# TESIS DOCTORAL

## FACTORES DETERMINANTES Y MECANISMOS DE LIBERACION DE TPA EN LINEAS TUMORALES EXPERIMENTALES DE CANCER DE MAMA.

Juan de Dios López-González Garrido

PROF. DR. DON VICENTE PEDRAZA MURIEL, CATEDRATICO-DIRECTOR DE RADIOLOGIA Y MEDICINA FISICA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA.

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral que presenta al superior juicio del Tribunal que designe la Facultad de Medicina de Granada, D. Juan de Dios López-González Garrido, sobre el tema: "Factores determinantes y mecanismos de liberación de TPA en lineas tumorales experimentales de cancer de mama", ha sido realizada bajo mi dirección, siendo expresión de la capacidad técnica e interpretativa de su autor, en condiciones tan aventajadas que lo hacen acreedor al grado de Doctor en Medicina, siempre que asi lo considere el citado Tribunal.

Lo que certifico, en Granada a 4 de Junio de mil novecientos ochenta y siete.

Fdo: Vicente Pedraza Muriel.

PROF. DR. DON MARIANO RUIZ DE ALMODOVAR RIVERA, PROFESOR TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE RADIOLOGIA Y MEDICINA FISICA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA.

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral que presenta al superior juicio del Tribunal que designe la Facultad de Medicina de Granada, D. Juan de Dios López-Gonzalez Garrido, sobre el tema: "Factores determinantes y mecanismos de liberación de TPA en líneas tumorales experimentales de cáncer de mama", ha sido realizada bajo mi dirección, siendo expresión de la capacidad técnica e interpretativa de su autor, en condiciones tan aventajadas que lo hacen acreedor al grado de Doctor en Medicina, siempre que así lo considere el citado Tribunal.

Lo que certifico, en Granada a 4 de Junio de mil novecientos novecientos ochenta y siete.

Fdo: Mariano Ruiz de Almodovar.

FACULTAD DE MEDICINA

UNIVERSIDAD DE GRANADA

DEPARTAMENTO DE RADIOLOGIA Y MEDICINA FISICA

# FACTORES DETERMINANTES Y MECANISMOS DE LIBERACION DE TPA EN LINEAS TUMORALES EXPERIMENTALES DE CANCER DE MAMA.

Tesis que presenta el Licenciado Don Juan de Dios López-González Garrido, para aspirar al Grado de Doctor en Medicina y Cirugía de la Universidad de Granada.

Profesor Doctor Don Nicolás Olea Serrano,

Titular de Radiología y Medicina Física.

A mis padres
y hermanos.

Deseo expresar mi agradecimiento al Profesor Doctor Don Vicente Pedraza Muriel, Catedrático de Radiología y Medicina Física y al Profesor Doctor Don Mariano Ruiz de Almodovar Rivera, Titular del mismo Departamento por su acertada dirección y continuos consejos, así como por haber puesto a mi alcance los medios necesarios para la realización del presente trabajo.

Al Profesor Doctor Don Nicolás Olea Serrano, Titular de Radiología y Medicina Física, a quién debo una especial gratitud por haberme introducido en los principios básicos de las técnicas de laboratorio utilizadas en este trabajo.

A Juan Carlos Fernández Rodríguez, María del Rosario del Moral Avila, Mercedes Villalobos Torres, Juan Villalba Moreno y Concepción Martín Sánchez y demás compañeros del Laboratorio de Investigación del Departamento de Radiología y Medicina Física por su constante apoyo e inestimable cooperación.

Por último, al Profesor Doctor Don G. Leclercq, del Instituto Jules Bordet de Bruselas, por haber cedido a nuestro laboratorio, de forma desinteresada, el material biológico empleado en nuestras investigaciones.

# INDICE

1. INTRODUCCION ..... 13

1.1. TRANSFORMACION NEOPLASICA Y MARCADORES TUMORALES 13

1.2. CLASIFICACION DE LOS MARCADORES TUMORALES..... 16

1.2.1. Sustancias secretadas por el parénquina o estroma tumoral..... 16

1.2.2. Sustancias liberadas o hiperproducidas a causa de modificaciones o cambios orgánicos inducidos directa o indirectamente por la presencia del tumor..... 18

