

## FENOMENOS DE FAGOCITOSIS OBSERVADOS EN CELULAS NEOPLASICAS \*

### NOTA PRELIMINAR

Prof. CECILIO F. ROMAÑA  
(Barcelona)

Señor Presidente, señores Académicos, señoras, señores:

Hoy tendré el honor de presentar a Vds. algunas imágenes de actos de fagocitosis a cargo de células neoplásicas o de células sospechosas de serlo.

Quiero adelantar que esta comunicación tiene sólo el carácter de nota preliminar y es presentada en el deseo de llamar la atención de los especialistas sobre un fenómeno biológico un tanto olvidado. Como nota preliminar sus conclusiones no son absolutas, su estudio debe continuar y las observaciones deben ser confirmadas por otros autores para que adquieran real valor.

Nos interesamos por este tema después de habernos sumergido en el apasionante mundo de la inmunología neoplásica y de la lucha frecuentemente entablada entre células malignas y defensas celulares

y humorales de los tejidos atacados.

Al estudiar las características de las células malignas no hallamos referencias, en los tratados de oncología, a que tuvieran capacidad fagocitaria. Sólo cuando vimos una película sobre el cultivo de los tumores «in-vitro», film pasado con tiempo acelerado, nos llamó la atención la gran movilidad de ciertas células neoplásicas, movilidad que las llevaba a penetrar profundamente en los tejidos sanos vecinos, fenómeno que en las células normales está frecuentemente relacionado con su poder de captación.

### EXPERIENCIAS EN ANIMALES. MATERIAL Y METODOS

Disponiendo en nuestro laboratorio de un tumor de ratón, el sarcoma peritoneal T 180 que se transmite muy fácilmente de ratón a ratón

\* Sesión del día 31 - V - 77

por inoculación de exudado peritoneal rico en células, decidimos iniciar experiencias con este tumor.

El hecho de que las células de esta neoplasia tiene origen o se desarrollen a expensas de las células de revestimiento del endotelio peritoneal nos alentó en llevar adelante la experiencia. En efecto, estas células de revestimiento, como otras serosas, pertenecen al S.R.E.; era pues muy posible que las células neoplásicas conservaran la más importante función de aquel sistema: su capacidad fagocitaria. Además teníamos ya experiencia sobre la acción fagocitaria de las células endoteliales normales del peritoneo sobre bacilos de BCG.

El primer ensayo lo realizamos cultivando «in-vitro» células del sarcoma en medio del cultivo M 199 y agregando bacilos libres BCG. A las 48 horas sacrificamos el cultivo y realizamos extendidos de las células que fueron fijadas con acetona y coloreadas con Ziehl. En las preparaciones pudimos observar células tumorales fagocitando bacilos de BCG.

Posteriormente reiniciamos las experiencias con otra técnica: 2 ratones inoculados 48 horas antes con sarcoma T 180 fueron reinoculados con una suspensión de carbón vegetal estéril. Un ratón fue sacrificado a las 48 horas y otro a las 72 horas. Extendidos del exudado peritoneal fueron coloreados por el método de WRIGHT. Se pudieron observar muy buenas imágenes de fagocitosis del

carbón como apreciaremos en las diapositivas. No había duda de que los macrófagos eran células tumorales pues los núcleos son semejantes a los de las otras células neoplásicas vecinas y generalmente con buen número de nucleolos. En una preparación coloreada con Giemsa se observó la fagocitosis de una célula tumoral conteniendo carbón por otra de mayor tamaño igualmente tumoral.

Muchas de las células macrofágicas mostraban signos de necrobiosis: protoplasma pálido, abundantes vacuolas y destrucción de la membrana celular.

Ante este resultado alentador conseguido con carbón intentamos nuevamente obtener la fagocitosis de BCG. Para ello inoculamos en dos ratones una mezcla de células de sarcoma T 180 junto con una suspensión de bacilos procedentes de un cultivo en profundidad con muchas unidades libres. Los ratones fueron sacrificados a las 24 y a las 48 horas. En ambos ratones las preparaciones coloreadas con Ziehl mostraron buena cantidad de células neoplásicas conteniendo bacilos.

De igual manera que las células tumorales que habían fagocitado carbón, las que fagocitaron BCG mostraron signos de necrobiosis muy acentuado, fenómeno que, en ciertos casos, se extendía a las células vecinas libres de bacilos. Comentarios sobre las observaciones anteriores las reservamos para el final de esta comunicación.

## FENOMENOS DE FAGOCITOSIS EN NEOPLASIAS HUMANAS

### *Observación en células de linfoma*

En la literatura médica existen algunas publicaciones sobre fenómenos de fagocitosis observados en células de sangre leucémica, publicaciones a las cuales nos referiremos más adelante. Nosotros tratamos de conseguir sangre de casos de leucemias agudas para proseguir nuestras investigaciones. En la búsqueda de material llegó a mis manos una sangre clasificada como leucémica, pero que después resultó procedente de una enferma que sufría linfoma linfocítico (linfocitoma) difuso bien diferenciado. En el momento de la extracción de sangre el número de linfocitos blásticos era de 30 %. Es así como sin buscarlo especialmente estudiamos la capacidad fagocitaria de los blastocitos de un linfoma y no de una leucemia pura, error que consideramos más bien favorable, pues los linfomas son también llamados reticulomas o reticuloendotelomas a causa de su origen reticuloendotelial.

