

CARACTERIZACION MORFOLOGICA DE UN TUMOR BRANQUIAL EN LA MERLUZA (*MERLUCCIUS GAYI GAYI*)

Pedro Gorgollón*, Aldo Alfaro** y Juan Kuznar** (1)

ABSTRACT. A papillomatous branchial tumor is microscopically studied in the Chilean hake, *Merluccius gayi gayi*, collected in Valparaíso bay. The general morphology of the described tumor is similar to the epidermal papillomas found in Atlantic and northern Pacific flatfish species. Optic and electron microscopy suggest that tumoral cells probably arise from epidermal or Malpighian-like cells; these cells gradually undifferentiate to tumoral cells in which some virus-like particles occur. The malignant or nonmalignant character of the lesion and a possible relationship between branchial tumors and environmental contamination are briefly discussed.

INTRODUCCION

La identificación y caracterización de tumores en especies marinas puede ser fundamental en la búsqueda de modelos adecuados para analizar los mecanismos básicos de formación de neoplasias en general. Los peces, pese a su importancia cada vez mayor como fuente de alimento para animales terrestres, representan uno de los grupos de vertebrados menos estudiados en tal sentido. Este hecho resulta sorprendente si se considera que muchos peces de consumo humano, presentan una alta incidencia de tumores fácilmente visibles (Wellings *et al.* 1965, McAllister 1979). Si las lesiones proliferativas tienen origen viral, se hace esencial ir acumulando información acerca del tipo de virus que las causa y sus posibles efectos en

* Laboratorio de Histología, Departamento de Anatomía, Escuela de Medicina.

** Laboratorio de Bioquímica, Escuela de Química y Farmacia, Facultad de Medicina, Universidad de Valparaíso, Casilla 130-V, Valparaíso.

(1) A quien se debe dirigir correspondencia.

animales, tanto marinos como terrestres. Por otro lado, la mayor frecuencia en la formación de tumores en una especie, puede asimismo, estar relacionada con un aumento en la concentración de carcinógenos ambientales. Esta particular sensibilidad de algunos peces ha permitido emplearlos para evaluar el grado de contaminación en aguas marinas (Stich *et al.* 1976). Chile, por la extensión de sus costas y dependencia alimentaria de los productos del mar, aparece como un país particularmente apropiado para un estudio sistemático que conduzca a la caracterización de sistemas tumorales en ambientes marinos. Este trabajo representa un primer intento para lograr dicho objetivo con muestras capturadas en la bahía de Valparaíso.

MATERIAL Y METODOS

Microscopía óptica

Trozos del tumor, fijados en Bouin-Hollande y Susa, se deshidrataron e incluyeron en parafina por métodos convencionales. Los cortes, de 5-6 μm , se tiñeron con hematoxilina-eosina, tricromo PAS (azul de alcian -PAS -hematoxilina -amarillo de metanilo), y con un método original para glóbulos rojos y fibras reticulares (Gorgollón and Ruiz 1981).

Microscopía electrónica

Trozos del tumor, de aproximadamente 2 mm^3 , fueron fijados durante una hora a 4°C en glutaraldehído al 1% en tampón cacodilato 60 mM, a pH 7.4. Posteriormente se lavaron en sacarosa 200 mM y se post-fijaron durante una hora a 4°C en solución de tetróxido de osmio al 1% en tampón cacodilato. Tras deshidratar en etanol y acetona, el material fue incluido en Epon y seccionado en un ultramicrotomo Reichert Om-U2. Los cortes finos se tiñeron con acetato de uranilo al 2% y con solución de Reynolds. Las preparaciones así obtenidas fueron observadas en un microscopio electrónico Zeiss EM-9.)

Algunas secciones semifinas de material incluido en epon y fijado solamente con glutaraldehído, se utilizaron también

para estudios de microscopía óptica, tiñéndose en este caso con azul de toluidina.

RESULTADOS

El tumor se ubica generalmente en la mucosa branquial, formando una masa más pálida que el resto de la branquia y de escasa consistencia, que puede alcanzar un centímetro de longitud (Fig. 15).

Histológicamente se trata de una masa celular epiteliode que forma lóbulos separados por delgados tabiques conectivo-vasculares (Fig. 1).

Al parecer se trataría de una proliferación derivada del epitelio faríngeo adyacente, ya que en algunas zonas de epitelio plano o cuboidal estratificado es posible observar como se organizan grupos de células hipertrofiadas. Estas son frecuentemente poligonales, acidófilas y con núcleo vesiculoso, o bien, uniformemente teñido, en donde a menudo destaca un nucléolo (Figs. 2, 4 y 8). El epitelio adyacente a estos focos celulares se observa normal o ligeramente alterado, con algo de infiltración linfóide o inflamatoria (Figs. 2 a 5). Las células tumorales parecen irse introduciendo bajo el epitelio, formando la masa lobulada del tumor, rodeándose con una cubierta o matriz algo basófila que permite reconocer con facilidad sus límites celulares. Con algunos métodos de tinción se advierte que parte de las células tumorales aparecen separadas en un retículo que parece estar formado por el resto de las células epiteliales no afectadas o, al menos, no completamente (Figs. 6-7). La presencia de estas células se hace evidente en los cortes semifinos de material incluido en epon, en los cuales es posible reconocer una especie de barrera epitelial formada por prolongaciones de las células en contacto con los tabiques conectivo-vasculares, y presuntas formas de transición entre células alteradas y normales (Fig. 8).