1.2.3. Anticuerpos monoclonales obtenidos frente a determinantes antigénicos específicos del cáncer..... 19

1.3. LOS MARCADORES TUMORALES EN ONCOLOGIA CLINICA... 20

1.4. EL ANTIGENO POLIPEPTIDICO TISULAR (TPA)..... 21

1.4.1. Propiedades físico-químicas del TPA..... 23

1.4.2. Naturaleza de los determinantes antigénicos de la molécula..... 24

1.4.3. Organo blanco..... 26

1.4.4. Metodología del ensayo..... 28

1.4.5. Significación clínica de las elevaciones de TPA..... 29

1.5. NIVELES DE TPA Y CANCER DE MAMA..... 31

1.6. MODELOS TUMORALES..... 38

1.6.1. Cultivos celulares..... 40

1.6.2. Línea celular MCF-7..... 42

1.6.3. Línea celular EVSA-T..... 43

1.6.4. Crecimiento de las Poblaciones Celulares 44

1.6.4.1. Algunos conceptos generales... 45

1.6.4.2. Cinética celular..... 51

1.6.4.3. Cinética celular de la línea MCF-7..... 56

1.6.4.4. Cinética celular de la línea EVSA-T..... 59

1.7. ASPECTOS MOLECULARES DEL CRECIMIENTO CELULAR.... 61

1.7.1. Estimulación autocrina y paracrina en el cáncer..... 67

1.8. IDEAS ACTUALES SOBRE LA ACCION ESTROGENICA..... 69

1.8.1. Síntesis y degradación del receptor..... 70

1.8.2. Efecto del crecimiento celular sobre los niveles de receptores de estrógenos..... 73

1.8.3. Respuesta celular a la acción estrogénica..... 74

1.8.3.1. Activación del Complejo Receptor - Estrógeno (RE)..... 74

1.8.3.2. Interacción del Complejo RE con el DNA..... 75

1.8.3.3. Efecto del Estradiol sobre la Síntesis del RNA..... 76

1.8.3.4. Efecto del Estradiol sobre la Síntesis de Proteínas Específicas..... 77

1.8.3.5. La localización intracelular del receptor..... 81

1.9. LA FORMA Y CITOESQUELETO DE LAS CELULAS DE CANCER DE MAMA HUMANO..... 83

1.9.1. Relación entre antígeno polipeptídico tisular y citoesqueleto..... 86

1.10. HIPOTESIS DEL TRABAJO..... 87

1.11. OBJETIVOS..... 87

II. MATERIAL Y METODOS ..... 92

2.1. INSTRUMENTACION..... 92

2.1.1. Estufa para Cultivos Celulares..... 92

2.1.2. Cámara de Flujo Laminar..... 93

2.1.3. Microscopio Invertido..... 93

2.1.4. Espectrofotómetro..... 93

2.1.5. Espectrometro de Centelleo Líquido..... 94

2.1.6. Cámara Frigorífica..... 97

2.1.7. Centrífuga..... 97

2.1.8. Centrífuga Refrigerada..... 97

2.1.9. Ultracentrífuga..... 98

2.1.10. Balanza de precisión..... 98

2.1.11. Congeladores..... 98

2.1.12. PH metro..... 99

2.1.13. Unidades de Filtración..... 99

2.2. REACTIVOS..... 100

2.2.1. Medios de Cultivo Celular..... 100

2.2.2. Mezcla de Centelleo..... 100

2.2.3. Precursores Marcados..... 101

2.2.4. Factores de Crecimiento..... 102

2.2.5. Enzimas..... 102

2.2.6. Hormonas..... 103

2.2.7. Quimioterápicos..... 106

2.3. MATERIAL..... 110

2.3.1. Filtros..... 110

2.3.2. Frascos y Discos de Cultivo..... 110

2.3.3. Pipetas..... 111

2.3.4. Otro material Fungible..... 111

2.4. CULTIVOS CELULARES..... 112

2.5. ESTIMACION DEL NUMERO DE ELEMENTOS CELULARES EN CULTIVO..... 112

2.5.1. Determinación del DNA..... 112

2.5.2. Cuantificación de proteínas..... 114

2.6. DEMOSTRACION DE LA PRESENCIA DE TPA EN EL MEDIO DE CULTIVO DE CELULAS MCF-7 Y EVSA-T..... 115

2.6.1. Radioinmunoensayo de Antígeno Polipeptídico Tisular..... 115

2.6.2. Procedimiento técnico..... 117

2.7. CINETICA DE LIBERACION DE ANTIGENO POLIPEPTIDICO TISULAR..... 122

2.8. INFLUENCIA DE DIVERSAS HORMONAS ESTEROIDEAS Y DE ANTIESTROGENOS SOBRE LA LIBERACION DE TPA..... 122

2.9. LIBERACION DE TPA POR CELULAS MCF-7 PARCIALMENTE SINCRONIZADAS..... 123

2.9.1. Liberación del TPA y fase del ciclo celular..... 124

2.10. EFECTO DEL EPIDERMAL GROWTH FACTOR (EGF) SOBRE CULTIVOS SINCRONICOS DE CELULAS MCF-7..... 125

2.10.1. Actividad mitógena del EGF..... 125

2.10.2. Efecto del EGF sobre la incorporación de Timidina tritiada ($^3$HTdR) al cultivo.... 126

2.10.3. Efecto del EGF en ausencia de FCS sobre el crecimiento celular y la liberación de antígeno TPA..... 128

2.11. DESTRUCCION CELULAR QUIMIOINDUCIDA Y LIBERACION DE TPA..... 129

2.12. CINETICA DE LA LIBERACION DE TPA EN CELULAS SINCRONIZADAS TRATADAS CC. CITOTOXICOS..... 130

III. RESULTADOS OBTENIDOS ..... 132

3.1. DEMOSTRACION DE LA PRESENCIA DE TPA EN EL MEDIO DE CULTIVO DE LINEAS CELULARES DE ESTIRPE EPITELIAL..... 132

3.2. CINETICA DE LIBERACION DE ANTIGENO POLIPEPTIDICO TISULAR (TPA)..... 135

3.3. INFLUENCIA HORMONAL SOBRE LA LIBERACION DE TPA.. 138

3.4. LIBERACION DE TPA POR CELULAS MCF-7 PARCIALMENTE SINCRONIZADAS..... 140

3.5. CINETICA DE LIBERACION DEL TPA EN CELULAS MCF-7 PARCIALMENTE SINCRONIZADAS..... 142

3.6. EFECTO DEL EPIDERMAL GROWTH FACTOR (EGF) SOBRE CULTIVOS "SINCRONIZADOS" DE CELULAS MCF-7..... 145

3.7. EFECTO DEL EGF SOBRE LA INCORPORACION DE TIMIDINA TRITIADA A LAS CELULAS DE LA POBLACION MCF-7. 148

3.8. ESTUDIO DE ACTIVIDAD DEL EGF SOBRE CELULAS MCF-7..... 148

3.9. DESTRUCCION CELULAR QUIMIOINDUCIDA Y LIBERACION DE TPA..... 159

3.10. CINETICA DE LA LIBERACION DE TPA AL MEDIO DE CULTIVO DE CELULAS MCF-7 TRATADAS CON CITOSTATICOS..... 164

**IV. DISCUSION** ..... 170

4.1 DEMOSTRACION DE LA PRESENCIA DE TPA EN EL MEDIO DE CULTIVO DE CELULAS MCF-7 Y EVSA-T..... 170

4.2 PROLIFERACION CELULAR Y CINETICA DE LA LIBERACION DEL ANTIGENO POLIPEPTIDICO TISULAR..... 179

4.3 LIBERACION DE TPA AL MEDIO DE CULTIVO. INFLUENCIA HORMONAL..... 189

4.4 PROLIFERACION CELULAR Y LIBERACION DE TPA TRAS SINCRONIZACION DEL CULTIVO..... 199

4.5 CINETICA DE LA LIBERACION DEL ANTIGENO POLIPEPTIDICO TISULAR AL MEDIO DE CULTIVO EN CONDICIO- DE EXPOSICION CELULAR A LA SECUENCIA OH-TAM / 17βE₂..... 209

4.6 EFECTO DEL EGF SOBRE CULTIVOS SINCRONICOS DE CELULAS MCF-7..... 212

4.7 EFECTO DEL EGF SOBRE LA INCORPORACION DE TIMIDINA TRITIADA A LAS CELULAS MCF-7 SINCRONIZADAS... 222

4.8 DOSIS - DEPENDENCIA DE LA ACTIVIDAD DEL EGF..... 225

4.9 DESTRUCCION CELULAR QUIMIOINDUCIDA Y LIBERACION DE TPA..... 241

4.10 CINETICA DE IA LIBERACION DE TPA AL MEDIO DE CULTIVO DE CELULAS MCF-7 SINCRONIZADAS TRATADAS CON CITOSTATICOS..... 257

V. CONCLUSIONES..... 271

VI. BIBLIOGRAFIA..... 278

# INTRODUCCION

# I. INTRODUCCION

## 1.1. TRANSFORMACION NEOPLASICA Y MARCADORES TUMORALES

La transformación neoplásica celular es un fenómeno caracterizado "in vivo" por tres periodos consecutivos de duración variable. El primero de ellos comienza cuando la interacción del carcinógeno con la célula conduce al desarrollo de una lesión precancerosa. El segundo período se inicia con el desarrollo de un clon neoplásico y continúa con la proliferación subclínica del tumor. Por último, el tumor emerge al plano clínico y se manifiesta por sus efectos locales y a distancia.