Las células sanguíneas en cuestión, después de centrifugadas y lavadas en medio M 199 fueron cultivadas en el mismo medio al cual se agregó suero AB y una suspensión de bacilos de BCG, colocando luego el cultivo a 37°. A las 48 horas el cultivo fue retirado, centrifugado lentamente y con el sedimento se hicieron extendidos luego coloreados

con Ziehl. Las imágenes que proyectaré inmediatamente muestran los fenómenos de fagocitosis observados en las células linfoides. Todo lleva a pensar que los fagocitos son blastocitos y no linfocitos adultos, pues al medio de cultivo no se agregó ningún inductor de la transformación blástica y el período de tiempo de cultivo sólo fue de 48 horas. Como veremos en las diapositivas sólo ciertas células linfoides tienen capacidad fagocítica. Muchas células fagocitarias entran en necrobiosis.

## FENOMENOS DE FAGOCITOSIS OBSERVADOS EN CELULAS DEL MELANOMA MALIGNO

Nuestras investigaciones también se orientaron hacia un tumor sólido el melanoma maligno. Hemos tenido oportunidad de cultivar dos biopsias de este tumor.

### *Material y método*

Las biopsias fueron puestas en cultivo pocas horas después de obtenidas. El cultivo se efectuó en medio M 199 después de haber desintegrado con agujas el tejido melánico y lavado dos veces el material obtenido. Al cultivo se agregó una suspensión de BCG y se colocó a 37° durante 48 h. Luego el cultivo fue centrifugado y se efectuaron extendidos con el sedimento, fijación con acetona y coloración con Ziehl.

El examen mostró frecuentes imá-

genes de células melánicas que contenían bacilos de Koch. La dificultad de poner en evidencia los bacilos de Koch por otro método de tinción impidió hasta ahora que usáramos coloraciones diferenciales para establecer si las células fagocitarias son melanocitos o melanófagos. Será necesario realizar una tinción que colorea simultáneamente los bacilos y la Dopa - oxidasa.

Hemos observado que muchas de las células melánicas, conteniendo o no bacilos ofrecen una interesante imagen con pseudopodios que dan al conjunto una «figura en granada» muy característica.

#### INVESTIGACION DE FENOMENOS DE FAGOCITOSIS EN CELULAS DE OTROS TUMORES

Hemos tenido oportunidad de realizar cultivos de células de dos tumores pulmonares epitelioides con extensión pleural. Los cultivos se realizaron en medio M 199 a partir de líquido pleural, agregando bacilos de BCG.

En ninguno de los dos casos pudimos observar fenómenos de fagocitosis. Entre tanto, el distinguido citólogo de la Ciudad Sanitaria F. Franco, doctor Rafael Ortiz, ha tenido la gentileza de comunicarme la observación de fenómeno de fagocitosis por parte de células de tumores adenocarcinomatosos también de origen pulmonar, y en células halladas en líquido pleural.

Como el doctor Ortiz no podía concurrir a esta reunión ha tenido la delicadeza de facilitarme algunas diapositivas aún inéditas de su colección particular a fin de que las enseñe. Las observaciones las realizó el doctor Ortiz en el transcurso de los exámenes de rutina para el diagnóstico citológico de los exudados pleurales. Casi siempre se trata de la fagocitosis de una célula tumoral por otra célula tumoral en una verdadera citofagia familiar, algo semejante a la observación realizada por nosotros en el sarcoma de ratón.

#### COMENTARIOS

Las imágenes que ha tenido el honor de presentar a ustedes merecen un corto comentario:

En el caso del sarcoma T 180 del ratón no hay ninguna duda sobre la filiación y la capacidad fagocitaria de las células neoplásicas. Su origen en el endotelio peritoneal explica, a nuestra manera de ver, su macrofagia.

Los infocitos que hemos visto, ricos en bacilos de BCG, también pueden ser relacionados con el S.R.E. En efecto, sabemos que las células sanguíneas tienen un origen común en el hemohistioblasto. Es verdad que hasta hace poco los linfocitos eran considerados totalmente desprovistos de capacidad fagocitaria. Pero la observación de su transformación en blastocitos, ya sea en forma natural o bajo la influencia de

