayores porcentajes correspondieron a la postgradiente, siendo la densidad 1.02 la que muestra mayor diferencia entre las fases tumorales, y la densidad 1.077 la que dio los valores más similares (Fig. 1).

**2. Rendimiento celular:** En ambas fases tumorales se aprecia que los valores más altos se obtienen durante la progresión del tumor. Se observa que, a medida que disminuye la densidad de gradiente, se produce una disminución considerable del rendimiento celular en la fase regresiva (Fig. 2).

### 3. Grado de purificación de células de TVT:

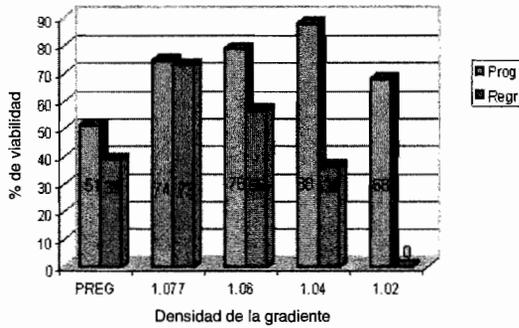
**3.1. Fase progresiva:** En la Fig. 3 se observa el porcentaje promedio de las células de TVT y los promedios de leucocitos presentes en las 10 suspensiones celulares de TVT en fase progresiva. Se destaca que en la pregradiente hay un mayor porcentaje de infiltración leucocitaria (38.4%), siguiendo en orden decreciente las densidades 1.06 con 15.0% de leucocitos, densidad 1.077 un 23.6%, la gradiente 1.04 un 11.9% y la densidad 1.02 un 2.5% de leucocitos.

Los linfocitos fueron los más abundantes, alcanzando un 15.4% en la pregradiente y en las densidades 1.077, 1.06, 1.04 y 1.02 se obtiene un 11.6%, 14.3%, 9.2% y 6.55%, respectivamente. Los polimorfos nucleares neutrófilos (PNN), monocitos-macrófagos (MyM) y eosinófilos, registraron valores más bajos (Fig. 4).

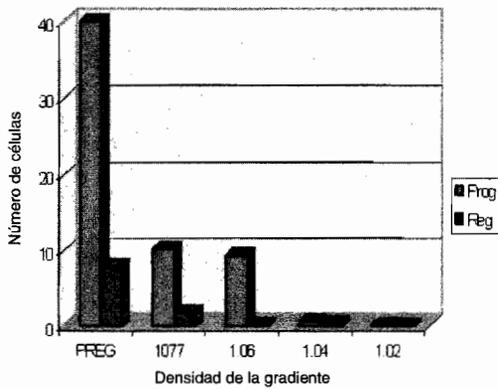
En Fig. 7 se observa, a nivel citológico, que en fase progresiva pregradiente (7a) existe una población heterogénea de células, incluyendo células tumorales y células leucocitarias infiltrativas con predominio de linfocitos y (PMN) neutrófilos. Postgradiente con densidad 1.077 (7b) se observa un claro predominio de células tumorales con algunos linfocitos remanentes.

**3.2. Fase regresiva:** se puede destacar la diferencia que se obtiene al comparar el número de

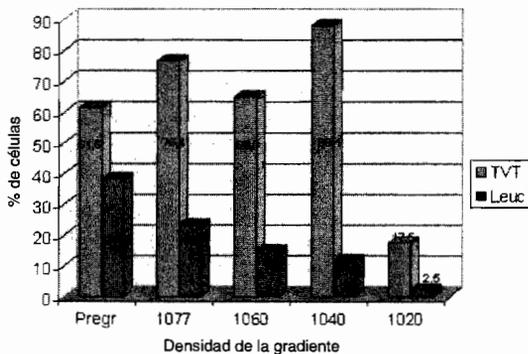
**FIG. 1**  
PORCENTAJE (%) DE VIABILIDAD CELULAR DE SUSENSIONES DE TVT EN FASE PROGRESIVA Y REGRESIVA PRE Y POSTGRADIENTE CELULAR



**FIG. 2**  
RENDIMIENTO CELULAR EN FASE PROGRESIVA Y REGRESIVA



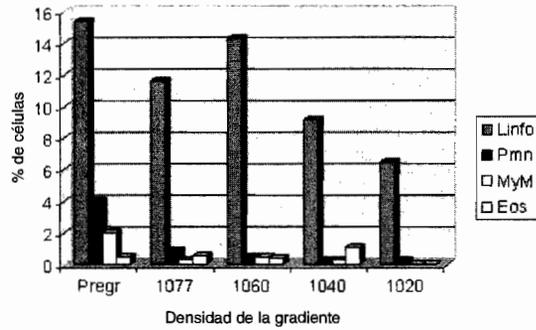
**FIG. 3**  
DISTRIBUCIÓN PORCENTUAL DE CÉLULAS DE TVT Y LEUCOCITOS EN SUSENSIONES DE TVT PROGRESIVO PRE Y POSTGRADIENTE