Las consecuencias bioquímicas de la transformación neoplásica celular han sido recientemente revisadas (501) y se sabe que:

1. Disminuye la síntesis de proteínas enzimáticas relacionadas con las funciones especializadas y diferenciadas de la célula.

2. Ocurre la simplificación antigénica del núcleo, citoplasma y membrana celular.

3. Se sintetizan determinados antígenos oncoasociados y oncoespecíficos. (Son antígenos

oncoasociados los que aparecen en el tumor pero no son exclusivos del mismo, pudiendo ser encontrados en grandes cantidades en los tejidos embrionarios y fetales y en cantidades mínimas en tejidos adultos. A diferencia de estos, los antígenos oncoespecíficos caracterizan con exclusividad a la célula tumoral).

4. Se alteran, respecto al tejido sano, las proporciones o el tipo de determinadas isoenzimas intracelulares.

5. Aparecen sustancias ectópicas, por ejemplo hormonas peptídicas, que pueden ser sintetizadas por el tejido neoplásico aun cuando el tejido a partir del que el tumor se origina carezca de esa capacidad.

6. Se modifica la síntesis de determinadas sustancias (incremento de hormonas esteroideas en tumores suprarrenales, testiculares y ováricos, de catecolaminas en tumores carcinoides y neuroectodérmicos y disminución de hormonas tiroideas en cáncer de tiroides, por ejemplo).

La idea de que la transformación tumoral debe asociarse a "algo distinto", cuya liberación al espacio extracelular primero e ingreso en el torrente circulatorio después, pueda constituir una señal "química" útil para la detección precoz de la transformación neoplásica, ha sido una constante en la investigación médica desde 1.923 (249). Hoy día, bajo la denominación de Marcador Tumoral se engloba un conjunto de sustancias cuya presencia en el plasma, por encima de determinados niveles, correlaciona estrechamente con la naturaleza, volumen y/o extensión de

cierto tipo de tumores. Ejemplos de esta asociación lo constituyen los binomios Antígeno Carcinoembrionario (CEA) / cáncer digestivo y alfa - fetoproteína ($\alpha$FP) / cáncer de hígado. Característica esencial de tales marcadores es su alta sensibilidad en la detección del tumor con el que se encuentran relacionados en un momento de su evolución en que por sus dimensiones, tamaño, situación, etc., el tumor puede pasar completamente desapercibido a los medios convencionales de diagnóstico. Los éxitos conseguidos en el tratamiento del cáncer dependen en gran medida del diagnóstico precoz de la enfermedad. La necesidad de disponer de métodos sencillos, eficaces y prácticos, para identificar precozmente los procesos de transformación y desarrollo neoplásicos ha conducido al empleo del término "Marcador Tumoral" como denominador común de aquellas sustancias que tratan de satisfacer esta necesidad y los requisitos que, total o parcialmente, debe reunir un Marcador Tumoral útil pueden ser esquematizados en la forma siguiente (232):

a) Los niveles plasmáticos de la sustancia considerada como marcador deben mostrar diferencias significativas entre los sujetos afectos de cáncer, los enfermos no cancerosos y los individuos sanos.

b) El test diagnóstico debe ser altamente sensible (fracción de diagnósticos positivos verdaderos, elevada) y específico (fracción de diagnósticos negativos ciertos cercana a la unidad).

c) El valor absoluto de la tasa de marcador cuantificada en el plasma debe estar directamente

relacionado con la masa tumoral existente en el momento del diagnóstico.

d) El marcador debe ser finalmente: 1) específico de órgano, 2) detectable en cantidades mínimas, 3) suficientemente estable como para permitir la realización del ensayo que conduce a su determinación.

## 1.2. CLASIFICACION DE LOS MARCADORES TUMORALES

Es posible clasificar los marcadores tumorales en tres grandes grupos (232,301).

### 1.2.1. Sustancias secretadas por el parénquina o estroma tumoral

A: Antígenos Oncoasociados y Oncoespecíficos.

CEA: Antígeno carcinoembrionario.
αFP: Alfafetoproteína.
TPA: Antígeno polipeptídico tisular.
FSA: Antígeno sulfoprotéico.
Tg : Tiroglobulina.
POA: Antígeno oncofetal pancreático.
BFP: Fetoproteína básica.
CsAp: Antígeno "p" colónico-específico.
Ag Nucleolares.
Proteína quística de la mama.

Ag Tumor asociado, tisular y circulante del Ca. de Pulmón.

Ag Tumor asociado, tisular y circulante del Ca. de Cérvix.

B: Proteínas y polipéptidos de acción hormonal.

ACTH: Hormona adrenocorticotrópica.
CT: Calcitonina.
ADH: Hormona antidiurética.
PTH: Parathormona.
PRL: Prolactina.
GH: Hormona de crecimiento.
nCG: Gonadotrofina coriónica.
nPL: Lactógeno placentario.

C: Hormonas no peptídicas, aminoácidos y productos derivados de su metabolismo.

Adrenalina.
Nor-adrenalina.
Alanina.
Hidroxiprolina.
Acido homovalínico.
Acido vanilmandélico.
Acido 5-hidroxiindolacético.
Poliaminas.

1,2,2. Sustancias liberadas o hiperproducidas a causa de modificaciones o cambios orgánicos inducidos directa o indirectamente por la presencia del tumor

A) Proteínas y enzimas:

Tg: Tiroglobulina.
PAP: Fosfatasa ácida prostática.
BAP: Fosfatasa alcalina ósea.
B-2-M: B-2-Microglobulina.
Eritropoyetina.
Ferritina.
Ceruloplasmina.
Lactoferrina.
Caseina.
Ig del Mieloma múltiple.
Macroglobulina de Waldenström.
Muramidasa.
Desoxinucleotidil - transferasa terminal.
Enolasa neuro específica.
γ - glutamil transpeptidasa.