inductores químicos, les han elevado a una jerarquía excepcional dentro de las células inmunológicamente competentes, y, justamente las células linfoides leucémicas tienen carácter embrionario, aún cuando patológico. En la bibliografía mundial hemos hallado algunos trabajos sobre la capacidad fagocitaria de las células leucémicas; el primero se remonta a 1927. En él, Timofejewsky y cols., refieren la fagocitosis de bacilos de Koch virulentos por mieloblastos sanguíneos en casos de «leucemia mieloblástica aguda», empleando una terminología actualmente en desuso. Un trabajo reciente que hemos consultado, es de Neuwistová y cols. (1975), titulado «Phagocytic Activity of Leukaemic blasts». Este trabajo se refiere a cultivos realizados con sangre de 20 adultos y 16 niños sufriendo de leucemias agudas. Las células leucémicas tenían «in-vitro» una actividad fagocitaria elevada de Ferrioxidsacarato en casos de «leucemia monocítica» y, en menor grado, en leucemias linfoblásticas o en leucemias reticulares. En nuestro caso los linfocitos macrofágicos observados provinieron, no de una leucemia sino de un linfoma. Neuwistová y cols. en el trabajo citado, indican en la bibliografía, una publicación, por ellos realizada, sobre fagocitosis observada en un linfoma sin precisar las células que la efectúan.

En nuestro caso las células fagocitarias han sido linfocitos que suponemos blastocitos, justamente por

la función que realizan y por saber que los linfocitos adultos no la efectúan.

Por último comentará los fenómenos de fagocitosis observados en células de melanoma maligno cargadas de melanina que hemos observado: nos interesamos por ese tumor al haber visto la acción curativa local que ejerce el BCG sobre metástasis melánicas de la piel cuando inyectado dentro del tumor, fenómeno que no ocurre con otras inmunostimulinas bacterianas anticancerosas como *Corynebacterium parvum*. Los autores que se han ocupado de dar una explicación a poder curativo local del BCG, como Morton (1976) se refieren a la acción estimulante de las defensas o a una posible acción alérgica local que provoca una reacción inflamatoria que acaba con las células neoplásicas. No hay referencias a fenómenos de fagocitosis por parte de las células melánicas. Quiero recordar aquí que las células melánicas de la piel normal también tienen origen en el mesénquima, en las crestas neurales, para algunos autores, mientras para otros en las células de Langerhans de la piel con las cuales tienen gran afinidad morfológica; células de Langerhans que pertenecen al SRE y participan de su función macrofágica.

Es muy interesante, pues, señalar que en nuestras tres observaciones de fagocitosis por células neoplásicas se puede descubrir en ellas una filiación con el SRE.

Sin embargo, éste no es el caso en las interesantes observaciones hechas por el doctor Ortiz en donde las células neoplásicas son de filiación endodérmica.

Consideramos que de confirmarse las investigaciones sobre capacidad fagocitaria de las células neoplásicas habrá una gran cantidad de problemas a investigar, entre los cuales se destacan: 1.º ¿Cuáles son los tipos celulares neoplásicos con mayor capacidad fagocitaria? 2.º ¿Qué relación existe entre la capacidad invasora de ciertos tumores y su capacidad de fagocitosis? 3.º ¿Qué relación existe entre malignidad y fagocitosis? 4.º ¿Qué relación existe entre enzimas proteolíticas fabricadas por las células tumorales y su capacidad de destrucción de las células normales? ¿Qué beneficio puede obtenerse en terapéutica

anticancerosa de la capacidad fagocitaria de las células neoplásicas? En fin, pueden haber otros problemas interesantes que escapan actualmente a nuestra visión.

#### AGRADECIMIENTOS

Debemos agradecer al profesor J. Piñol Aguadé, catedrático de Dermatología de la Facultad de Medicina y a la doctora T. Castel, del Servicio anexo, las facilidades que nos han ofrecido para obtener material de melanoma maligno. Agradecemos nuevamente al doctor R. Ortiz su amable colaboración a nuestro trabajo. Al Laboratorio Experimental de Terapéutica Inmunológica (LETI), vaya nuestro reconocimiento por las facilidades que nos ofreció para estas investigaciones.

#### BIBLIOGRAFIA

- BERNARD, J.; BESIS, M.; BIOZZI, G., y cols.: *Confrontations Cytologiques. Nouvelle Revue Française d'Hématologie*, 3, 6, 779-804, 1963.
- CARR YAN: *The Macrophage*. Academic Press, London and New York, 1973.
- EVERSON PEARSE, A. G.: *Histoquímica*. Aguilar, Madrid, 1960.
- MORTON, D. L.: *Inmunoterapia del Cáncer*. Visión Panorámica. Seminarios de Oncología. Editorial Médica Panamericana. Junin 831, Buenos Aires, 1976.
- NEUWISTOVÁ, O., y cols.: *Phagocytic Activity of Leukaemic Blasts*. *Acta Haematol.*, 53, 17-24, 1975.
- PIÑOL AGUADÉ, J.: *Citodiagnóstico de los tumores y reticulosis de la piel*. Stutex Ibérica. Barcelona, 1973.
- TIMOFEJEWSKY, A. D. y cols.: *Zur Frage über die Reaktion pathologischer Leucocytenformen des Menschenbluts in vitro auf Tuberkelbacillen*. *Wich. Arch.*, 264, 3, 605-617, 1927.