El aspecto reticular que adoptan los lobulillos tumorales, se debe principalmente a la desintegración por lisis de las células afectadas, constituyéndose como consecuencia una zonalización en áreas "corticales" y "medulares". Las áreas

corticales están representadas por el retículo epitelial remanente, que encierra cavidades dejadas por las células tumorales al lisarse, y la médula, por acúmulos de células tumorales en diversos estados de alteración nuclear o citoplasmática (Figs. 1, 9 y 10). Frecuentemente la zona central de los lóbulos se separa totalmente de la corteza y pierde el retículo epitelial de soporte, observándose repleta de células tumorales en diversos grados de desintegración; curiosamente, las masas tumorales así formadas quedan enmarcadas por una especie de membrana limitante constituida por las prolongaciones de las células del retículo epitelial (Figs. 1, 6, 10 y 11). En algunas regiones del tumor es posible hallar zonas de infiltración linfoide o linfo-mieloide más o menos localizadas, que muestran algunos signos de organización estructural (Figs. 5 y 12).

Las observaciones al microscopio electrónico, debido a su carácter preliminar, serán analizadas brevemente en la discusión.

DISCUSION

El tumor papilomatoso observado por nosotros, a pesar de presentarse en la mucosa branquial y en un pez con características diferentes a los peces planos comúnmente afectados, muestra células tumorales homologables a las células "X" descritas inicialmente en papilomas del lenguado (Brooks *et al.* 1969) y observadas posteriormente por varios autores en casos semejantes (McArn and Wellings 1971, Stich *et al.* 1976, Peters *et al.* 1978). No obstante lo descrito por algunos de los autores citados (Peters *et al.* 1978), no nos fue posible hallar fibroblastos o células conjuntivas comprometidas, por lo que deducimos que el tumor descrito por nosotros tiene un parénquima exclusivamente epitelial.

Es difícil precisar el origen de las células tumorales, sin embargo, a juzgar por la forma de las aún no completamente desdiferenciadas, pensamos que tales células tumorales derivan de células malpighianas o con aspecto epidermoide. Aparentemente, la microscopía electrónica confirma esta suposición, ya

que nuestras observaciones preliminares evidencian la presencia de microfilamentos intermedios en las células parcialmente desdiferenciadas (Fig. 13). Descartamos por lo tanto que se trate de células exógenas o parásitos unicelulares, tal como ha sido discutido por algunos autores (McArn and Wellings 1971).

No hemos observado signos de metástasis de este tumor en órganos internos, sin embargo, son evidentes los signos de invasividad "regional" ya que en otras zonas de la misma branquia, o de la opuesta, hemos detectado tumores secundarios. La información que tenemos hasta el momento no nos permite concluir si el tumor es benigno o maligno, pues los criterios anátomo-patológicos para delimitar tales propiedades son variables y a menudo poco confiables. Así, si aparte de la ausencia de metástasis consideramos que las mitosis son muy infrecuentes y generalmente no se observan en las células "X" de tumores semejantes (Kranz *et al.* 1980), y el tumor parece infiltrar lentamente en medio de células epiteliales aún no afectadas, deberíamos deducir que se trata de un tumor benigno; sin embargo, las características de desdiferenciación de las células "X" hacen pensar en una neoplasia o al menos en una lesión potencialmente neoplásica. En todo caso, mayores antecedentes respecto a la evolución del tumor podrían contribuir a aclarar este punto.

Diferentes tipos de tumores en peces, tanto marinos como de agua dulce, parecen ser producto de infecciones virales (McAllister 1979). Nuestras observaciones preliminares al microscopio electrónico, tal como las efectuadas por otros autores en tumores homologables (Wellings and Chuinard 1964, Wellings *et al.* 1965, Stich *et al.* 1976), sugieren la presencia de estructuras semejantes a partículas virales, en las cuales es posible detectar un nucleoide y dos envolturas membranosas (Fig. 14). La posible relación entre dichas partículas y la etiología tumoral queda por establecerse tras un estudio más completo al microscopio electrónico, complementado con el aislamiento del supuesto agente infeccioso y transmisión de la enfermedad. Además, considerando que las branquias por su ubicación anatómica son un sitio muy susceptible a modificaciones del medio ambiente (Eller 1975, Scott and Rogers 1980), pensamos que es importante efectuar un análisis de la frecuencia con que se encuentra el tumor en diferentes

poblaciones de merluzas. Un estudio de esta naturaleza permitiría establecer pautas generales respecto a la población afectada y presuntos factores ambientales que pudieran relacionarse con la aparición del tumor.