B: Anticuerpos:

Ac. antivirus del Herpes simple.
Ac. antivirus de Epstein - Barr.
Ac. antivirus del tumor mamario murino.
Ac. antivirus símico de Mason - Pfizer.
Ac. antiantígenos de la leucemia vírica aguda.
Ac. antiantígenos del melanoma.

C) Reactantes de fase aguda:

Velocidad de sedimentación.
Proteína C reactiva.
Seromucoide.

## 1.2.3. Anticuerpos monoclonales obtenidos frente a determinantes antigénicos específicos del cáncer

Ac. Monoclonal antileucemia linfocítica aguda.

Ac. Monoclonal antimelanoma.

Ac. Monoclonal antineuroblastoma.

Ac. Monoclonal anticarcinoma digestivo (colon, recto, estómago y páncreas).

Ac. Monoclonal antiglioma.

Ac. Monoclonal anticarcinoma.

Ac. Monoclonal anticarcinoma ovárico y seroso ?.

Ac. Monoclonal anticarcinoma ovárico mucinoso ?.

Ac. Monoclonal antisarcoma.

Ac. Monoclonal anticarcinoma de mama.

Ac. Monoclonal anticarcinoma renal.

Ac. Monoclonal anticarcinoma de próstata.

## 1.3. LOS MARCADORES TUMORALES EN ONCOLOGIA CLINICA

La introducción en clínica oncológica de los marcadores tumorales debe estar orientada hacia la consecución de los siguientes objetivos:

a) Desarrollo de tests de "screening" o diagnóstico precoz del cáncer.

b) Establecimiento de indicadores de pronóstico de la enfermedad neoplásica.

c) Adscripción de pacientes a esquemas terapéuticos protocolizados.

d) Evaluación de la respuesta al tratamiento oncológico general, cualquiera que sea la modalidad terapéutica empleada.

e) Diseño de esquemas para el seguimiento evolutivo de la progresión local, regional o distal de la enfermedad primitiva.

[ La utilización de anticuerpos monoclonales antiantígenos específicos del tumor (grupo 1.2.3 de la clasificación anterior) ha permitido recientemente el diagnóstico positivo de la recidiva o metástasis tumoral (utilizando Ac marcados con trazadores radiactivos) y el tratamiento, en algunos casos, de la enfermedad tumoral diseminada (173). Es éste, indudablemente, un nuevo y prometedor campo de la Medicina Nuclear tanto en su vertiente diagnóstica como terapeútica ].

Para la consecución, total o parcial, de tales objetivos suele ser necesario el recurso a más de un

marcador. En efecto, ninguno de los marcadores tumorales agrupados en los puntos 1.2.1 y 1.2.2 de la clasificación anterior sirven, simultáneamente, para responder a la totalidad de los propósitos enumerados.

## 1.4. EL ANTIGENO POLIPEPTIDICO TISULAR (TPA)

Antígenos asociados a procesos tumorales pueden ser producidos y liberados a la circulación sistémica por gran número de neoplasias humanas (136). El valor clínico de la determinación de la presencia de productos antigénicos derivados del crecimiento tumoral, en la sangre de los pacientes, se enlaza directamente con la precoz información que se obtiene acerca de la recurrencia del proceso neoplásico, la efectividad del tratamiento y/o la actividad proliferativa del proceso tumoral. Hoy día ocupa un lugar básico en la investigación en clínica oncológica el desarrollo de métodos analíticos encaminados a la demostración, en el plasma de los pacientes, de sustancias bioquímicas capaces de indicar la actividad mitótica de las células clonogénicas tumorales.

Por otro lado, es primordial conocer que el cáncer es una enfermedad que progresa de forma discontínua y que esta progresión es un proceso dinámico cuyas consecuencias finales son fáciles de entender, aunque sea difícil determinar el estado en el que el tumor se encuentra en un momento dado (101,134,245,271).

En la terapéutica de los cánceres humanos, resulta esencial conocer si la masa celular -que puede ser estimada por procedimientos diagnósticos convencionales- disminuye o, por el contrario, aumenta su actividad proliferativa en el curso del tratamiento.

Desde el punto de vista biológico, la proliferación tumoral está sometida a variaciones que ocurren en el curso de la historia natural del tumor o que están determinadas por los efectos del tratamiento. Por ello, desde ahora debe ser aceptado que un determinado "marcador" aunque correlacione bien con la existencia y la actividad del tumor, pueda en ciertos períodos evolutivos del mismo, proporcionar una información falsa.

Para investigar la presencia de estructuras químicas diferenciales entre células normales y neoplásicas se han empleado métodos inmunológicos . Procedimientos bioquímicos (129) han puesto de manifiesto que las células pertenecientes a distintos tumores, cuando progresan, tienden a parecerse unas a las otras. La introducción de las técnicas de cultivo celular "in vitro" y el desarrollo de los métodos de citoinmunología (26) han permitido conocer que las células neoplásicas a diferencia de las células normales, absorben y neutralizan un determinado grupo de inmunoglobulinas (anticuerpos) específicas. Las propiedades antigénicas de las células neoplásicas fueron inicialmente asociadas a partes "insolubles" de sus constituyentes; sin embargo, la aplicación de un procedimiento de extracción (30,23,187) permitió la identificación de una sustancia protéica: elAntígeno

Polipeptídico Tisular (T.P.A.), que fue originalmente descubierto utilizando antisuero de caballo frente a la porción insoluble de las células tumorales (30). Estudios ulteriores de antigenicidad tumoral utilizando técnicas inmunoquímicas han demostrado la existencia de TPA en la práctica totalidad de los cánceres humanos (21,29). El TPA puede ser identificado también en tejidos normales altamente proliferativos ( Por ejemplo, tejidos fetales o placentarios). Por otra parte, su producción en los tejidos normales del adulto es baja o ausente, hecho que correlaciona bien con el escaso grado de proliferación celular de estos tejidos (23).

### 1.4.1. Propiedades físico - químicas del TPA

En disolución acuosa y para valores de pH comprendidos entre 2 y 12, el TPA tiende a formar agregados de peso molecular elevado, pero que en presencia del dodecil-sulfato-sódico pueden ser disociados en subunidades constituidas por simples cadenas peptídicas, fácilmente separables por gel filtración, cuyos pesos moleculares son $B_1 \simeq 43.000$ dalton, $B_2 \simeq 30.000$ dalton, y $C \simeq 17.000$ dalton (21).

