

# Estudios experimentales en células cultivadas del Linfoma de Burkitt \*

Doctor JULIO ENRIQUE OSPINA \*\*

## INTRODUCCION

La descripción de tumor de Burkitt en el África, por Burkitt en 1958<sup>1</sup> y O'Conor en 1961<sup>2</sup> despertó gran atención por su peculiar distribución geográfica, ya que esta hizo sospechar que la enfermedad fuera debida a un factor infeccioso transmitido posiblemente por un artrópodo. La demostración hecha por Epstein y Barr, de partículas virales en biopsias de casos africanos<sup>3</sup> y de Nueva Guinea<sup>4</sup> en los años de 1964 y 1967 respectivamente, contribuyó a que muchos estudios experimentales relacionados con el cáncer se focalizaran en este tumor. A partir del año de 1964 estos virus se denominaron de Epstein y Barr o virus EB, en honor a los descubridores. En el mismo año Pulvertaft<sup>5</sup> consiguió establecer cultivos celulares de biopsias de un caso africano en las cuales se descubrieron los mismos virus. Los cultivos celulares sirvieron de base para diversos estudios inmunológicos como los hechos por Henle y colaboradores en 1966<sup>6</sup> quienes com-

probaron que los virus presentes en las células inducían la formación de antígenos específicos, los cuales no tenían reacciones cruzadas con ningún tipo conocido de virus Herpes, con los cuales fueron relacionados los virus EB.

En el año de 1967 Klein y colaboradores<sup>7</sup> demostraron la síntesis de otro antígeno dependiente de las células tumorales y no de los virus formados en ella pero también específico de la enfermedad.

Otro importante hallazgo fue hecho por Henle en el año de 1968<sup>8</sup> al descubrir la relación entre el virus EB y la mononucleosis infecciosa. Desde el establecimiento de los primeros cultivos celulares a 37°C, se vio que solamente del 0.5% al 10% de las células tenían virus. Para resolver la dificultad que esto implicaba en su purificación, Hinuma y sus colaboradores en el año de 1967<sup>9</sup> experimentaron sobre los efectos de diversas temperaturas en la síntesis del virus. Comprobaron que a 33°C y bajo condiciones de desnutrición total se observaba síntesis viral en un 30% o 40% de células. La presencia de los virus se estableció por microscopía electrónica<sup>10</sup> y técnicas inmunofluorescentes para el antígeno descrito por los Henle.

\* Trabajo hecho en el Laboratorio de Microscopía Electrónica y Cultivo de Tejidos, Sección de Investigación, Instituto Nacional de Cancerología, Bogotá.

\*\* Jefe del Grupo de Microscopía Electrónica, Instituto Nacional de Cancerología, Profesor asistente de Patología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional.

La descripción de casos de tumor de Burkitt en Colombia por Beltrán y Correa<sup>11</sup> y<sup>12</sup> en el año de 1966 y en el Brasil por Fagundes en 1968<sup>13</sup> permitió iniciar estudios biológicos tendientes a comprobar en pacientes Latinoamericanos con tumor de Burkitt, la presencia de virus similares a los descritos en los casos africanos.

En el presente trabajo se plantean los siguientes interrogantes:

1. ¿Qué tipo de alteración metabólica sufren las células de este tumor cuando son cultivadas a 33°C? ¿Serán sus características inmunológicas iguales a las observadas en los cultivos mantenidos a 37°C?
2. ¿Contienen los tumores de Burkitt colombianos virus EB y reaccionan sus cultivos celulares en forma similar a los africanos, ante el cambio de temperatura?

## MATERIAL Y METODOS

### Células Africanas

Se usó la línea celular HRIK derivada por Hinuma<sup>9</sup> de los cultivos establecidos por Pulvertaft<sup>8</sup>. Como medio de cultivo se empleó MEM (Minimun Essential Medium de Eagle)<sup>14</sup> suplementando con un 20% de suero fetal de ternero y 20 ug de L-serina, 100 ug de piruvato de sodio, 100 ug de estreptomicina, 100 unidades de penicilina por ml. Esta mezcla se denominó MMEM. Las células se incubaron en concentraciones de 1.000.000 por ml. a 37° y 33°C en una incubadora marca National. El

crecimiento celular se controló cada 2 o 3 días por medio de recuentos y coloración con azul de tripano. Se le administró en nuevo medio de cultivo los mismos intervalos de tiempo, a las células a 37°. En lo referente a las técnicas inmunofluorescentes, los frotis celulares se prepararon en la siguiente forma:

1. Se lavaron las células con PBS (Tampón Fosfato Salino) a un pH de 7.2.
2. Se centrifugó el material a 1000 rpm. por 10 minutos y el sedimento se disolvió en el mismo tampón, en concentraciones de 500.000 y 1.000.000 de células en volúmenes de 0.2 ml.
3. Se colocaron gotas del mismo material sobre láminas de vidrio y se fijaron en acetona durante 10 minutos después de haberlas secado a temperatura ambiente.
4. Las células se colorearon con isotiocinato de fluoresceína combinado con suero específico (1;10), por medio del método directo. En algunos experimentos se siguió el método indirecto para el estudio de la inmunoglobulinas G y M, por medio del uso de suero de carnero antihumano como segundo reactivo.

En cada lámina se contaron entre 500 y 700 células usando tanto la luz ultravioleta como blanca. El porcentaje de células positivas se calculó dividiendo el número de células fluorescentes por el número total de células examinadas.

## Células Colombianas

### Casos clínicos.

**Caso N° 1** En un niño de 4 años, natural y procedente de Sogamoso, consultó a una Institución hospitalaria por presentar una masa de 8 x 5 cms. en la región submaxilar izquierda. El tumor tenía 3 meses de evolución y era de rápido crecimiento. Una biopsia del mismo se diagnosticó como linfoma de Burkitt. No se encontraron células inmaduras en sangre periférica. El paciente fue tratado con radioterapia sobre la zona tumoral y metotrexate. Poco antes de su muerte presentó ictericia obstructiva. La autopsia reveló un tumor retroperitoneal de 20 x 15 x 15 cms. el cual reemplazaba la casi totalidad del páncreas y comprimía el hilio hepático. (Fot. 1). También se encontró infiltración tumoral en ambos riñones.

Del tumor retroperitoneal se extrajo tejido para cultivos celulares y estudios al microscopio electrónico.

**Caso N° 2.** Una niña de 6 años de edad, natural y procedente de Bogotá, consultó a su médico por presentar adenopatías cervicales de 2 meses de evolución. Le recetaron antibióticos y drogas anti-inflamatorias. Dos meses más tarde presentó una masa en la región cervical derecha de 7 x 5 cms. El examen físico reveló otra masa en la región pélvica. Se le hizo una laparotomía exploradora, encontrándosele un tumor de 6 cms. en el ovario derecho y compromiso tumoral del izquierdo. Se le practicó ooforectomía bilateral y biopsia de la masa cervical. Del tumor ovárico derecho se extrajo tejido para cultivos celulares y microscopía electrónica. El examen histopatológico de los tejidos reveló un linfoma de Burkitt. No se encontraron células inmaduras en sangre periférica.

La paciente fue tratada con radioterapia y ciclofosfamida sin éxito. Falleció en insuficiencia respiratoria y no se le practicó autopsia.

## Establecimiento de los cultivos celulares.

Los tejidos extraídos bajo condiciones asepticas se lavaron en CMF-PBS (Tampón Fosfato Salino libre de Calcio y Magnesio). Fueron reducidos a fragmentos de 1 mm, y digeridos con tripsina según la técnica de Merchant, Kahn y Murphy.<sup>15</sup>

Las células así obtenidas se incubaron en frascos MA de Microbiological Associates, en concentraciones que variaron entre 250.000 y 500.000 por ml. de MEMEM, a 37°C. El crecimiento celular se controló en la forma ya mencionada y una vez establecida la cepa celular, se procedió a cultivar parte de ella a 33°C.

## Microscopia electrónica

Los cultivos se estudiaron con intervalos de 3 días. Biopsias y cultivos se fijaron en glutaraldehido<sup>16</sup> disuelto en solución salina de Hank<sup>17</sup> en una concentración del 3%, a 4°C y durante 5 horas. Se usó tetróxido de osmio<sup>18</sup> como post-fijador, en concentración del 2% en la misma solución salina y bajo condiciones similares a las del glutaraldehido. Los tejidos fueron deshidratados según las técnicas descritas para microscopía electrónica<sup>19</sup> e incluidos en Epon-Araldita según el método de Mollenhauer<sup>20</sup>. Los cortes se llevaron a cabo en un ultramicrotomo MT2 Porter-Blum y el material obtenido, extendido sobre rejillas recubiertas de colodión, se impregnó con acetato de uranilo<sup>21</sup> y citrato de plomo<sup>22</sup>. Los

tejidos fueron examinados en un microscopio electrónico JEM 7A con un voltaje de aceleración de 80 kilovoltios.

## RESULTADOS

### Células Africanas.

Un 8% de las células incubadas a 37°C presentaron inmunofluorescencia positiva para el antígeno de Henle (o sea la síntesis de Virus).

El 90% de las células a esta temperatura estaban vivas. Estas cifras fueron consideradas como las del tiempo 0, al inicio de los experimentos. Los cultivos a 33°C presentaron un continuo aumento del número de células fluorescentes, las cuales fueron un 38% del total al octavo día. Por el contrario, el porcentaje de células vivas descendió hasta alcanzar niveles del 35% en el mismo día.