RESUMEN

Se describe morfológicamente un tumor papilomatoso que afecta las branquias de merluzas, *Merluccius gayi gayi*, capturadas en la bahía de Valparaíso. El tumor es semejante a los papilomas epidérmicos descritos en peces planos de los océanos atlántico y pacífico norte. Un completo análisis al microscopio óptico y algunas observaciones al electrónico sugieren que las células tumorales derivan de células epidermoides o malpighianas que gradualmente se desdiferencian. Se discute brevemente el posible carácter benigno o maligno del tumor y además, la posibilidad que estudios posteriores puedan confirmar las evidencias preliminares sobre la existencia de partículas virales y su posible rol etiológico.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Brooks, R.E., G.E. McArn and S.R. Wellings. Ultrastructure observations on
1969 an unidentified cell type found in epidermal tumors of flounders.
J.Nat.Cancer Inst. 43: 97-109.
- Eller, L.L. Gill lesions in freshwater teleosts, pp. 305-330 in The
1975 pathology of fishes, M.E. Ribelin and G. Migaki, Eds. The University
of Wisconsin Press, Madison, Wisconsin.
- Gorgollón, P. and O. Ruiz. A method for staining reticulum and red cells
1981 in hematopoietic tissues of lower vertebrates. Stain Technology
56: 295-298.
- Krens, H., N. Peters and G. Bresching. On cell kinetics in skin tumors of
1980 the Pacific English sole, *Parophrys vetulus* Girard. J.Fish Dis.
3: 125-132.
- McAllister, P.E. Cap. 7, pp. 440-470 in Comprehensive virology. I. LP.
1979 Public.
- McArn, G.E. and S.E. Wellings. A comparison of skin tumors in three species
1971 of flounders. J.Fish Res.Board Can. 28: 1241-1251.
- Peters, N., G. Peters, H.F. Stich, A.B. Adton and G. Bresching. On diffe-
1978 rences in skin tumors of pacific and atlantic flatfish. J.Fish
Dis. 1: 3-26.
- Scott, A.L. and W.A. Rogers. Histological effects of prolonged sublethal
1980 hypoxia on channel catfish *Ictalurus punctatus*. J.Fish Dis. 3:
305-316.
- Stich, H.F., A.B. Acton and C.R. Forrester. Fish tumors and sublethal
1976 effects of pollutants. J.Fish Res.Board Can. 33: 1993-2001.
- Wellings, S.R., and R.G. Chuinard. Epidermal papillomas with viruslike
1964 particles in flathead sole *Hippoglossoides elassodon*. Science
176: 932-933.
- Wellings, S.R., R.G. Chuinard and M. Bens. A comparative study of skin
1965 neoplasms in four species of Pleuronectid fishes, pp. 479-501 in
Viral diseases of poikilothermic vertebrates, H.E. Whipple and
P.E. van Reyen Eds. Annals New York Academy of Sciences.