En medio fuertemente básico (pH $\simeq$ 12) es posible identificar otra forma molecular de aproximadamente $8'5 \times 10^4$ dalton que debe estar constituida por la dimerización de dos subunidades $B_1$ (21).

El radio de Stokes de la macromolécula $B_1$ en disolución básica (≈ 80 Å) permite el cálculo de su coeficiente de asimetría, que resulta inusualmente elevado ($f/f_o \approx 2'7$) demostrándose así (187) que no se trata de una proteína globular sino que, por el contrario, su forma molecular debe ser extraordinariamente elongada (conformación α- helicoidal). A esta estructura no parecen contribuir los enlaces por puentes disulfuro puesto que la reducción y la carboxiaminometilación de la molécula no inducen ningún cambio en el comportamiento químico o en la actividad antigénica del TPA.

Estudios físico-químicos de ruptura y separación de fragmentos de la subunidad $B_1$ (29,240) han permitido determinar parcialmente la secuencia de aminoácidos que componen la proteína y demostrar que la misma secuencia se repite en TPA procedente tanto de tumores humanos como de tejido placentario. Es de destacar la ausencia del aminoácido cisteína (21,240) lo que explica la inexistencia de puentes disulfuro en la subunidad $B_1$. Por último, el contenido en azúcares y lípidos es inferior al 1% (33).

## 1.4.2. Naturaleza de los determinantes antigénicos de la molécula

La subfracción $B_1$ del TPA ha sido utilizada para producir anticuerpos en el conejo. Estos anticuerpos, utilizando la técnica de gel-difusión, muestran una única banda de precipitación cuando se enfrentan con las subfracciones $B_1$, $B_2$ y C del TPA y también cuando la

reacción inmunológica se realiza utilizando como antígeno el TPA presente en el suero de una persona normal. De igual forma, las subfracciones $B_1$, $B_2$ y C son indistinguibles cuando se realiza el test de hemaglutinación.

Estos hechos confirman la pureza inmunológica de la preparación TPA-$B_1$ y justifican la elección de esta subfracción (318) como preparación antigénica para la obtención de anticuerpos específicos. Por otra parte, el antisuero anti - TPA - $B_1$ obtenido en el conejo, posee la capacidad de detectar, por técnicas de inmunohistoquímica, estructuras con actividad - TPA en células cancerosas de variados orígenes (34).

El hallazgo de que la proteína posee la larga estructura de hélice $\alpha$ permite suponer que debe ser fácil de desnaturalizar puesto que todos los grupos son igualmente accesibles a los reactivos químicos. Esto se observa mediante el bloqueo de los restos Arginina con ciclihexanodiona y su desbloqueo con hidroxilamina donde se encuentra una relación lineal entre la actividad TPA y el porcentaje de resíduos arginina libres. Una inactivación completa de la actividad antigénica con posterior recuperación de la misma, es demostrativa de que todos los sitios de enlace al anticuerpo son funcionalmente dependientes de manera directa o indirectamente de la cadena lateral del aminoácido arginina (318).

Otras modificaciones de la cadena polipeptídica como la acilación de los residuos de lisina, sulfonación de las tiroxinas o alquilación del grupo indol del triptófano, no originan un descenso importante del potencial antigénico del TPA-$B_1$ y, por tanto, no deben formar parte, o hacerlo de manera secundaria, del centro de unión del antígeno con el anticuerpo.

Por otra parte, para una proteína globular que posea un peso molecular aparente de aproximadamente 43.000 dalton es posible esperar la existencia de, al menos, 5 sitios inmunorreactivos; sin embargo, debido a la estructura de la proteína, claramente diferente de la forma globular, la investigación cuidadosa de su molécula ha permitido demostrar la existencia de 3 únicos centros dotados de actividad inmunológica (240).

Por último no ha podido ser comprobada la existencia de reacción cruzada entre el TPA y los anticuerpos frente a la $B_2$ - microglobulina, $\alpha$ - fetoproteína y antígeno carcinoembrionario (317), ni frente a reactantes de fase aguda.

### 1.4.3. Organo blanco

Los marcadores tumorales son sustancias que se producen y liberan en cantidades supranormales por las células envueltas en los procesos proliferativos patológicos que conducen a la formación de tumores. El

antígeno polipeptídico tisular fue considerado inicialmente en sentido estricto como un producto indicador del crecimiento de los carcinomas de origen epitelial (27).

Bajo condiciones normales, en los tejidos del adulto, tales sustancias no se producen o su síntesis está limitada a cantidades mínimas. Algunas de estas sustancias pueden ser liberadas por células de tejidos fetales (117), la placenta (24) o el endodermo del saco vitelino (217). Ciertos antígenos asociados a tumores pueden ser observados exclusivamente en un tipo particular de tumor, por ejemplo: la fosfatasa ácida prostática en el Ca. de próstata, la γ - glutamiltranspeptidasa en el Ca. de hígado, la tiroglobulina en el Ca. diferenciado de tiroides, ciertas gammaglobulinas en los plasmocitomas, etc. En contraposición a estos hechos, el TPA es un producto normal en muchos tejidos corporales pero que, a causa de la lesión tumoral se libera en cantidades anormalmente altas, resultando ser, por ello, un "marcador" de la actividad tumoral en general. Actualmente se cita al TPA como particularmente útil en los tumores de mama (209), cáncer colorrectal (9), cáncer del tracto gastrointestinal (205), cáncer de pulmón (189) y cáncer de tracto génito-uretral (171). La placenta contiene grandes cantidades de TPA (23) y, en tejidos fetales, analizados a las 10, 17 y 24 semanas de la gestación, las mayores concentraciones de esta proteína se encuentran en hígado, pulmón, estómago, intestino y riñones. Determinando la concentración tisular de TPA a lo largo del trayecto del tubo digestivo en fetos de 24 semanas, los niveles del TPA por gramo en tejido alcanzan un valor máximo en la zona

proximal del intestino delgado y en el meconio (22). Finalmente, la proteína TPA no es especifica del hombre, pudiéndose encontrar sustancias que reaccionan frente al anticuerpo anti-TPA en la práctica totalidad de los animales e incluso en especies tan lejanas en el proceso evolutivo como son los peces (28). En este sentido, hay que destacar que los niveles más bajos de TPA se encuentran en el caballo que es, precisamente, el animal más utilizado para la producción de anticuerpos frente al TPA del hombre (23).

A veces es posible encontrar elevaciones séricas de TPA en individuos sanos y, sobre todo, en pacientes afectos de enfermedades infecciosas agudas (gripe, infecciones urinarias o del aparato respiratorio, (186)) o en la hepatitis (282). En general, en estas enfermedades agudas existe una fuerte tendencia hacia la vuelta a la normalidad en los niveles séricos de TPA cuando el sujeto se recupera del proceso infeccioso.