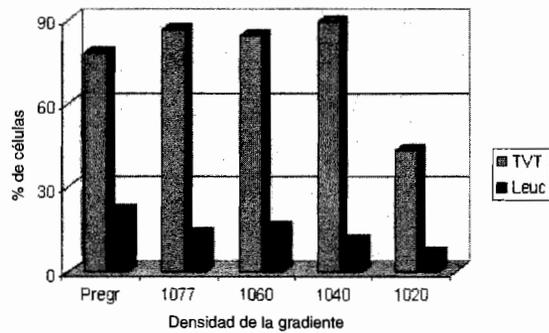
células de TVT v/s leucocitos, donde el mayor porcentaje de estos últimos se alcanzó durante la pregradiente (38.4%). En la postgradiente la media más alta fue en la densidad 1.077 (23.6%), y la menor 2.5% en la densidad 1.02 (Fig. 5).

Las células que siempre estuvieron presentes fueron los linfocitos, los que se encontraron en ma-

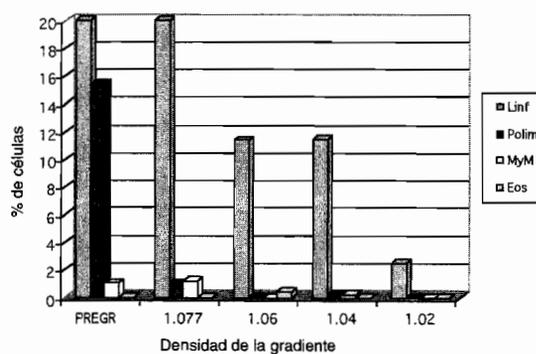
**FIG. 4**  
DISTRIBUCIÓN PORCENTUAL DE LEUCOCITOS EN SUSENSIONES DE TVT PROGRESIVO PRE Y POSTFRACCIONAMIENTO



**FIG. 5**  
DISTRIBUCIÓN DE CÉLULAS DE TVT Y LEUCOCITOS EN SUSENSIONES DE TVT REGRESIVO PRE Y POSTGRADIENTE

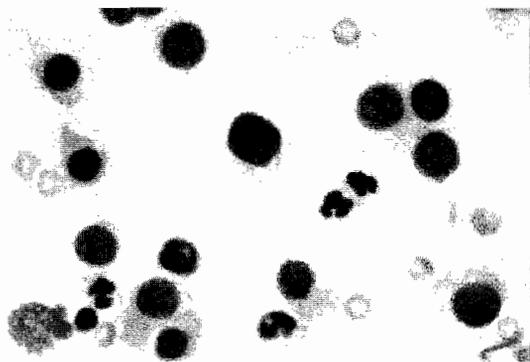


**FIG. 6**  
DISTRIBUCIÓN DE CÉLULAS LEUCOCITARIAS EN SUSPENSIÓN DE TVT EN FASE REGRESIVA

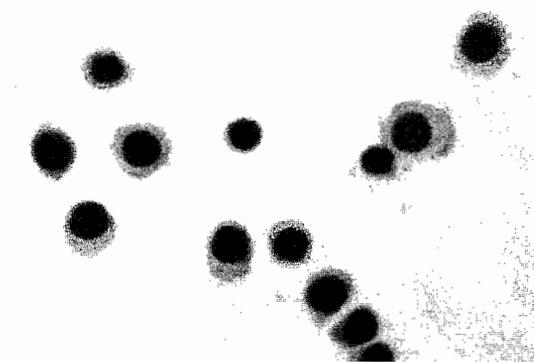


yor porcentaje en la pregradiente (22%). En la postgradiente, el mayor valor fue de 21.4% en la densidad 1.077 y el menor registro fue 2.5% en la densidad 1.02 (Fig. 6).

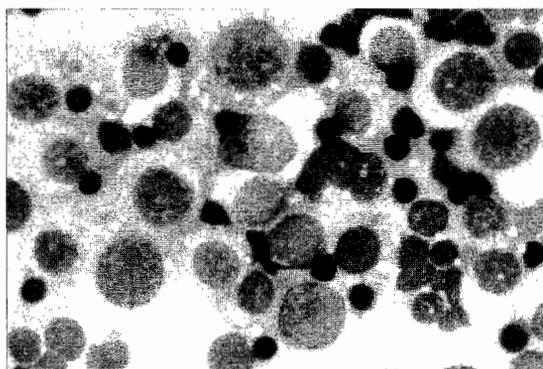
En Fig. 8 se observa, a nivel citológico, que en fase regresiva pregradiente (8a) se observan células tumorales y abundantes células leucocitarias