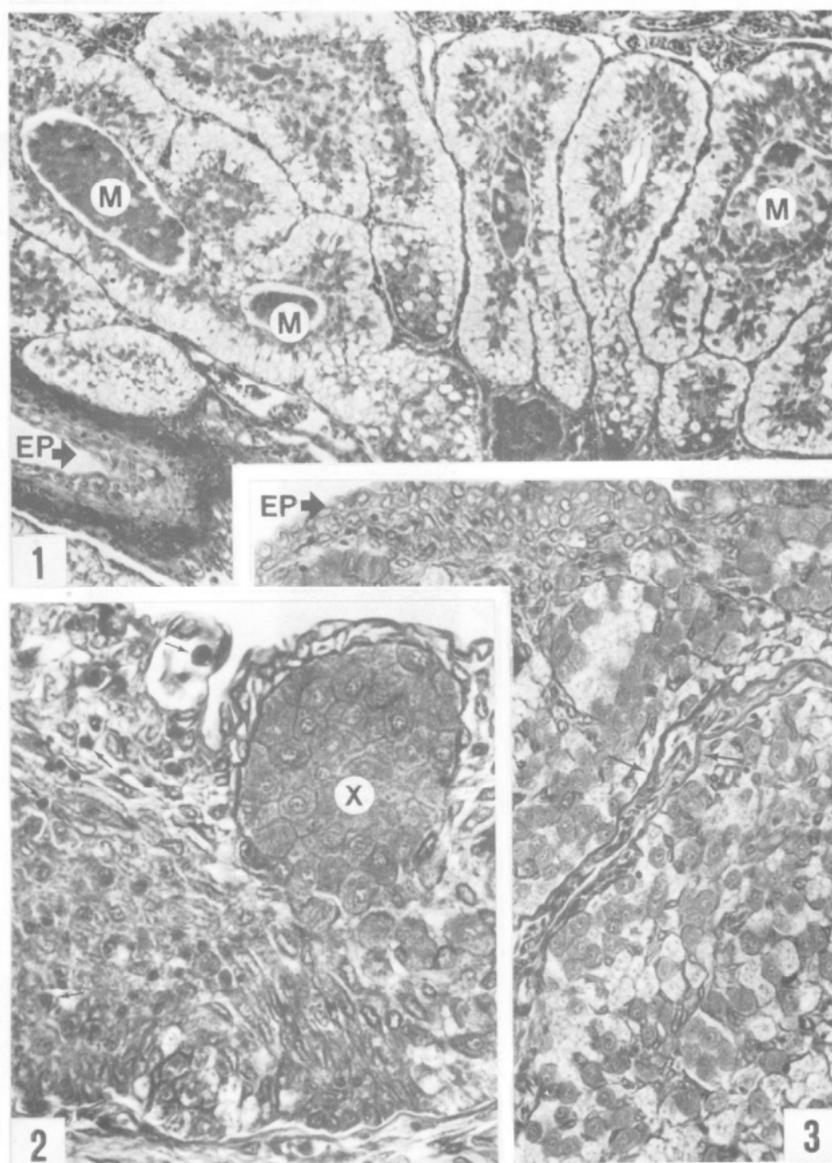
EXPLICACIONES DE LAS FIGURAS

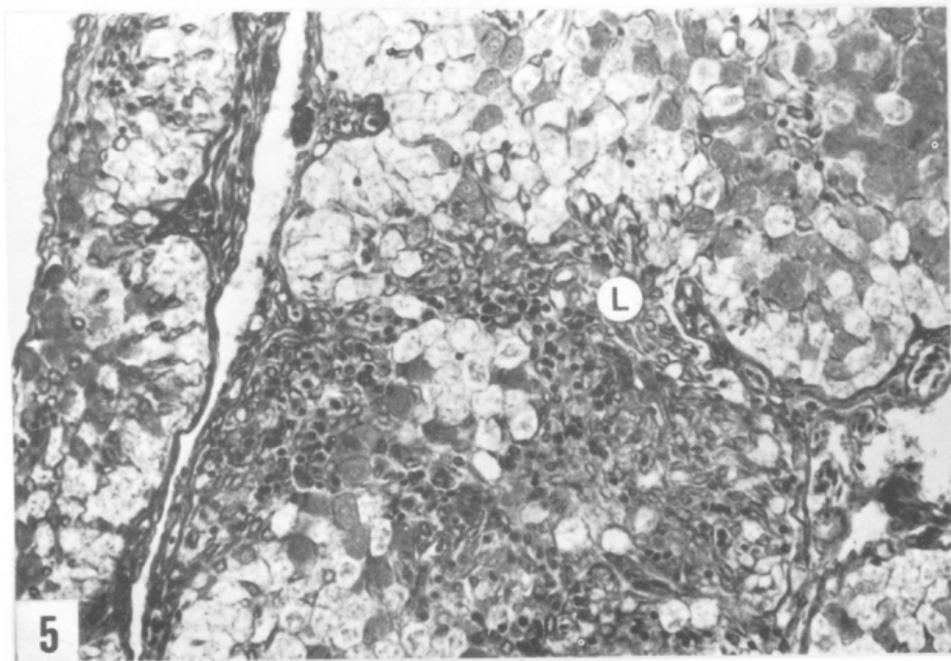
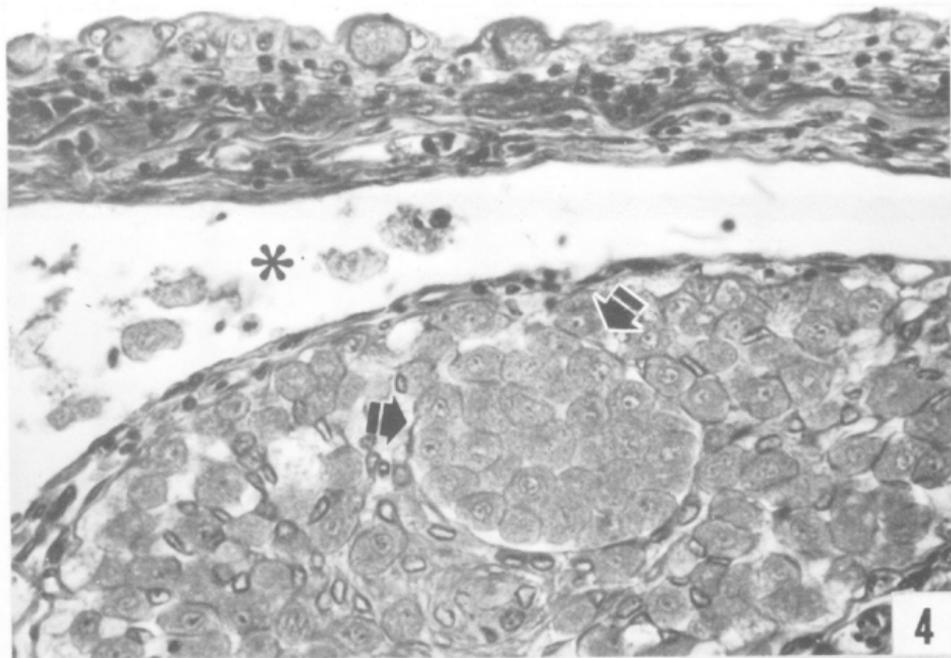
- Fig. 1. Aspecto microscópico general del tumor; se observa su lobulación y su conexión con el epitelio superficial (EP). También es evidente la zonalización de cada lobulillo en "corteza" y "médula", así como la separación de algunas áreas medulares en el centro de los lóbulos (M). × 120.
- Fig. 2. Grupo esferoidal de células tumorales (X) aparentemente emergiendo de la superficie epitelial. Las flechas pequeñas señalan células linfoides en el epitelio adyacente. × 450.
- Fig. 3. Visión parcial de dos lobulillos tumorales adyacentes al epitelio (EP), en los cuales se puede advertir células "X" en diversos grados de alteración, y un tabique conjuntivo vascularizado (flechas pequeñas). × 280.
- Fig. 4. Epitelio superficial con infiltración linfóide pero pocos signos de alteración (extremo superior), separado de un lobulillo tumoral adyacente por lo que parece ser un espacio linfático (asterisco). En el lobulillo se observa un grupo de células "X" aislándose del resto del tumor (flechas). El nucléolo es evidente en la mayor parte de las células tumorales. × 450.
- Fig. 5. Epitelio invadido por el tumor (izquierda) y masa tumoral subyacente. Nótese lo que parece ser una infiltración linfóide intratumoral en las zonas menos desdiferenciadas (L). × 280.
- Fig. 6. Región del tumor mostrando el estroma colágeno-reticular que delimita los lobulillos y el soporte retículo-epitelial que rodea las células tumorales o las cavidades dejadas por las mismas al lisarse (flechas). (La tinción utilizada destaca las fibras reticulares pero también parcialmente los tonofilamentos citoplasmáticos). × 280.
- Fig. 7. Visión semejante a la anterior, pero teñida con hematoxilina-eosina. Aunque con menos contraste, también es posible advertir el retículo epitelial "de soporte" (flechas). Los asteriscos señalan áreas de lisis (derecha) y de células "X" intactas (izquierda). × 450.
- Fig. 8. Composición basada en cortes semifinos de material incluido en EPON. Se advierten probables formas de transición (b-c) entre células epiteliales "de soporte" (a) y células "X" (d), un grupo de las cuales se observa en el recuadro superior derecho. Las flechas en ambas figuras mayores señalan la "barrera limitante" -formada por las prolongaciones de las células de soporte- que separa el parénquima tumoral de los tabiques conectivo vasculares. × 1.120.
- Fig. 9. Lobulación tumoral con áreas corticales (c) y medulares (a, d, e). La región interna (e) se está separando del resto, y la zona intermedia así constituida parece continuarse con el epitelio superficial (a, b). × 280.
- Fig. 10. Lobulillo aislado, conectado con el epitelio por un área reducida (flecha), mientras gran parte de su periferia se encuentra rodeada por conjuntivo intensamente vascularizado (asterisco). Lo mismo que en la fotografía anterior, se observan áreas corticales (c) y medulares interna (d) e intermedia (b), todas ellas aún comunicadas entre sí. × 280.