### 1.4.4. Metodología del ensayo

El TPA puede ser determinado en suero, orina y otros fluidos biológicos utilizando técnicas de inhibición de la hemaglutinación (31) o, más recientemente, por radioinmunoensayo (32). Las técnicas radioinmunológicas (RIA) para la medida de TPA permiten cuantificar cantidades del orden de $1\times10^{-13}$ g/muestra, no encontrándose reacciones cruzadas con CEA, αFP u otras moléculas normalmente presentes en el suero humano. Los

resultados obtenidos por RIA correlacionan bien con los encontrados utilizando el test de inhibición de la hemaglutinación (23).

### 1.4.5. Significación clínica de las elevaciones de TPA

El primer estudio significativo acerca de la utilidad del TPA en clínica oncológica fue realizado en 1.973 por Björklund y col. (29) utilizando la técnica de inhibición de la hemaglutinación, procedimiento éste que ya permitió establecer diferencias significativas entre enfermos con cáncer metastásico y sujetos libres de enfermedad (individuos sanos y pacientes radicalmente tratados de su proceso neoplásico sin evidencia de enfermedad en el momento de la dosificación del TPA). Resultados que coincidían, en buena medida, con los anteriores fueron publicados en 1.978 por Menendez-Botet y col (205) que encontraron que un 74% de los enfermos con cáncer, de variadas localizaciones, presentaban niveles séricos de TPA superiores al límite de la normalidad.

Utilizando técnicas de radioinmunoensayo, Luthgens (191) en 1.979 realiza el primer ensayo clínico de la utilización del Antígeno Polipeptídico Tisular sobre una población constituida por 191 sujetos sanos (donantes de sangre) y 101 pacientes afectos de diversos procesos neoplásicos, confirmando los resultados del trabajo de Menendez-Botet. El 72% de los pacientes con cáncer presentan títulos periféricos de TPA elevados y las

diferencias entre el nivel de concentración medio de TPA en los sujetos sanos respecto a los enfermos (89 v.s. 398 U/L) son altamente significativas ($p < 0,0001$).

El nivel de TPA en fluidos ascíticos humanos ha sido estudiado por Badger (14) en pacientes con cáncer, cirrosis, fallo cardíaco y tuberculosos. El umbral entre enfermedad benigna/enfermedad maligna fue situado en 2.500 U/L. Los resultados demuestran que la concentración de esta proteína es mucho mayor en líquido ascítico que en sangre u orina y que el 59% del total de pacientes cancerosos con ascitis tienen niveles de TPA > 2.500 U/L, mientras que ninguno de los afectos de otros procesos distintos alcanzan este nivel. Llama la atención, por último, que el TPA resultó indetectable en una proporción cercana al 10% de los fluidos ascíticos ensayados, no existiendo diferencias al estudiar este dato en los grupos, cáncer/enfermedades benignas, considerados.

Determinaciones de la tasa de TPA en orina en sujetos afectos de cáncer, comparadas con los niveles de este antígeno que es posible encontrar en sujetos sanos han demostrado también diferencias significativas (205) y la principal aplicación de este método parece radicar en el estudio diagnóstico de carcinoma de vejiga urinaria (61,149).

En un intento de correlacionar los valores de TPA con el pronóstico del cáncer, Elkund y col (172) han seguido la evolución de un numeroso grupo de pacientes con cáncer,

utilizando la concentración sérica del antígeno para estratificar el grupo de enfermos en cuatro subclases, la primera de ellas constituida por aquellos enfermos que presentaban niveles séricos de TPA comprendidos dentro de la normalidad (clase A, TPA≤80 U/L) y las otras tres definidas por los siguientes umbrales: clase B: 80 < TPA ≤ 300 U/L, clase C: 300 < TPA ≤ 1000 U/L y clase D: TPA > 1000 U/L.

Cada subgrupo contiene pacientes con diferentes tipos, estadios y localizaciones del primario. Los resultados demuestran una considerablemente menor mortalidad en la clase A (subgrupo con TPA sérico normal) que en cada una de las otras clases. La clase D, por ejemplo, arroja una tasa de mortalidad del 70% a los cinco meses. Estos resultados demuestran que altas cifras de TPA en pacientes con cáncer suponen mal pronóstico en cuanto a la supervivencia se refiere, mientras que valores de TPA normales se asocian con supervivencias mucho más prolongadas y, por, tanto indicativas de pronóstico favorable.

## 1.5. NIVELES DE TPA Y CANCER DE MAMA

Durante la pasada década, los estudios referentes a la utilización de marcadores tumorales, en el análisis de las características clínicas y comportamiento biológico de ciertos tipos de tumores, han tenido una difusión considerable. Inicialmente, la medida de los niveles plasmáticos o urinarios de tales marcadores se consideró

como una especie de panacea en lo que al diagnóstico precoz y control de la evolución de algunos cánceres se refiere. Trabajos posteriores han situado el problema en su real dimensión y demostrado que, al menos en cáncer de mama, el papel de los marcadores es limitado (35).

Efectivamente, considerando que el marcador ideal debe ser a) suficientemente sensible como para detectar pequeñas cantidades de tumor; b) específico de cáncer mamario y c) de fácil realización y coste económico reducido, resulta necesario admitir que en patología mamaria la tecnología de marcadores ha sido, hasta el momento, incapaz de suministrar datos de orden pronóstico susceptibles de uso de modo rutinario. De cualquier forma hay que distinguir dos campos de aplicación importantes. En el primero de ellos, situación preoperatoria, parece claro que los niveles únicos de TPA no proporcionan ningún criterio discriminante útil ni para la decisión diagnóstica (benignidad frente a malignidad tumoral) ni tampoco para efectuar una aproximación al pronóstico de la enfermedad tumoral. Así, mientras que en el 42% de las enfermas con cáncer operable las concentraciones de TPA en sangre periférica, medidas en el preopetorio inmediato, se sitúan por encima del límite superior de la normalidad, esta misma elevación ocurre en, aproximadamente, el 30% de las pacientes afectas de tumoraciones benignas de la mama (213).

En situación postoperatoria, según Menendez-Botet y col (202), el proceso transcurre en la siguiente forma: el 43% de las enfermas operadas de cáncer sin evidencia de

enfermedad (NED), el 57% de los casos con recidiva local (RL) y hasta el 86% de las enfermas con metástasis clínicamente evidentes presentan niveles plasmáticos de TPA elevados.