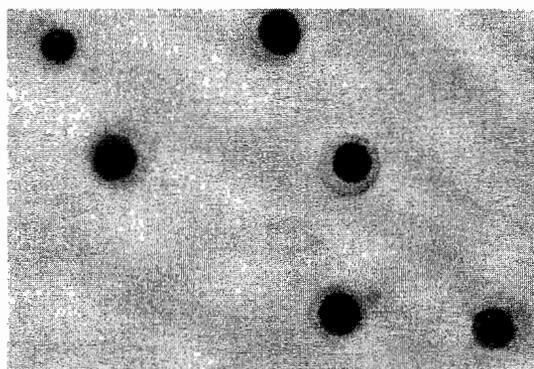
**Fig. 7a.** Frotis de TVT en fase progresiva pre gradiente. Se observa células tumorales y leucocitarias, con predominio de PMN neutrófilos 400x. Giemsa.



**Fig. 7b.** Frotis de TVT en fase progresiva post gradiente, densidad 1.077. Se observa principalmente células tumorales y escasos linfocitos remanentes 400x. Giemsa.



**Fig. 8a.** Frotis de TVT en fase regresiva pre gradiente. Se observa células tumorales y numerosos linfocitos 400x. Giemsa.



**Fig. 8b.** Frotis de TVT en fase regresiva post gradiente, densidad 1.077. Se observa solamente células tumorales 400x. Giemsa.

infiltrativas con predominio de linfocitos. En postgradiente con densidad 1.077 (8b) se observa un claro predominio de células tumorales.

#### FASE PROGRESIVA Y REGRESIVA POSTGRADIENTE

Mejor rendimiento celular lo arroja la densidad 1.077. Mejor viabilidad celular, densidad 1.04 y 1.077. Mejor grado de purificación de células de TVT, densidad 1.04 y 1.077.

#### DISCUSIÓN

Todas las muestras obtenidas de distintos casos clínicos de TVT progresivo presentaron infiltración con leucocitos, fibroblastos, eritrocitos y contaminación con bacterias, tanto pre como postgradiente, lo que concuerda con los resultados obtenidos por Okamoto y cols., en 1996.

El aumento considerable de células leucocitarias, especialmente linfocitos, durante la fase regresiva del tumor, podría estar relacionado con la respuesta inmune generada por el individuo después de realizado el tratamiento quimioterápico. Este aumento se apreció tanto en la pregradiente como en las distintas densidades utilizadas. La presencia de neutrófilos, macrófagos y eosinófilos podría ser atribuida a una respuesta inespecífica ante la neoplasia o a la contaminación bacteriana, esto concuerda con lo descrito por Hill y cols, 1984, y Oltra, 1999.

El proceso de centrifugación permite separar células muertas y detritus aumentando el porcentaje de viabilidad; este aumento observado durante la postgradiente, usando la densidad 1.04, se debería a que en la interfase se obtienen sólo células vivas, ya que las muertas al sufrir cambios osmóticos precipitarían con mayor facilidad, por lo que se corroboran los resultados obtenidos en 1996 por Okamoto y cols., quienes indican las ventajas de utilizar la técnica de centrifugación en gradiente de densidad.

La disminución significativa del número de células observadas en las densidades 1.04 y 1.02 podría ser consecuencia de un efecto físico de la gradiente sobre las células, ya que al ser tan bajas estas densidades todas las células precipitarían, debido a que no se formaría una interfase, lo que concuerda con lo planteado por Alberts y cols., en 1994.

El mejor grado de purificación de células de TVT se alcanzó al utilizar la gradiente de densidad 1.04, siguiendo luego la densidad 1.077. Estas densidades serían las más adecuadas para realizar cultivos o estudiar morfología celular. Un menor grado de pureza se obtuvo con la gradiente 1.02, lo cual podría deberse principalmente a que con esta densidad se obtiene un bajo rendimiento celular debido a que no se forma una interfase, por lo que no se estarían recuperando células tumorales. Estos resultados no concuerdan con lo descrito por Okamoto y cols. (1996), quienes en su trabajo obtuvieron un 99% de pureza independiente de la densidad de gradiente utilizada, lo cual podría explicarse por los distintos componentes de la gradiente utilizados por estos investigadores.

El mayor rendimiento celular de suspensiones de TVT sometidos a gradiente de centrifugación en este estudio se alcanzó al utilizar la gradiente de densidad 1.077. Se debe destacar que no hay publicaciones de TVT regresivo sometido a gradiente de centrifugación.