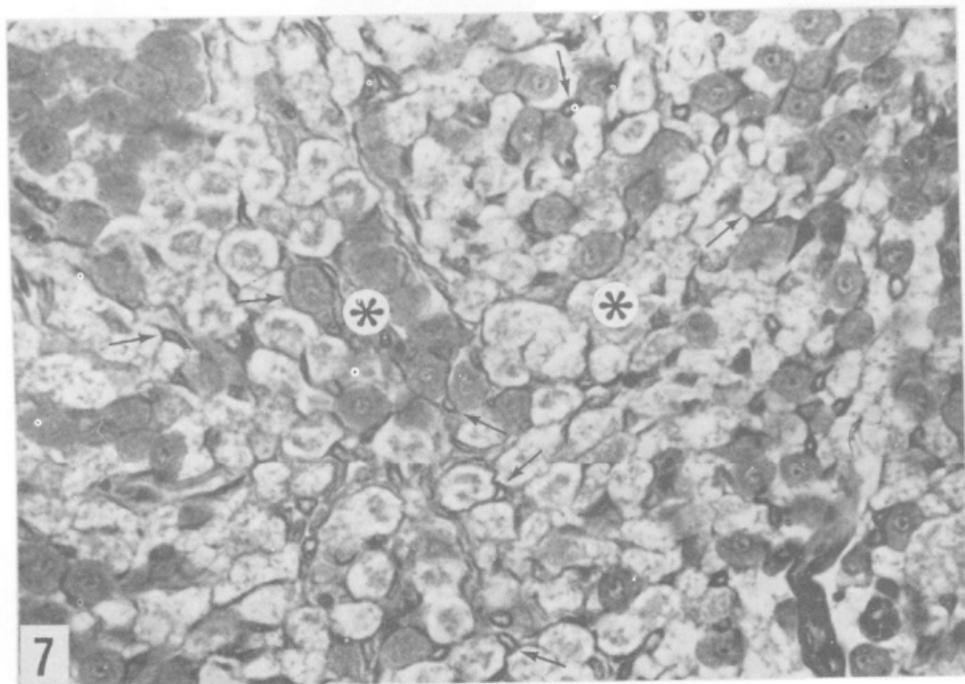
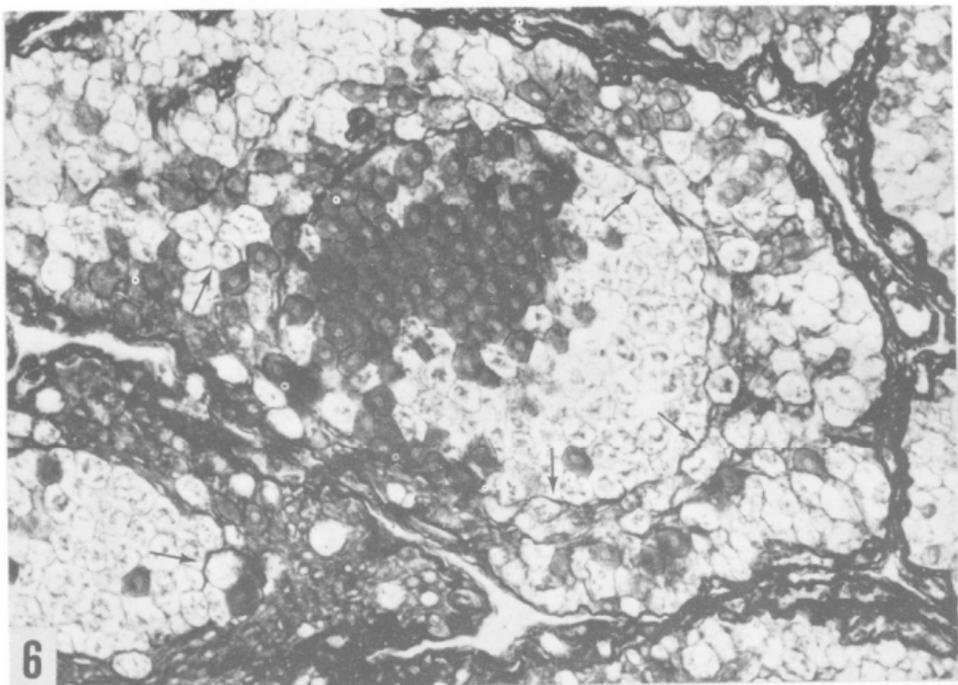
EXPLICACIONES DE LAS FIGURAS (Continuación).