Los resultados obtenidos en nuestro Departamento, basados en la fijación de un umbral de decisión superior [ límite paramétrico de 190 U/L (294) ] han permitido establecer los siguientes hechos:

i) Las enfermas tratadas de cáncer de mama, cualquiera que fuese el estadio de presentación inicial del tumor, que permanecen libres de enfermedad muestran valores de TPA inferiores a 190 U/L.

ii) La falta de correspondencia existente entre la presencia de tumor en los linfáticos de la axila - índice predictivo de enfermedad microscópica distal- y las cifras medias de TPA, hace pensar que este antígeno es insensible, como lo es el CEA (295), en la detección de masa tumoral residual oculta.

iii) Mientras que en situación de Recidiva Local (RL) las concentraciones plasmáticas medias de TPA permanecen dentro de límites normales, la aparición clínica de metástasis se asocia sistemáticamente con títulos periféricos anormalmente elevados de TPA.

iiii) Considerados globalmente todos los casos, la comparación entre los valores medios de TPA en los subgrupos de pacientes NED - EP (E.P.:Enfermedad Presente), NED - RL y NED - M, arroja diferencias

estadísticamente significativas. Efectuada la comparación dentro de cada estadio clínico y con la salvedad del Estadio I ( por razones del escaso número de casos estudiados ), en los restantes resultan significativas las diferencias observadas entre NED-EP y NED-M. Entre los subgrupos NED y RL no hemos encontrado diferencia significativa alguna (294).

Para el cálculo de los índices de sensibilidad (S = fracción de diagnosticos positivos verdaderos), Especificidad (E = fracción de diagnósticos negativos ciertos) y Precisión (P) diagnóstica del test de dosificación sérica de TPA en la presunción de enfermedad metastásica, utilizando como punto de referencia inequívocamente cierto la presencia de áreas tumorales de cáncer de mama clínica, radiológica y/o histológicamente documentadas, y fijando en 190 U/L el valor discriminante Normalidad / Anormalidad del test, Torres y col (295) han encontrado los siguientes resultados: Sensibilidad: 41%, Especificidad: 93%, Precisión diagnóstica: 71%.

Es habitual, por otra parte, la utilización de un umbral de concentración de TPA de 90 U/L como cifra límite entre situaciones normales y patológicas. Skryten (266) tiene descritos, en estas condiciones y referidos al cáncer de mama, los siguientes índices: S=64%, E=78% y P=71%, cifras que -como resulta fácil comprobar- son muy semejantes a las anteriormente indicadas, a pesar de que, en nuestra experiencia se situó el límite del ensayo a un nivel muy superior con la intención de reducir al máximo el número de diagnósticos falsos positivos (294). Con

umbrales de [TPA]=90 U/L Kjellgren (167) y Menendez-Botet (205) tienen publicados para el coeficiente S valores del 88% y el 75% respectivamente, aunque sus resultados se resienten de falta de Especificidad (50% y 35% en uno y otro caso).

De acuerdo con las referencias encontradas en la bibliografía, los niveles de CEA (246,275,294) y TPA en pacientes con cáncer de mama metastatizado aparecen discreta pero consistentemente elevados. Cabe preguntarse entonces si la elevación de ambos marcadores se encuentra relacionada entre sí -lo que indicaría que la síntesis y liberación de uno y otro antígeno guardan idéntica relación con el estadío evolutivo de la enfermedad- o si, por el contrario, CEA y TPA, aunque concordantemente elevados en situación de enfermedad metastásica mantienen una relativa independencia uno del otro. Los datos publicados hasta ahora (23,188) se pronuncian a favor de esta última opción, es decir, la elevación de un marcador tumoral no tiene por qué acompañarse del incremento del otro. Esta hipótesis ha llevado incluso a proponer como parámetro discriminante ideal de la situación Normal / Anormal, la combinación , en forma de producto, de las concentraciones séricas de CEA y TPA en cada caso (254). La aplicación de este criterio a los resultados encontrados en la serie de enfermos estudiada por Torres y col (295) no ha proporcionado ningún tipo de mejora en los índices S, E y P. Por el contrario, considerando de manera independiente a ambos antígenos y aceptando como umbral para la decisión Normal / Anormal la elevación indistinta de uno u otro, se modifica sensiblemente la exactitud del

test diagnóstico, obteniéndose valores de Sensibilidad y Precisión del 66% y 79%, respectivamente (294).

Parece claro, a juzgar por los anteriores resultados, que la utilización conjunta de CEA y TPA en el estudio evolutivo de pacientes diagnosticadas y tratadas de cáncer de mama eleva la probabilidad de acierto diagnóstico a 4 de cada 5 mujeres sometidas a control. Queda por estudiar ahora el comportamiento de los marcadores tumorales durante el curso evolutivo del carcinoma, en particular en la transformación de la enfermedad subclínica distal en enfermedad metástasica abierta. En síntesis, el estudio realizado por Torres y col (295) ha puesto de manifiesto los siguientes hechos: i) Siempre que las concentraciones plasmáticas de CEA y TPA se elevaron por encima del rango normal, los datos clínicos, radiológicos, gammagráficos, etc., de investigación de metástasis confirmaron la presencia de éstas; ii) el mantenimiento dentro del intervalo normal de los títulos periféricos de uno y/u otro marcador, en dosificaciones repetidas, no excluyó la aparición de metástasis, cuyo reconocimiento se efectuó por otros procedimientos. Por ello se ha establecido que sobre un fondo previo de normalidad, el incremento de los niveles séricos de CEA y/o TPA predice la progresión del tumor y la transformación de la enfermedad sub·línica en enfermedad metastásica en 3 de cada 4 enfermos, aproximadamente (294).

Por otra parte, la utilización de los antígenos CEA y TPA en el control de la efectividad del tratamiento

quimioterápico a que son sometidas -en determinadas ocasiones- las enfermas de cáncer de mama, han sido objeto de investigaciones recientes (190,209,213,294). Los subgrupos de pacientes sometidos a quimioterapia adyuvante que presentan al comienzo del tratamiento niveles normales de CEA y TPA, mantienen cifras de ambos marcadores dentro de la normalidad a lo largo de todo el tratamiento (295). En una pequeña fracción de los casos tratados (3/24≈12%) se objetivó una clara elevación inicial de los títulos periféricos de los marcadores, normalizándose éstos después en el curso de los primeros ciclos de QT. En 1/25 casos se demostró, desde el principio, una elevada concentración de antígenos oncoasociados que alertó sobre la posibilidad -confirmada posteriormente- de que la enferma se encontrase en situación clínica de enfermedad diseminada. Por último, tres de las veinticuatro enfermas con cifras iniciales y evolutivas de CEA y TPA normales hicieron con posterioridad un cuadro de diseminación distal, el cual no fué advertido por los marcadores tumorales ni influenciado por la terapéutica citotóxica.