En esta fase, la fluorescencia celular era de tipo difuso, observándose tanto alrededor del núcleo como del citoplasma de la célula. Los bordes celulares eran fácilmente identificables sin que se observara un efecto citopático generalizado (Fotos 2 y 3).

Las células inmunofluorescentes ascendieron hasta el 40% en el día 14 del experimento, siendo las células vivas apenas el 28% del total. La inmunofluorescencia observada era más del tipo puntiforme aunque no bien delimitada. Las células mostraron avanzado estado de citólisis, caracterizado por bordes nucleares y citoplasmáticos borrosos y una alta transparencia celular (Fots. 4 y 5).

Los hallazgos de Hinuma<sup>9</sup> se confirmaron en esta forma.

Con el propósito de determinar si alguna de estas células se adaptaban a las nuevas condiciones de crecimiento (33°C) y estudiar sus características inmunológicas, se inició la nueva fase del experimento. Las mismas células fueron centrifugadas a bajas revoluciones (1000 rpm. por 10 minutos), los sedimentos celulares lavados en la forma descrita en material y métodos y los nuevos cultivos alimentados con MEMEM. Se mantuvo la misma temperatura del cultivo (33°C) y su crecimiento y síntesis viral se controlaron con intervalos de 4 días, durante 130 días.

En el día 70 las células comenzaron a presentar evidencias de adaptación a sus condiciones ambientales (33°C). El porcentaje de células vivas fue del 80% y el de células inmunofluorescentes positivas del 8, en el día 97 del experimento. En el día 106, la positividad para inmunofluorescencia descendió al 10% y las células vivas representaron el 88% del total. (Gráf. 1). Como se trataba de una cepa celular libre de virus (negativa para las técnicas inmunofluorescentes que determinaron el antígeno de Henle<sup>9</sup> se la denominó JOS con el propósito de diferenciarla de la cepa original HR1K de Hinuma.<sup>9</sup> Se pensó entonces en invertir las condiciones del experimento y cultivar parte de las nuevas células adaptadas, a 37°C. Estas células se denominaron J-116 (37°C) para diferenciarlas de las JOS (33°).

# LINFOMA DE BURKITT - PRODUCCION DE UNA LINEA CELULAR LIBRE DE VIRUS.

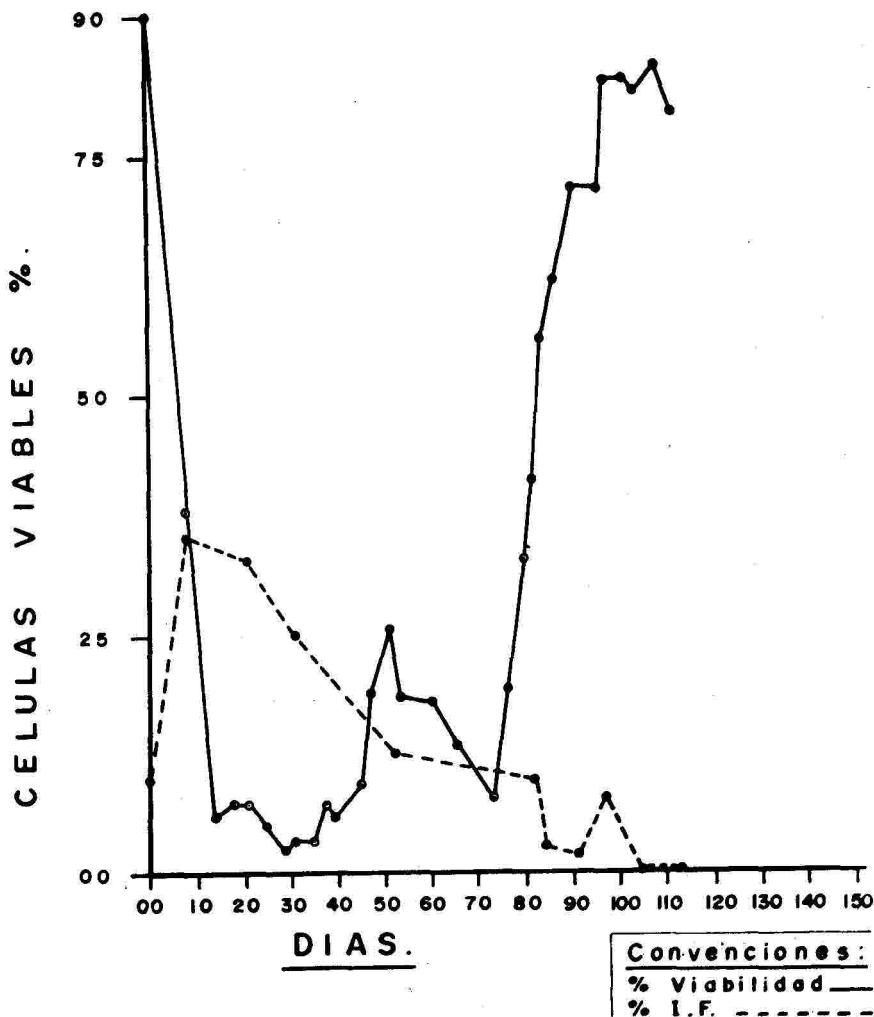


Gráfico 1

Sobre el borde izquierdo se anotan los porcentajes de las células vivas (viables). La línea inferior marca los días de duración de los cultivos. La línea continua indica el número de células vivas y la de rayas el número de células fluorescentes o sea con virus. Se nota que el nivel más alto de inmunofluorescencia corresponde a uno de los porcentajes más bajos de células vivas.

Diversos experimentos tendientes a inducir síntesis de virus EB por parte de las nuevas células demostraron la incapacidad de éstas para hacerlo.

En sus estudios, Hinuma<sup>6</sup> así como Henle<sup>8</sup> comprobaron que las células HR1K producen solamente inmunoglobulina M (IgM). Pensando en una posible relación entre la síntesis viral y la producción de ciertas inmunoglobulinas, se estudió si las células JOS (33°C) así como las J-116 (37°C) continuaban presentando aquellas características. Se iniciaron cultivos en idénticas condiciones, de todas las células mencionadas, las cuales se controlaron del día 0 al 10.

Las células HR1K fueron negativas para IgG y positivas para IgM la cual alcanzó su nivel máximo en el día 3 (10.9%).

Las células JOS presentaron altos niveles de IgG desde el día 0, con un marcado aumento en el día 3 (64.3%) y descenso continuo a partir de dicho día hasta el día 10 (9.8%). Los niveles de IgM fueron siempre más altos que en las células HR1K aunque también descendieron progresivamente durante todas las fases del experimento (64.2%) en el día 0 y 11.1% en el día 10).

Lo mismo se observó en las células J-116 aunque los porcentajes de ambas inmunoglobulinas fueron siempre más altos en las células incubadas a la temperatura más baja (JOS). (Gráf. 2).

Llamó la atención el continuo descenso de las inmunoglobulinas durante los diversos días de la experimentación y aunque no se observaron virus, se pensó que podría ser una consecuencia de cambios sufridos por las células las cuales precederían a la síntesis viral.

Con esto en mente, se experimentó sobre el efecto de la infección del virus EB, a 37°C y 33°C, en las células JOS y J-116. Se usó como control la cepa celular 64-10 establecida por Iwakata y Grace en 1964<sup>24</sup> de una leucemia mieloblástica. Estas células se escogieron por su probada capacidad de ser infectadas con el virus EB.<sup>24</sup>

Las células 64-10 con y sin virus EB, fueron negativas para IgG durante todo el experimento y en las dos temperaturas. Sus niveles de fluorescencia, indicativos de la infección de virus EB, fueron más altos a 33°C. Los datos recogidos tanto de las células JOS como de las J-116 demostraron claramente que la temperatura más baja (33°C) aumenta la síntesis de virus. De estos datos también se pudo concluir que la síntesis de IgG ocurría en forma inversa a la síntesis viral. Las células sin virus EB (sEB), presentaron siempre niveles de IgG sensiblemente más altos que los de las células infectadas.

A partir del día 7 no fue posible estudiar la IgG por causa de sus bajos niveles (Gráf. 3).

## PRODUCCION DE INMUNOGLOBULINAS EN VARIAS LINEAS CELULARES

DIA	H R I K		J O S R 2 K		J - 1 1 6	
	IGG	IGM	IGG	IGM	IGG	IGM
0	0%	3.7%	40.9%	64.2%	8.0%	10.6%
3	0%	10.9%	64.3%	47.3%	28.7%	44.5%
5	0%	No Detect.	53.2%	20.4%	44.0%	25.8%
7	0%	" "	19.2%	23.9%	15.2%	6.8%
10	0%	" "	9.8%	11.1%	11.5%	26.2%

Nº 2. Resume la producción de inmunoglobulinas en las diversas líneas celulares estudiadas.

HR1K: Clona de Hinuma derivada del linfoma de Burkitt.

JOS: Línea celular derivada de la HR1K y mantenida a 33°C.

J-116: Corresponde a la línea celular JOS cultivada a 37°C.

Se observa que tanto la JOS como la J-116 sintetizan IgG, hecho que las diferencia de las células que las originaron (HR1K). También sus niveles de IGM son sensiblemente más altos.