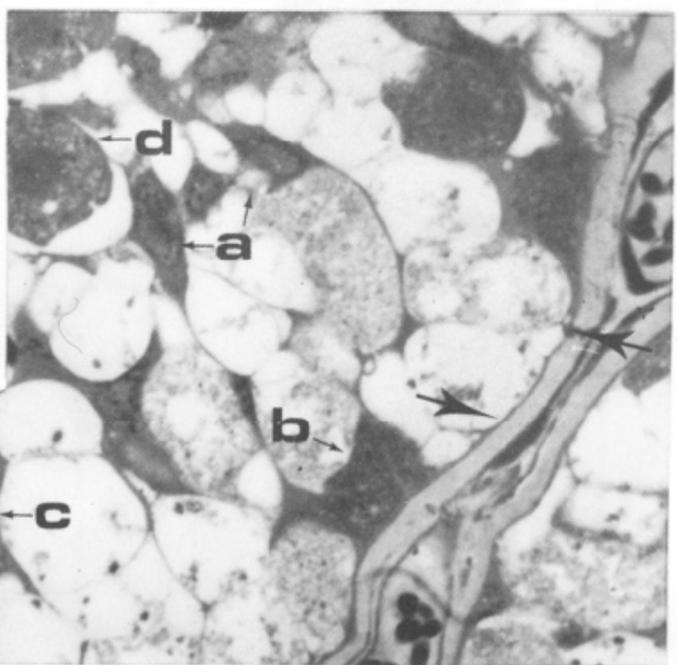
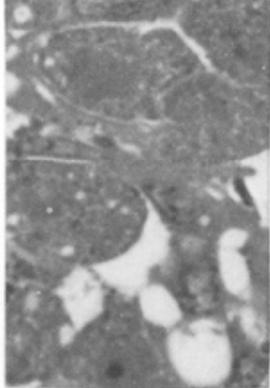
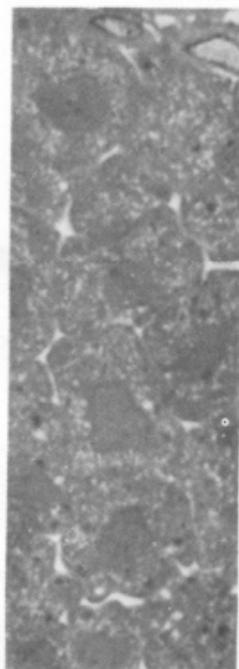
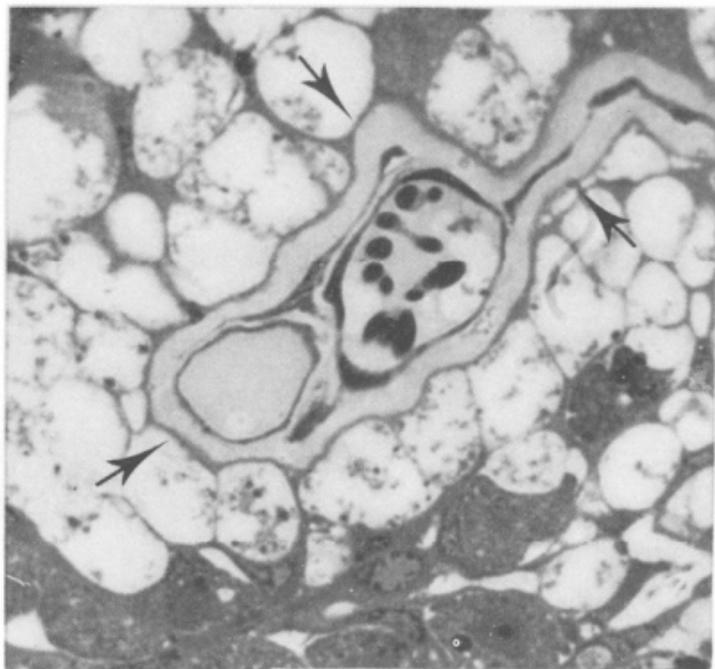
- Fig. 11. "Médula interna" de un lóbulo, separado totalmente del resto de la estructura por un borde perfectamente definido (pequeñas flechas). En el interior se advierten células tumorales en diversos grados de alteración, pero ya sin el soporte de las células epiteliales que han quedado limitadas a las zonas periféricas adyacentes. $\times 280$
- Fig. 12. Areas de infiltración linfo-mieloide organizada en las inmediaciones de la masa tumoral, mostrando cavidades vasculares sinusoidales y una gran cantidad de células libres en diversos estados de evolución. $\times 450$
- Fig. 13. Célula "de soporte" aún no desdiferenciada (N: núcleo), en cuyo citoplasma se advierten muchos microfilamentos intermedios que se muestran formando haces (flecha e inserto). Se observa también una célula tumoral desdiferenciada (asterisco) $\times 15.750$, inserto $\times 24.500$
- Fig. 14. Parte de una célula tumoral desdiferenciada provista de partículas semejantes a virus, en las cuales se destacan dos envolturas membranosas. $\times 35.000$