El TVT es un tumor muy celular con escaso estroma y sus células no presentan uniones entre sí. Estas características permiten obtener una fracción de células de TVT más pura, eliminando células leucocitarias infiltrativas, lo que favorece el estudio de su morfología, comportamiento y características. Más aún, en este estudio se observó que la utilización de gradientes de densidad no sólo permite separar células de TVT, sino también aumentar el porcentaje de viabilidad de estas suspensiones al lisar y eliminar células muertas o dañadas; sin embargo, esto puede conllevar a una reducción importante en el número final de células a obtener.

## CONCLUSIONES

Se puede concluir que las densidades a utilizar para obtener un buen rendimiento celular de suspensiones de TVT serían las densidades 1.077 y 1.06, tanto en fase progresiva como regresiva del tumor. Las densidades 1.04 y 1.06 serían las mejores gradientes en la etapa progresiva del tumor y de la fase regresiva, las densidades 1.077 y 1.06.

## BIBLIOGRAFÍA

- ALBERTS W., BRAY D., LEWIS J., RAFF M., ROBERTS K., WATSON J. 1994. *Molecular biology of the cells*. 3ª ed.: 156-162.
- BLOOM F., PAFF G., NOBACK C., 1951. *The transmissible venereal tumor of the dog*. Am. J. Pathol., 27 (1): 119-139.
- BOOTH M. J., 1994. *Canine transmissible venereal tumour and ovarian papillary cystadenocarcinoma in a bitch*. J. Small Animal Pract., 35: 39-42.
- BOYUM A., 1968. *Isolation of leucocytes from human blood*. Scandinavian J. Clin. Lab. Investigation, 97: 9-29.
- FELDMAN E., 1987. *Endocrinología y reproducción canina y felina*. 2ª ed. Filadelfia, Editorial WV, Saunders.: 531-532.
- GONZÁLEZ C. M., GRIFFEY, S. M., NAYDAN, D. K., FLORES, E., CEPEDA, R., CATTANEO, G., MADEWELL, B. R., 2000. *Canine transmissible venereal tumour: a morphologic and immunohistochemical study of 11 tumours in growth phase and during regression following chemotherapy*. Journal of Comparative Pathology, 122(4): 241-248.
- HILL D., YANG T., WATCHEL A. (1984). *Canine transmissible venereal sarcoma: Tumor cell and infiltrating leukocyte ultrastructure at different growth stages*. Veterinary Pathology 21: 39-45.
- IDOWN, A. L., 1977. *The chromosomes of the transmissible venereal tumour of the dog*. In Ibadan, Nigeria. Res. Vet. Sci. 22 (3): 271-273.
- LOMBARDI C., 1995. *Evaluación del tratamiento quimioterapéutico con vincristina en la regresión del tumor venéreo transmisible canino espontáneo y su efecto sobre la respuesta inmune antitumoral*. Tesis Magister, Fac. de Cs. Veterinarias y Pecuarias. U. de Chile: 48-50.
- LÓPEZ M., LEYGTHON C., GRAF M. (1982) *Técnicas de laboratorio para citología e histopatología*. Edit. Dpto. Biología celular y genética, Fac. Med. U de Chile, 2ª edición. Págs 104-111.
- MARCHAL T., CHABANNE L., KAPLANSKI C., RIGAL D., MAGNOL J. P. 1996. *Immunophenotype of the canine transmissible venereal tumour*. Vet. Immunol. and Immunopathol., 57: 1-11.
- MAXEY L., 1996. *Citology and the diagnosis of neoplasia*. Proceedings of the 20<sup>th</sup> Waltham/Osu Symposium.
- OKAMOTO Y., MINAMI S., MATSUHASHI A., FUJINAGA T., 1996. *Isolation of viable cells in canine transmissible sarcoma (CTS) using density gradient centrifugation*. J. Vet. Med. Sci., 58 (11): 1149-1151.
- OLTRA O., 1999. *Respuesta inmune celular frente al tumor venéreo transmisible del canino en fase progresiva y regresiva*. Memoria de título, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. Universidad de Chile.
- PÉREZ L., VERGARA K., VENTURA J., 1978. *Tratamiento quirúrgico y quimioterápico del tumor venéreo transmisible de localización nasal en caninos*. Archivos de Medicina Veterinaria. 10 (2): 149-152.
- VERMOOTEN M., 1987. *Canine transmissible venereal tumour: A Review*. J. Of the South African Veterinary Association 87(03):147-750.
- ROGERS, K. 1997. *Transmissible Venereal Tumour*. Small Animal, 19: 1036-1044.
- WOIMANT X., CHAFFAUX S., 1977. *Néoplasie vénérienne du chien et de la chienne (sarcoma de Sticker)*. Rec. de Méd. Vét. l'école d'Alfort 153 (5): 331-338.