## INFECTIVIDAD DE VIRUS DE BURKITT EN TEMPERATURAS DIVERSAS

	37°C				33°C			
	4 DIAS		7 DIAS		4 DIAS		7 DIAS	
	I. F.	IGG	I. F.	IGG	I. F.	IGG	I. F.	IGG
64-10 c EB	13.7%	0.0%	5.5%	—	17.0%	0.0%	18.3%	—
64-10 s EB	0.0%	0.0%	0.0%	—	0.0%	0.0%	0.0%	—
JOS c EB	13.0%	4.4%	13.6%	—	46.7%	10.4%	20.7%	—
JOS s EB	0.0%	16.9%	0.0%	—	0.0%	30.9%	0.0%	—
J-116 c EB	28.1%	7.8%	22.5%	—	46.3%	8.7%	25.7%	—
J-116 s EB	0.0%	24.1%	0.0%	—	0.0%	44.7%	0.0%	—

Nº 3. Resume la infectividad del virus EB a 37°C y 33°C.

Las células 64-10 (leucemia mieloblástica) se usaron como control.

Los datos indican fenómenos de competencia entre la síntesis de IgG y la infección por virus. También se puede observar que la temperatura más baja aumenta la concentración de los virus.

I. F. Inmunofluorescencia indicativa de infección viral.

IgG. Porcentaje de inmunoglobulina G en las células infectadas.

cEB. Células infectadas con virus EB.

sEB. Células no infectadas.

### Células colombianas

Los hallazgos morfológicos fueron similares en ambos casos.

La microscopía de luz mostró el cuadro típico de linfoma de Burkitt.

Las células eran redondas, con núcleos ovoides y nucleolos prominentes. El citoplasma era moderadamente basófilo. En medio de las células tumorales se vieron numerosos histiocitos no neoplásicos. El conjunto presentó el llamado cuadro del cielo estrellado (Foto 6).

Al microscopio electrónico se encontró que el tumor estaba compuesto por células con núcleos redondos u ovales que presentaban nucleolos en número de 2 o 3 y con abundante eucromatina. Los citoplasmas mostraron mitocondrias alargadas o redondas, generalmente polarizadas en un extremo de la célula. El retículo endoplasmático era escaso o ausente y se vieron abundantes poliribosomas libres en el citoplasma celular. En este último se observaron también numerosas vacuolas así como vesículas y túbulos característicos de aparatos de Golgi.

No se encontró retículo endoplasmático liso. (Fotos 7, 8, 9). Estas células se clasificaron como del tipo linforeticular indiferenciado. En los dos casos se encontraron virus de forma cúbica. Algunos con sus capsides vacías, otros con nucleoides densos impregnados con uranilo lo cual comprobó su composición por

DNA. Estos virus midieron en promedio 120 milimicras.

Se estudió el crecimiento de estos virus en cultivos celulares. Los del caso N° 1 se descartaron por contaminación bacteriana. Los del caso N° 2 crecieron satisfactoriamente y fueron mantenidos vivos durante 95 días. A 37°C se vio síntesis intranuclear de los virus y maduración posterior de los mismos en el citoplasma celular. Allí se rodearon de membranas sintetizadas por la célula, para ser posteriormente transportados en el interior de vesículas hasta los bordes citoplasmáticos para su posterior eliminación en el espacio exterior. Todo este proceso se presentó entre los días 6 y 10 del cultivo (Fotos 10, 11, 12).

A 33°C las células reaccionaron en forma similar a sus homólogas africanas. A partir del día 12 se notó aumento en el número de partículas virales intracelulares. Este se correlacionó con severos fenómenos degenerativos indicativos de muerte celular. Tanto los núcleos como los citoplasmas se volvieron casi transparentes notándose en los últimos degeneración mitocondrial, ausencia de ribosomas y numerosas vesículas. Otras células mostraron disolución de las membranas nucleares y extravasación de material nuclear al citoplasma. En la membrana celular se vieron digitaciones prominentes características de fenómenos citopáticos (Fotos 13, 14, 15).

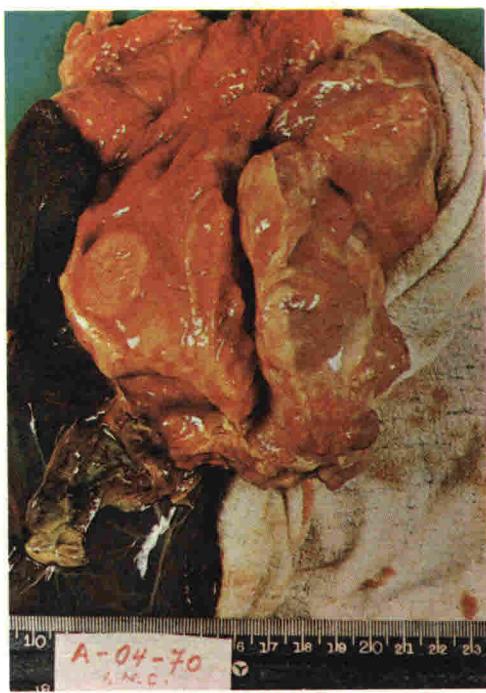


Fig. 1 — Caso Colombiano N° 1. Se puede observar la cara inferior del hígado sobre la parte izquierda. El duodeno está abierto y presenta un nódulo tumoral. A la derecha de este se ve el coléodo dilatado. El corte corresponde al tumor que infiltra la mayor parte del páncreas.

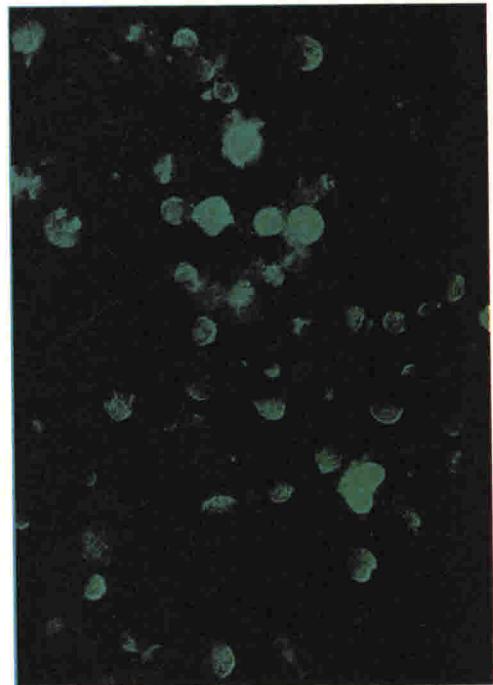


Fig. 2 — Células cultivadas del tumor estudiadas por la técnica de anticuerpos fluorescentes específicos para el antígeno de Henle (indicativo de la síntesis de virus EB.). La fluorescencia es difusa y ocasionalmente puntiforme. Los bordes celulares son nítidos. Se pueden ver bandas brillantes en células parcialmente fluorescentes. Día 8 del cultivo a 33°C de las células africanas. x 400.

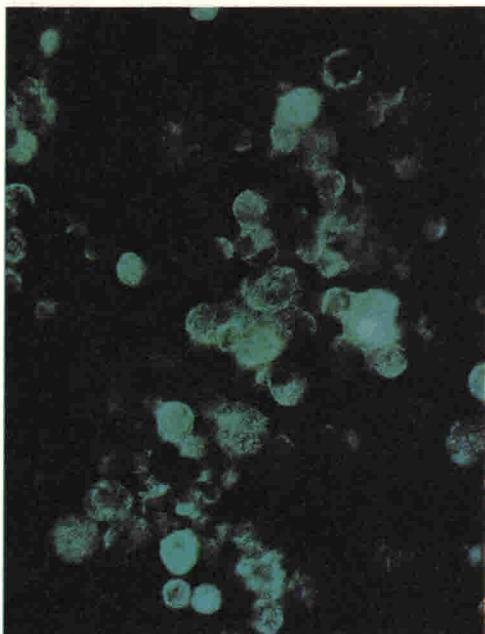


Fig. 3 — Día 8 del cultivo a 33°C de las células africanas.  $\times 400$ .

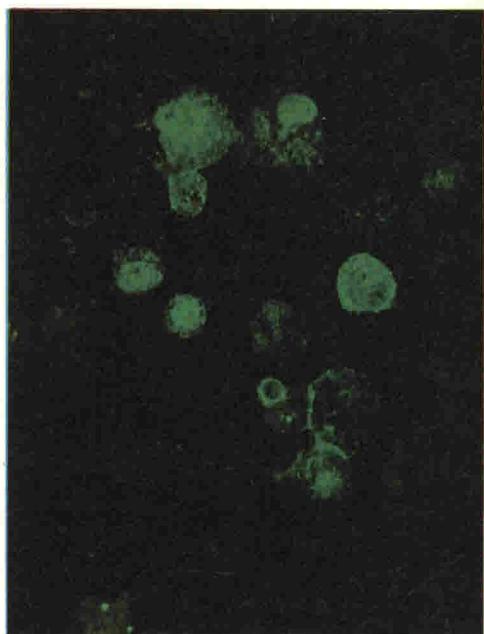


Fig. 4 — La fluorescencia es difusa. Llama la atención que las células tienen bordes borrosos y en algunas áreas son casi transparentes, presentando avanzado estado citopático. Día 14 del cultivo a 33°C de las células africanas.  $\times 400$ .