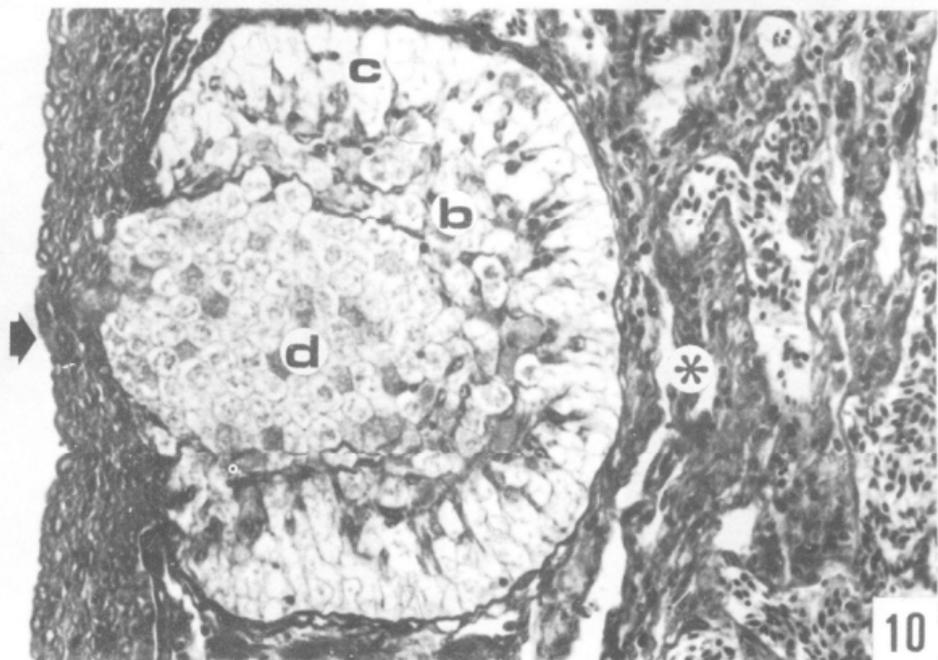
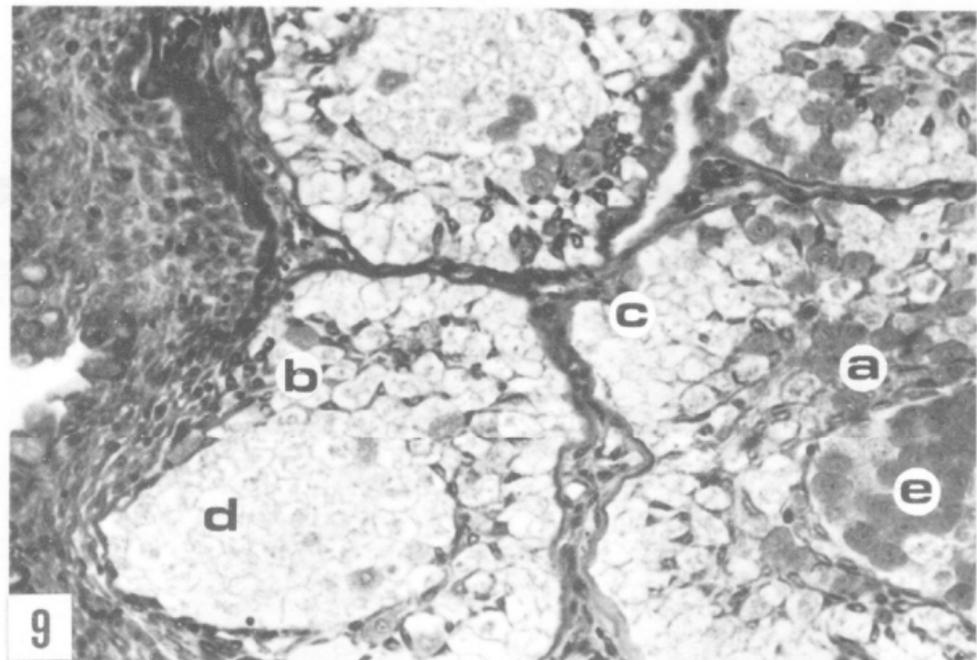
Fig. 15. Aspecto general de algunas masas tumorales vistas por ambas caras de la branquia afectada (A-B). La escala representa centímetros.