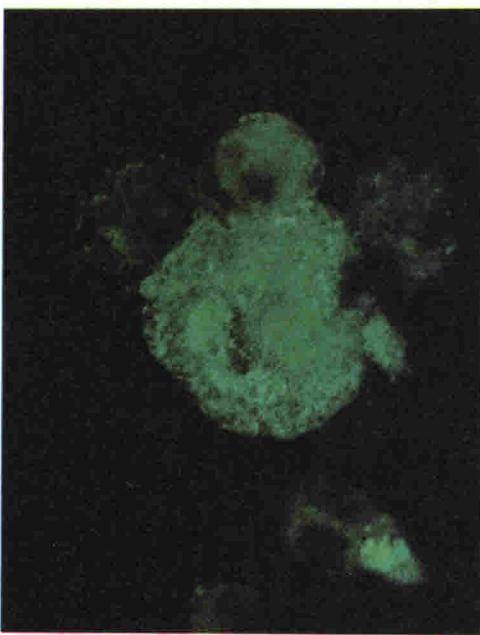


Fig. 5 — Se ve una de las células de la fase anterior con un mayor aumento. Nótese los bordes borrosos tanto del citoplasma como del núcleo. Día 14 del cultivo a 33°C de las células africanas.  $\times 1000$ .

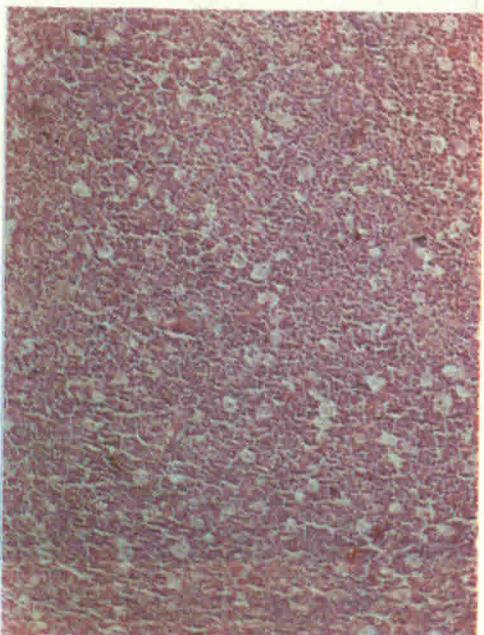


Fig. 6 — Fotografía a un bajo aumento del corte de la biopsia del caso N° 2. El aspecto morfológico del caso N° 1 es similar a este. El cuadro es muy monomórfico. Las células tumorales presentan núcleos redondos. Entre ellas se ven abundantes histiocitos no neoplásicos. Este aspecto corresponde al llamado cielo estrellado que se ve en esta enfermedad aunque no es patognomónico de ella.



Foto 7

Fotografia al microscopio electrónico de la biopsia del caso colombiano N° 1. Se observa una buena relación nucleo-citoplasmática. Los núcleos son ovales y compuestos por eucromatina. Nótense 3 nucleolos en una célula. En el citoplasma no se observa reticulo-endoplasmático. Las zonas de síntesis proteica están representadas por numerosos poliribosomas libres. Nótense mitocondrias localizadas sobre uno de los polos de la célula. También se ven las vesículas. x 4700. N: núcleo. C: citoplasma. M: mitocondrias

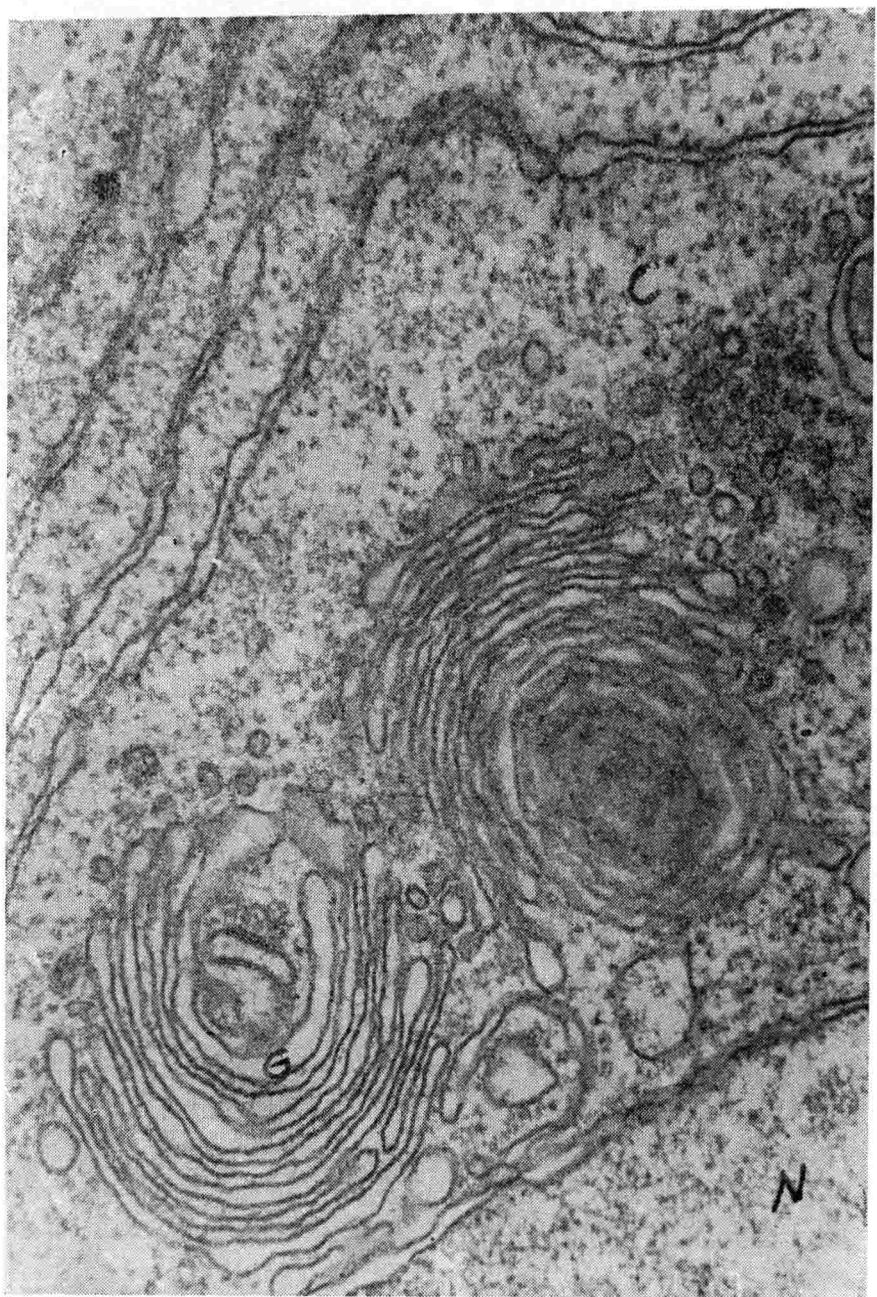


Foto 8

Corresponde a las mismas células de la fotografía anterior. En la parte central se ven los túbulos y vesículas característicos del sistema de Golgi. En la parte superior se ven membranas citoplasmáticas libres de ribosomas. x 2100. C: Sistema de Golgi.

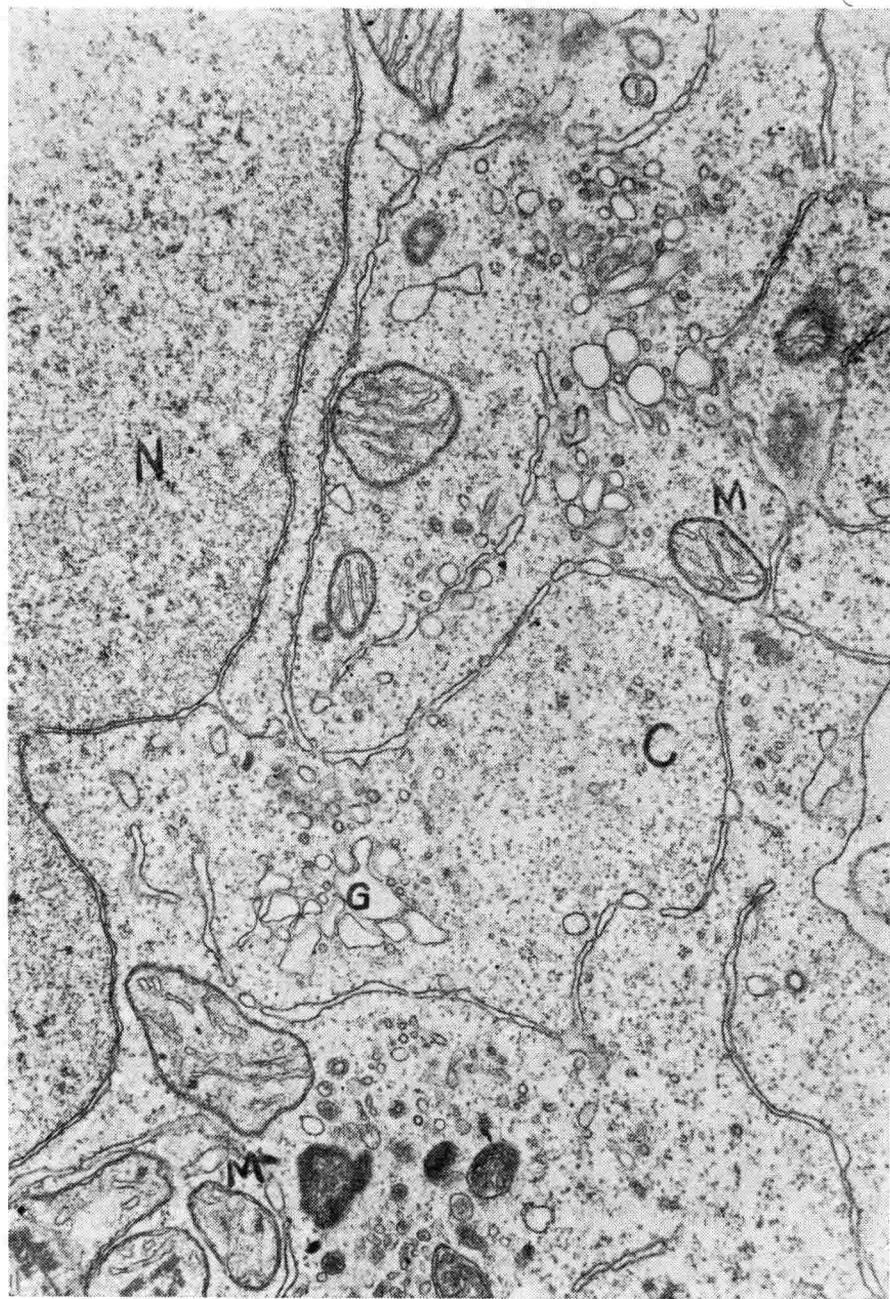


Foto 9

Corresponde a las mismas células de las fotografías anteriores. A la izquierda se ve el núcleo con sus membranas bien definidas, las cuales presentan ocasionales proyecciones hacia el citoplasma. Se ven diversos sistemas de Golgi y mitocondrias. Los poliribosomas son abundantes. x 9500. C: Sistema de Golgi. M: mitocondrias. N: núcleo. C: citoplasma.

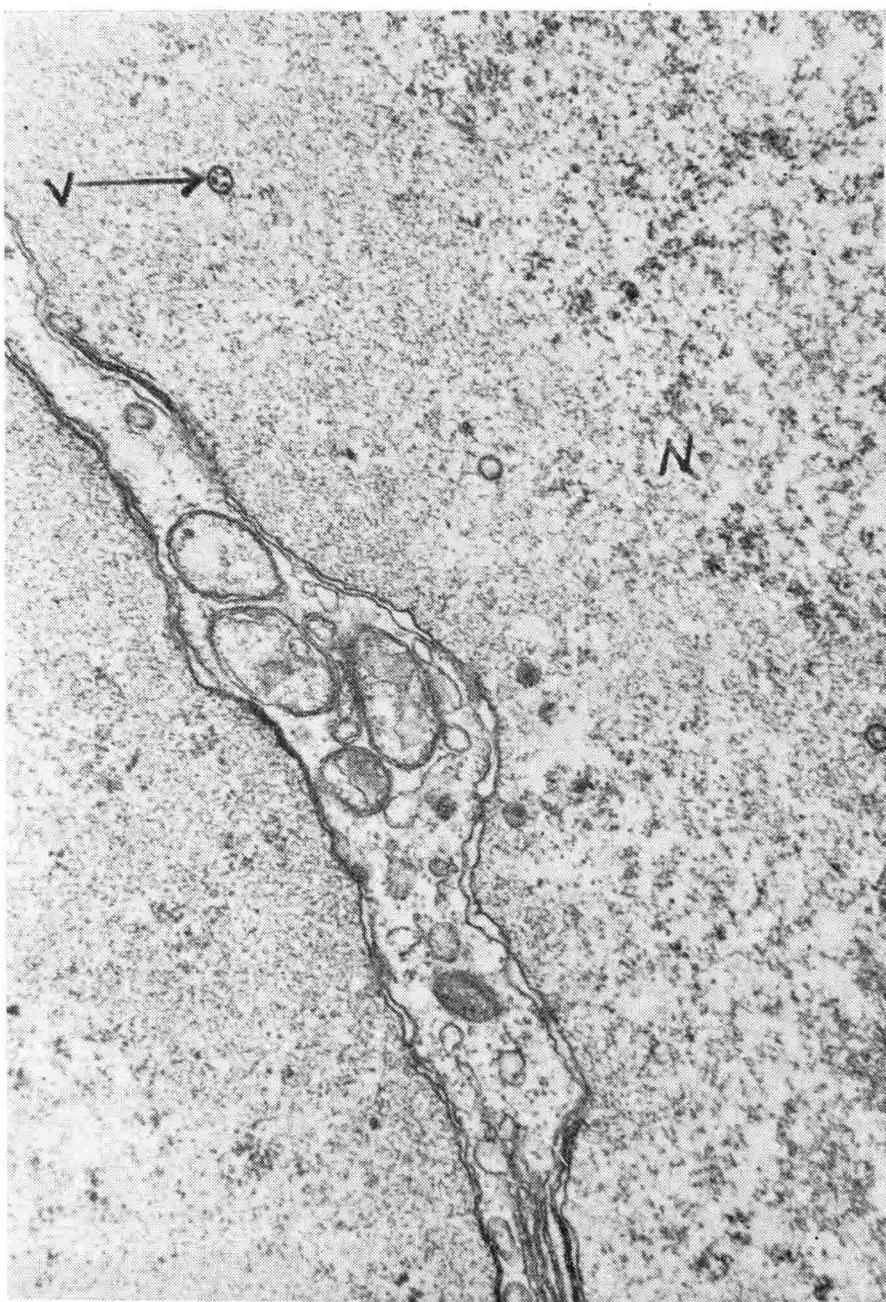


Foto 10

Corresponde al caso colombiano N° 2. a 37° C. En el nucleolo se notan diversas partículas virales de forma cúbica. Algunas de ellas empiezan a formar nucleoides centrales (DNA). Otras presentan bordes todavía borrosos. x 10500. N: núcleo. V: virus.

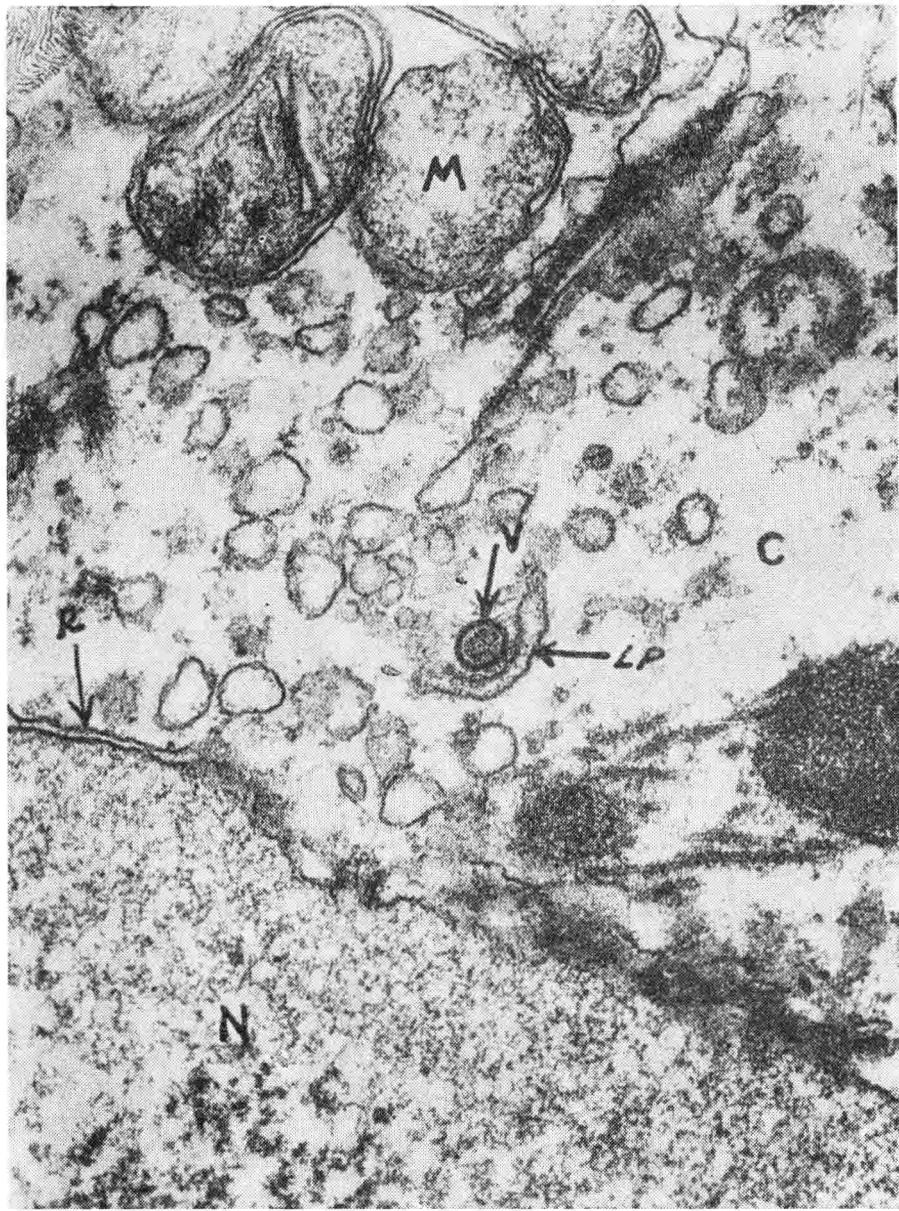


Foto 11

Caso colombiano N° 2. 37º C. Se ve en el citoplasma un virus en proceso de maduración. Tanto su capsida como el núcleo están totalmente formados. Alrededor de él hay membranas de origen celular que fácilmente llegarán a constituir la envoltura externa del virus. Estas membranas pueden corresponder a la envoltura externa de la membrana nuclear rota.  $\times 15000$ . N: núcleo. V: virus. LP: membrana tipoprotéica de origen celular. M: mitocondria en proceso degenerativo. R: ruptura (a la derecha).