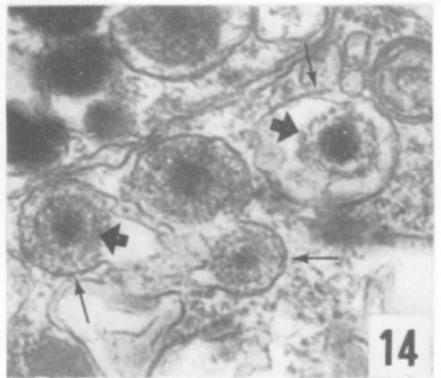
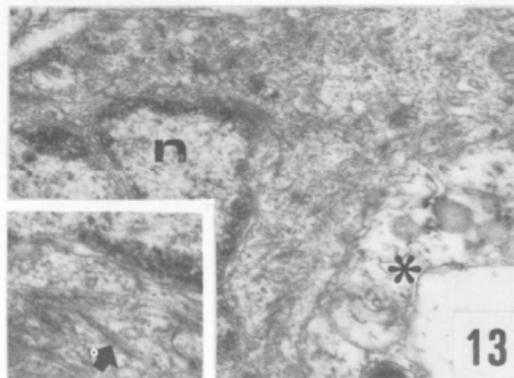
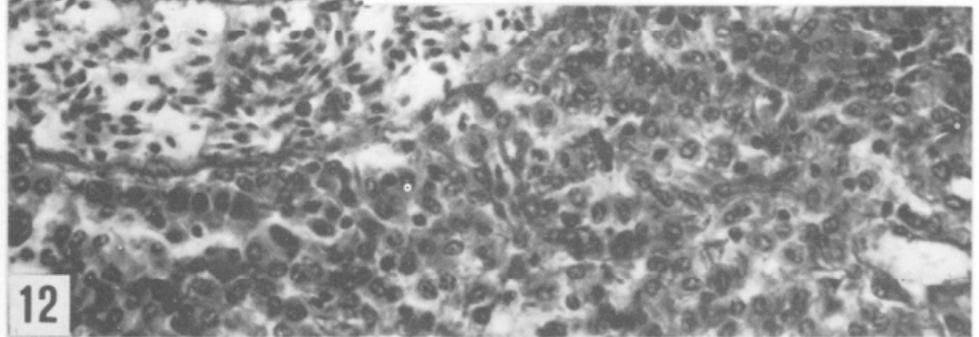
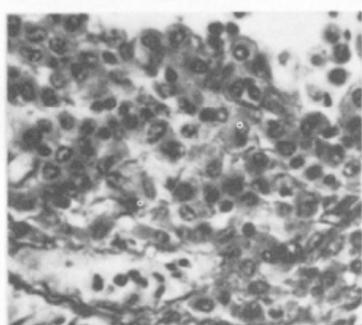
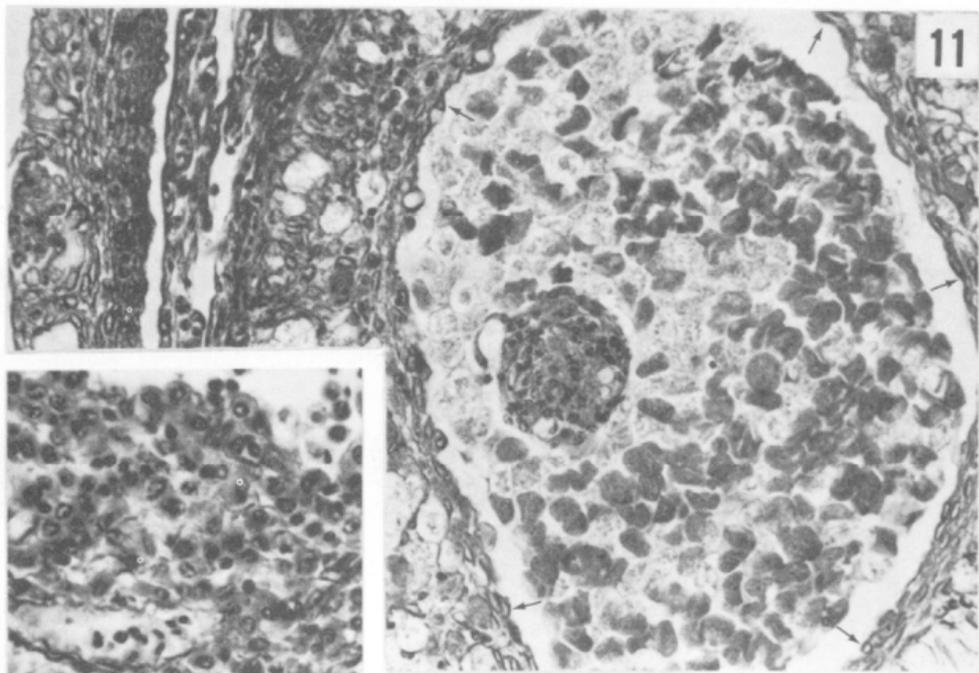


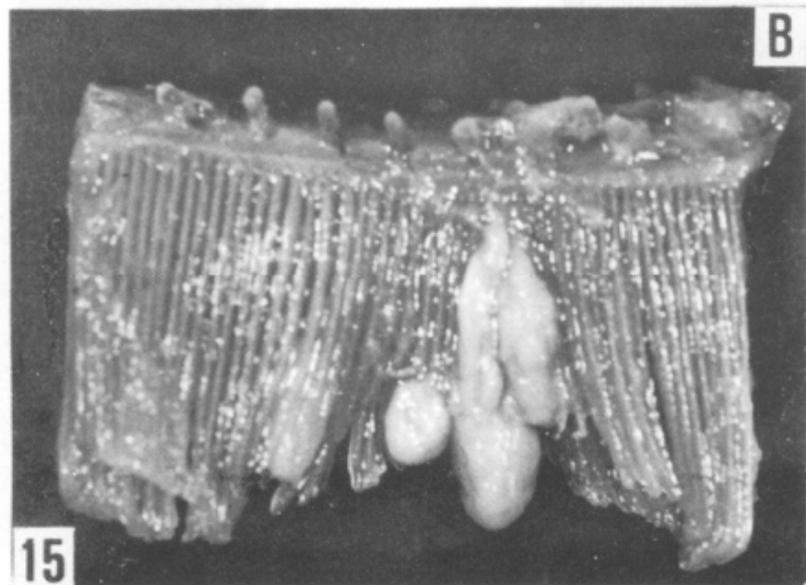
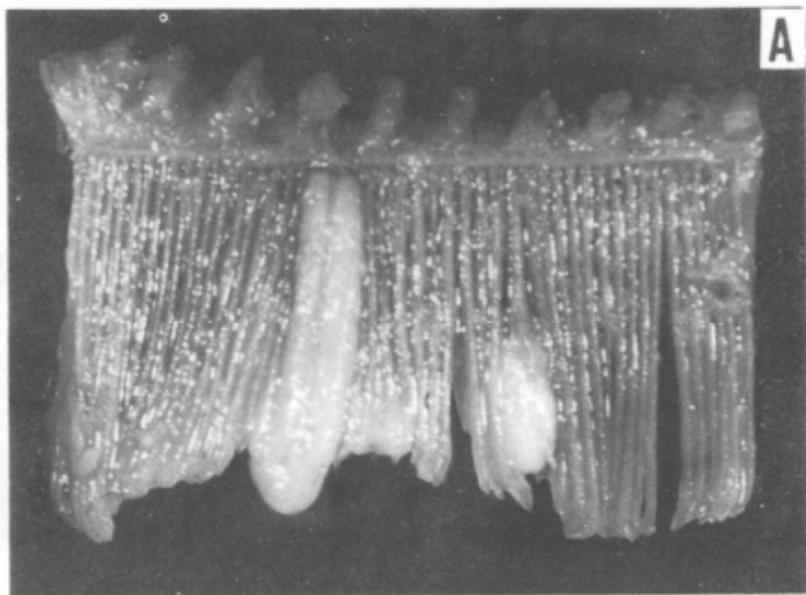












15