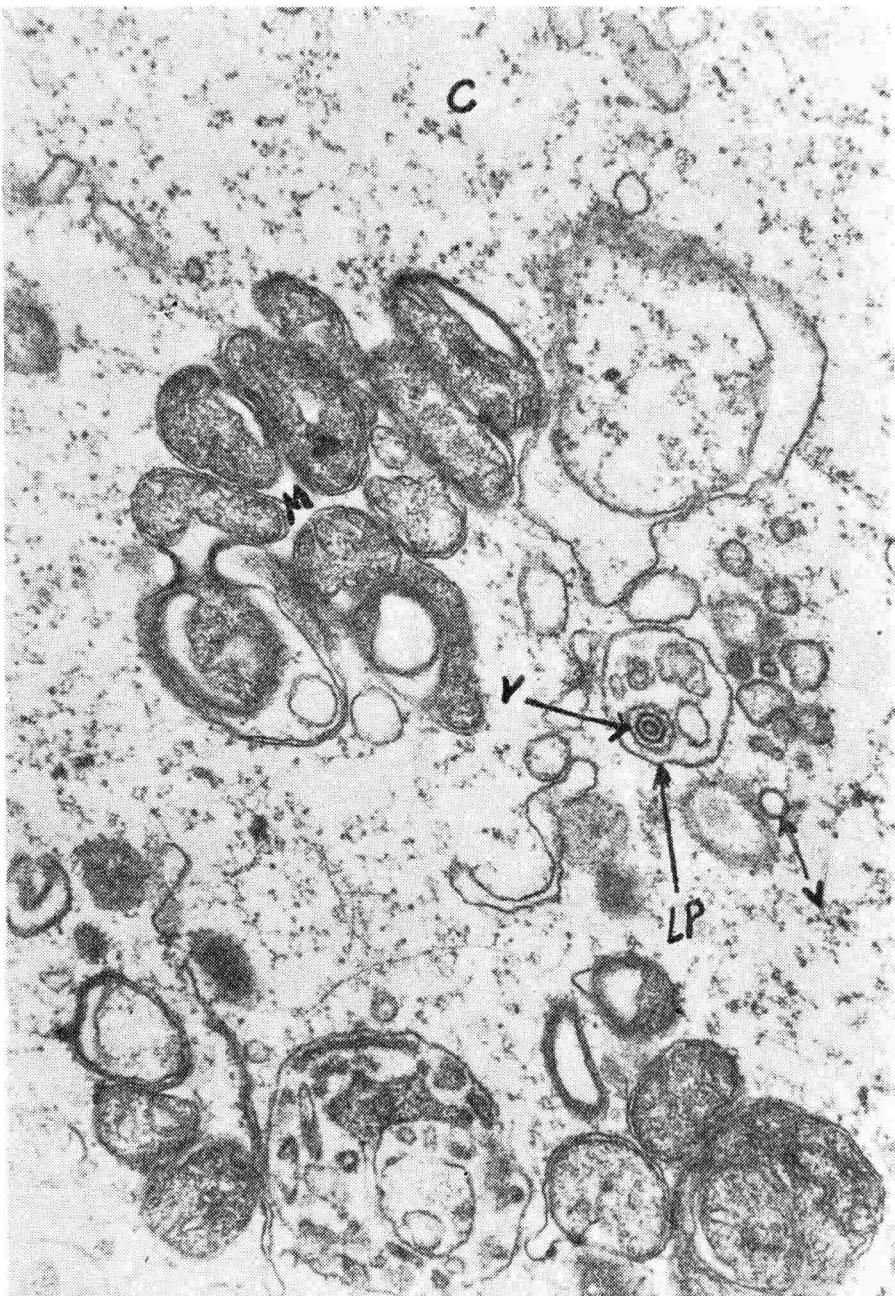


Foto 12

Caso colombiano N° 2. 37° C. Se nota un virus ya maduro, rodeado por membrana y en el interior de una nueva vesícula. Los virus son transportados en esta forma hasta los límites externos de la célula. Se ve también un virus inmaduro, sin nucleoide.  
x 14000. C: citoplasma. V: virus. LP: envoltura lipoprotéica.

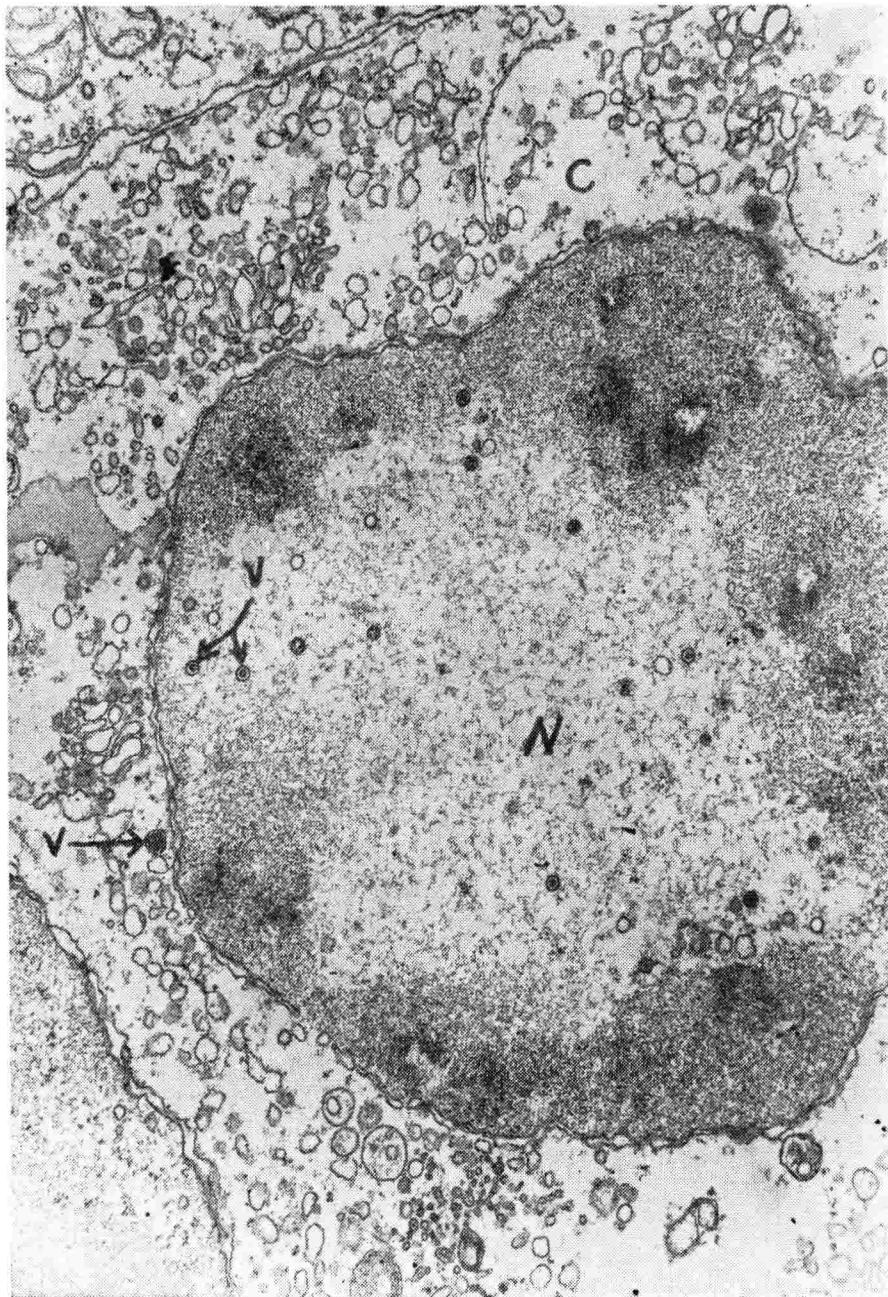


Foto 13

Caso colombiano N° 2. Cultivo a 33° C. Dia 12. La célula se muestra anormalmente transparente lo cual indica el efecto citopático inducido por los virus. Estos son muy numerosos en el núcleo. La mayoría tienen nucleoproteínas ya formadas. La cromatina se observa todavía hacia los bordes del núcleo pero la parte central de este es más clara y parece corresponder al llamado viroplasma. El citoplasma presenta organelos degenerados y se ve un virus maduro. x 9000. N: núcleo. C: citoplasma. V: virus.

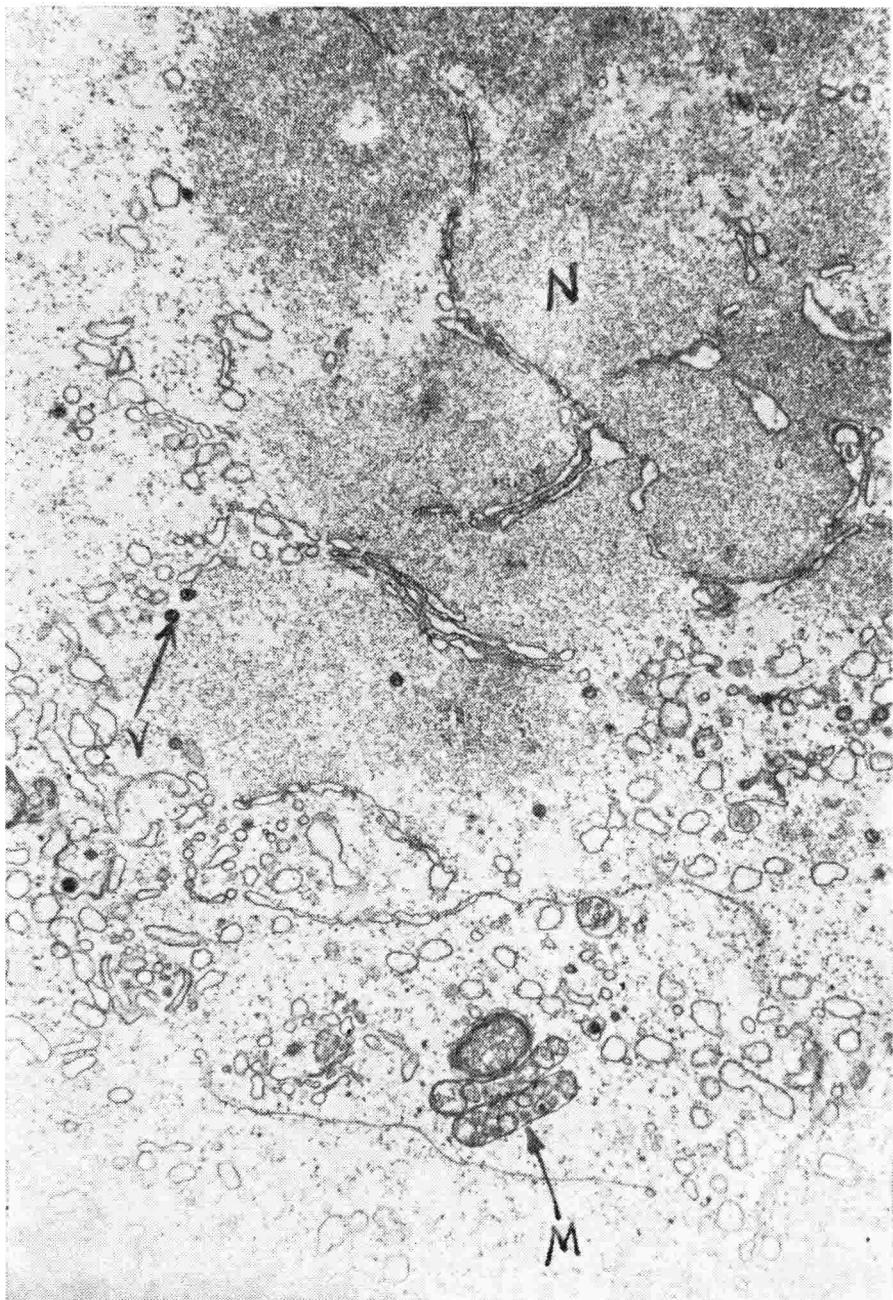


Foto 14

Corresponde a las mismas células de la fotografía 13. Nótese cómo ha desaparecido la membrana nuclear. Se ven abundantes virus y mitocondrias muy densas con destrucción de las vrostas.  $\times 10000$ . V: virus. N: núcleo. M: mitocondrias.

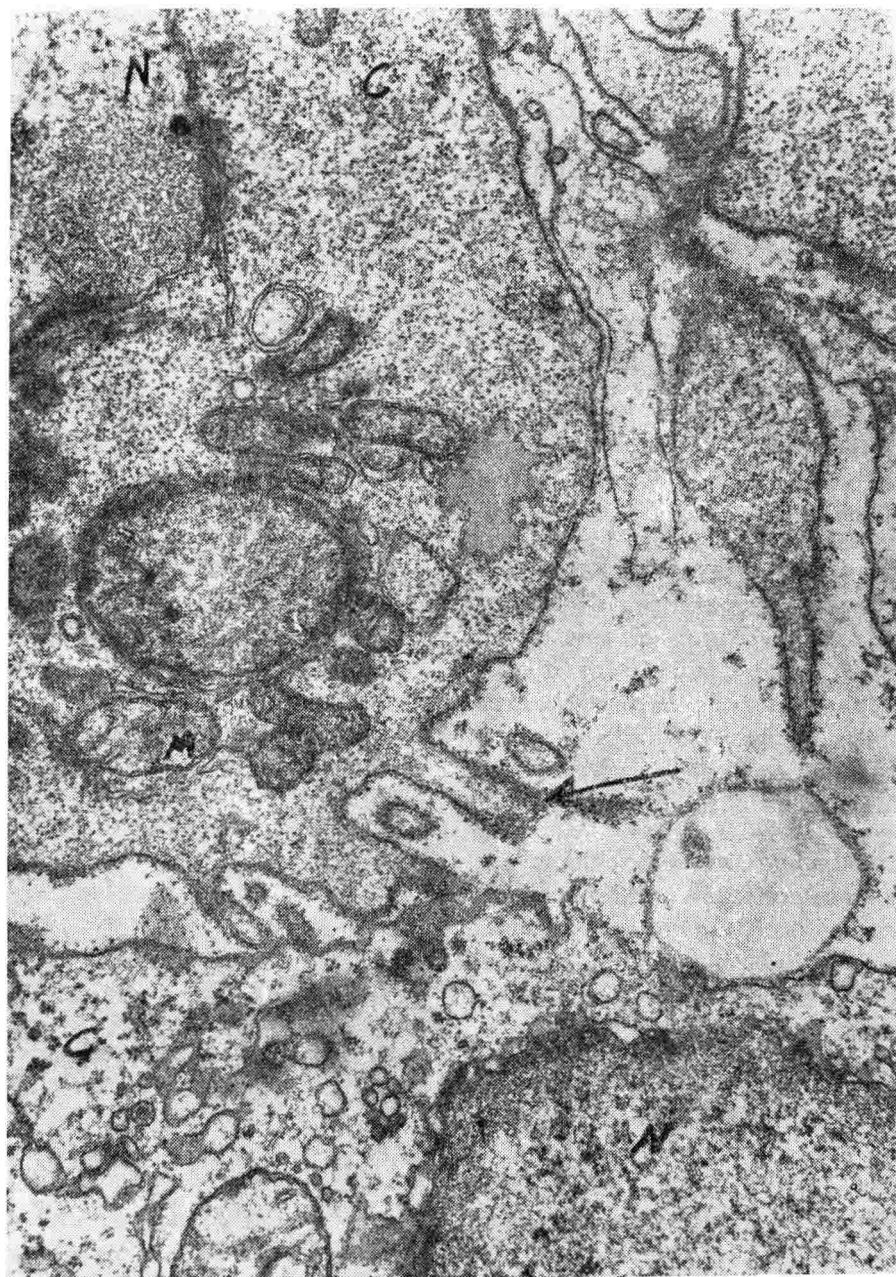


Foto 15

Corresponde a las mismas células de las fotografías 13 y 14. La flecha focaliza la presencia de digitaciones en la membrana citoplasmática, las cuales son consecuencia de la necrosis celular. Las mitocondrias se muestran muy hinchadas.  $\times 6000$ . N: núcleo. C: citoplasma. M: mitocondrias.

## DISCUSION

El aumento de la síntesis de virus conseguido por Hinuma y sus colaboradores<sup>9</sup> en sus células HR1K, es de capital importancia ya que permite la obtención de mayores concentraciones de virus para experimentos de purificación. Es muy posible que a 33°C desaparezcan mecanismos inhibidores de la síntesis del DNA viral, los cuales todavía están presentes a 37°C que es la temperatura normal para todos los cultivos celulares.

En nuestros experimentos hemos confirmado los hallazgos de Hinuma tanto en las cepas celulares de origen africano como en las originadas de tejidos de pacientes colombianos. En ambas se obtiene un evidente aumento de la síntesis viral cuando la temperatura es de 33°C.

En lo referente a las células africanas, la selección de una línea celular libre de virus con la capacidad de sintetizar IgG, al cabo de más de 100 días de cultivo, plantea diversas hipótesis.

Se puede pensar que las células obtenidas al cabo de este tiempo han sufrido una transformación en su estructura genética. En la literatura se citan casos de mutantes virales sensibles a la temperatura.<sup>25</sup> No se puede sin embargo aceptar tal planteamiento para el presente caso ya que eso significa que una misma temperatura puede inducir tanto aumento como represión de la síntesis viral, fenómeno bastante ilógico.

Si se tiene en cuenta que normalmente solo del 0,5% al 10% de estas células tienen virus<sup>9</sup> y que el 90% de las células restantes son biológicamente activas, se podría concluir que el cambio de temperatura volvió a aquel 90% más receptivo a la infección por los virus que son formados continuamente en el número menor de células. Con base en esto, se puede concluir que lo que se ha obtenido al cabo de 106 días de cultivo, es la adaptación a nuevas condiciones ambientales de algunas de las células que desde un principio carecían de virus. La presencia de IgG en estas últimas parece corroborar esta hipótesis ya que nuestros experimentos comprueban fenómenos de competencia entre la síntesis de virus y la síntesis de IgG en la misma célula. Este podría ser un mecanismo de gran importancia en el control de multiplicación de este virus y posiblemente de la enfermedad.

La temperatura más baja podría inhibir mecanismos represores de la síntesis IgG y en esta forma volver a las células más susceptibles a la infección viral.

Otra posibilidad es que cultivos provenientes del mismo tumor tengan células con características biológicas diferentes. En una publicación muy reciente (1971), Fialkow y sus colaboradores<sup>26</sup> han observado cepas celulares de diversos tipos en varios tejidos cultivados del tumor de Burkitt. Sin embargo en la clona celular HR1K desarrollada por Hinu-

ma<sup>o</sup> se pudo demostrar desde un principio un solo tipo celular.

El problema de la histogénesis del linfoma de Burkitt ha sido muy debatido. Desde 1961 hasta el presente, la célula tumoral ha sido considerada como linfocito por O'Conor<sup>2</sup> y Wrigth,<sup>27</sup> linfoblasto por Dorfmann<sup>28</sup> y célula linforeticular indiferenciada por Berard O'Conor y Torloni.<sup>29</sup>

El examen ultraestructural de los tejidos tumorales provenientes de los pacientes colombianos revela que la célula tumoral es linforeticular indiferenciada. La presencia de euromatina en el núcleo indica la existencia de RNA mensajero en el mismo, característica propia de células con altos índices de síntesis proteica.<sup>30</sup> La basofilia citoplasmática observada al microscopio de luz corresponde a los abundantes poliribosomas vistos en el citoplasma al microscopio electrónico.

Esto se relaciona con una síntesis proteica acelerada. El hecho de que los poliribosomas se encuentren libres y de que no exista retículo endoplasmático rugoso confirma el grado de indiferenciación celular.

Las células muestran sistema de Golgi, vesículas y polarización mitocondrial, característicos tanto del tumor como del tipo celular mencionado.<sup>30</sup> Todo esto prueba que la ultraestructura del tumor en nuestro

medio es igual a la de los casos de otras latitudes.

Un hallazgo importante es el de virus EB en biopsias y cultivos celulares de los casos colombianos. Con base en su aspecto morfológico (forma poligonal y 120 milímicras) se puede concluir que se trata del mismo virus descrito por Epstein y Barr<sup>31, 32</sup> en el África y Nueva Guinea.

Las características de multiplicación, maduración e infección presentadas por este virus en nada difieren de los virus africanos. Esta podría ser una evidencia de tipo circunstancial para su correlación etiológica con el tumor.

Se debe también anotar que los dos casos en discusión provienen de áreas por encima de 1.800 metros de altitud, lo cual descartaría la posibilidad de un agente infeccioso transmitido por un vector. Sin embargo, la gran variedad de climas existentes entre nosotros y la facilidad con que se puede cambiar de uno a otro mantiene esta hipótesis latente.

Recientemente se ha estudiado la relación entre la distribución de la malaria endémica y la incidencia del linfoma de Burkitt. Según algunos autores,<sup>33</sup> la infección de malaria haría a las células más susceptibles a la infección viral. Este podría ser un nuevo tema de estudio en nuestro medio.

**RESUMEN**

1. Se confirman los hallazgos de otros autores sobre los efectos de diversas temperaturas de cultivo en la síntesis del virus de Epstein y Barr.
2. Se obtuvo una línea celular libre de virus de Epstein-Barr y la cual sintetizaba inmunoglobulinas de tipo G, ausentes en la cepa celular africana que las originó.
3. Se cree que con los experimentos realizados se consiguió adaptar a nuevas condiciones ambientales, a células del linfoma de Burkitt.
4. Se demuestra que existen fenómenos de competencia entre la síntesis de inmunoglobulinas G y la infección por el virus mencionado.
5. Se comprueba de manera definitiva la presencia de enfermedad entre nosotros, estudiándose por primera vez en nuestro medio a través del microscopio electrónico.
6. Se establece por primera vez en casos colombianos cultivos celulares del linfoma de Burkitt.
7. Se demuestra por primera vez entre nosotros que tanto las biopsias como los cultivos celulares de linfoma de Burkitt de pacientes colombianos presentan virus morfológicamente idénticos al virus de EB.
8. Se comprueba que, en los cultivos celulares, dichos virus presentan características biológicas similares a los virus EB africanos.

**SUMMARY**

The ultrastructural pattern of biopsies of two cases of Colombian Burkitt's lymphoma is studied. Epstein-Barr viruses were found in tissue cultures from one of these two cases and their morphology and biological behaviour are compared with tissue cultures derived from an african case

(JIYOYE cell line). Several experiments performed with the JIYOYE cell line, and based in the effect of different temperatures on the synthesis of EB virus by the cultured cells, resulted in the obtention of a cell line free of virus and with high titers of IgG.

**AGRADECIMIENTOS:**

El autor agradece a los Doctores José Agustín Casas y Efrain Bonilla,

el haber suministrado los tejidos de uno de los casos colombianos.

## REFERENCIAS

1. Burkitt, D. **Sarcoma Involving Jaws in African Children.** Brit. J. Surg. 46: 218 (1958).
2. O'Conor, G. T. **Malignant Lymphoma in African Children. II. A Pathological Entity.** Cancer. 14: 270, 1961.
3. Epstein, M. A., Achong, B. G., and Barr, Y. M.: **Virus particles in cultured lymphoblast from Burkitt's lymphoma.** Lancet. I: 702, 1964.
4. Epstein, M. A., and Achong, B. G.: **Virus in cultured lymphoblasts from a New Guinea Burkitt lymphoma.** Brit. Med. Journal. 2: 290, 1967.
5. Pulvertaft, R. J. V.: **Cytology of Burkitt's tumour (African lymphoma).** Lancet. I: 238, 1964.
6. Henle, G., and Henle, W.: **Immunofluorescence in cells derived from Burkitt's lymphoma.** J. Bacteriol. 96: 1248, 1966.
7. Klein, G., Clifford, P., Klein, E., Smith, R. T., Minowada, J., Kourilsky, F. M. and Burchenal, J. H.: **Membrane immunofluorescence reactions of Burkitt's lymphoma cells from biopsy specimens and tissue cultures.** J. Nat. Cancer Inst. 39: 1027, 1967.
8. Diehl, V., Henle, G., Henle, W. and Hohn, G.: **Demonstration of a Herpes Group Virus in peripheral leucocytes from patients with Infectious Mononucleosis.** Virol. 2: 663, 1968.
9. Hinuma, Y., Konn, M., Yamaguchi, J., Wudarski, D. J., Blakeslee, J. R., and Grace, J. T.: **Immunofluorescence and Herpes type virus particles in the P 3 HR - 1 Burkitt Lymphoma cell line.** J. Virology. 1: 1045, 1967.
10. Hinuma, Y., Konn, M., Yamaguchi, J. and Grace, J. T.: **Replication of Herpes type virus in a Burkitt Lymphoma cell line.** J. Virology. 1 (6): 1203, 1967.
11. Beltrán, G.: **Childhood Lymphoma in Colombia South America.** Cancer 19: 1124, 1966.
12. Beltrán, G., Báez, A., Correa, P.: **Burkitt's Lymphoma in Colombia.** Am. J. MED. 40: 211, 1966.
13. Fagundes, L. A., de Oliveira, R., Amaral, R.: **Child lymphosarcoma in the state of Rio Grande do Sul, Brasil.** Cancer. 22: 1283, 1968.
14. Eagle, H.: **Aminoacid metabolism in Mammalian cell cultures.** Science. 130: 432, 1959.
15. Merchant, D. J., Kahn, R. H., Murphy, W. H.: **Handbook of cell and Organ Culture.** Burgess publishing company. Pj. 28, 1965
16. Sabatini, D. D., Benseh, K. G., and Barnett, R. J.: **Preservation of ultrastructure and enzymatic Activity by aldehyde fixation.** J. Histochem. and Cytochem. 10: 652, 1962.
17. Freeman, A.: **Comunicación personal.** Roswell park Memorial Institute.
18. Palade, G. E.: **A study of fixation for electron microscopy.** J. Exp. Med. 95: 285, 1952.
19. Pease, D. C.: **Histological techniques for electron microscopy.** Academic Press. Pj. 84, 1964.
20. Mollenhauer, H. H.: **Plastic embedding mixtures for use in electron Microscopy.** Stain Technology. 39: 111, 1964.
21. Huxley, H. E., and Zubay, G.: **Preferential staining of nucleic acid containing structures for electron microscopy.** J. Biophysic and Biochem Cytol. 11: 273, 1961.
22. Reynolds, E. S.: **The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy.** J. Cell Biol. 17: 208, 1963.
23. Iwakata, S., Grace, J. T.: **Cultivation in vitro of myeloblasts from human leukemia.** N. Y. State. J. Med. V. 64: 2279, 1964.
24. Horosewicz, J.: **Comunicación personal** Ros. well Park Memorial Institute.
25. Yin, F. H., and Lockart, R. Z.: **Maturation defects in temperature sensitive mutants of Sindbis virus.** J. Virology. 2: 728, 1968.
26. Fialkow, P. J., Klein, G., Giblett E., Gothoni, B., and Clifford P.: **Foreign cell contamination in Burkitt tumours.** Lancet. 7705: 883, 1971.
27. Wright, D. H.: **Cytology and histochemistry of the Burkitt lymphoma.** Brit. J. Cancer, 17: 50, 1963
28. Dorfman, R. F.: **The fine structure of malignant lymphoma in a child from St. Louis, Missouri.** J. Nat. Cancer Inst. 38: 491, 1967.

29. Berard, C., O'Conor, G. T., Thomas, L. B., and Torloni, H.: **Histopathological definition of Burkitt's tumour.** Bulletin of the World Health Organization, 40: 601, 1969.
30. Fawcett, D. W.: **An Atlas of fine structure. The cell. Its organelles and inclusions.** E. B. Saunders Co. Pj. 8, 1966.
31. Mori, Y., Lennert, K.: **Electron microscopy Atlas of lymph node Cytology and Pathology.** Springer-Verlag. Pj. 33, 1969.
32. Burkitt, D. P.: **Etiology of Burkitt's lymphoma: An alternative hypothesis to a vectored virus.** J. Nat. Cancer Inst. 42: 19, 1969.