Utilizando, finalmente, los datos de Torres y col (295), derivados del estudio de un grupo de enfermas (25 en total) sometidas a QT paliativa en el que la respuesta al tratamiento citotóxico se evaluó en la forma clásica de RC (remisión completa), RP (remisión parcial), ET (estabilización tumoral) y EP (enfermedad progresiva) se ha podido establecer que la monitorización de la respuesta al tratamiento sistémico paliativo en cáncer de mama, puede llevarse a cabo mediante la medida, en condiciones rigurosas y estandarizadas, de los antígenos CEA y TPA.

Del análisis secuencial de estas sustancias se derivan, además elementos de carácter pronóstico (294).

## 1.6. MODELOS TUMORALES

En Oncologia, la investigación se basa en tres tipos de sistemas cuya complejidad disminuye en el orden siguiente:

a) Cáncer humano.

b) Tumores transplantados al animal inmunocompetente.

c) Líneas celulares establecidas.

Los esferoides tumorales (agrupación de células con estructura tridimensional que pueden obtenerse a partir de cultivos celulares neoplásicos) constituyen un nuevo modelo de análisis del comportamiento biológico general de ciertas neoplasias (3) cuya complejidad es intermedia entre los tumores "in vivo" y los cultivos "in vitro".

La justificación teórica del más simple de los modelos de estudio de las neoplasias humanas (los cultivos celulares) descansa sobre la hipótesis de que una sola célula alterada, puede originar el tumor clínico (226). Como, por otra parte, todo tumor puede considerarse como un crecimiento celular que responde, positiva o negativamente, a concentraciones fisiológicas o farmacológicas de determinadas hormonas o drogas, la disponibilidad de una población celular homogénea y el

control, con precisión, de los componentes de los medios nutrientes utilizados para el cultivo celular, ha posibilitado el desarrollo y aplicación de estas técnicas para el estudio puntual de alguno de los aspectos fundamentales de la biología tumoral. Fresharey (107) ha resumido de manera esquemática (Fig.1), a este respecto, las principales áreas de aplicación de los cultivos celulares en la investigación Oncológica.

## AREAS DE INTERES EN CULTIVOS CELULARES

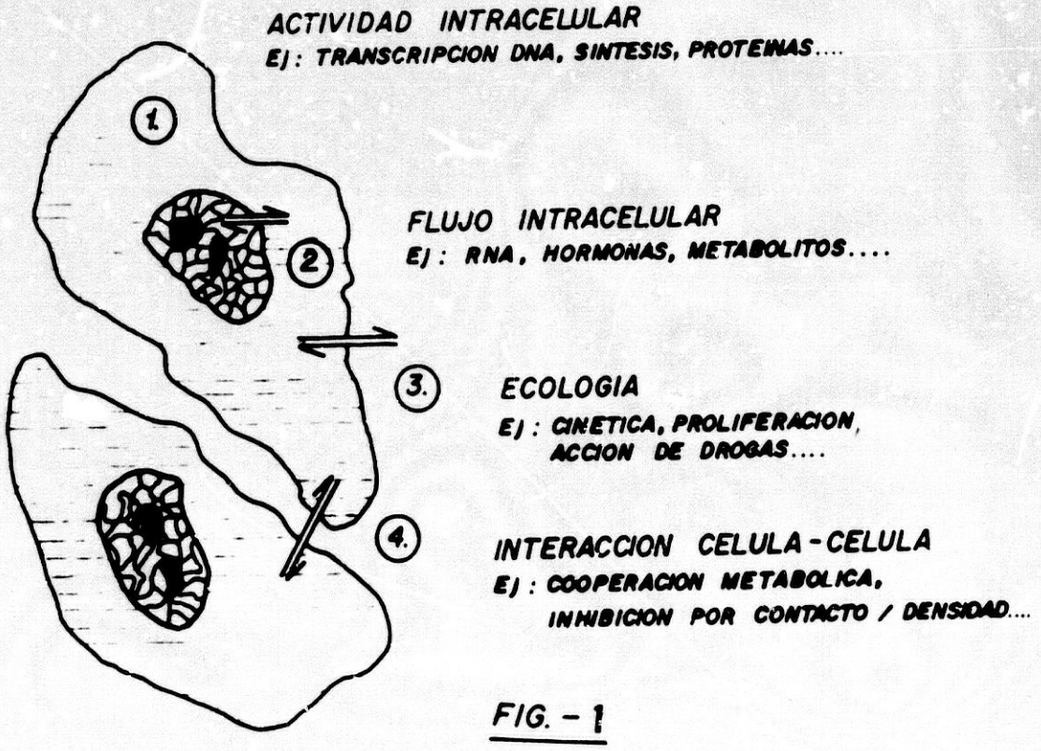



FIG. - 1

## 1.6.1. Cultivos celulares

Las células de mamífero cultivadas durante largos períodos de tiempo "in vitro" crecen en un medio ambiente distinto del que las rodea "in vivo". Cada tipo celular, obtenido de diferentes órganos, puede requerir "in vitro" diferentes componentes nutricionales en el medio de cultivo para mantener su crecimiento y conservar sus funciones especializadas (88). Por ello, la elección del medio de cultivo y de los suplementos necesarios para la replicación celular viene determinada por las características de la célula que se desea estudiar (132).

Para clasificar las células y orientar al investigador acerca de sus requisitos de nutrientes pueden emplearse los criterios siguientes:

a) Cariotipo.

b) Parámetros de la cinética de proliferación celular.

c) Crecimiento dependiente o independiente del anclaje.

d) Inhibición de la multiplicación celular mediada por la densidad de elementos en el cultivo (inhibición por contacto).

e) Pruebas morfológicas y/o biológicas para la definición de benignidad o malignidad celular.

f) Etapas y estadio final del proceso de diferenciación celular.

En general, los requerimientos mínimos de las células para el crecimiento "in vitro" pueden ser divididos en dos grupos:

1) Condiciones físico-químicas del medio ambiente: incluye la temperatura a 37°C, la concentración de hidrogeniones (pH del medio 7'4), la osmolaridad (260 a 320 mOms/Kg.), el potencial óxido-reducción y mezcla de gases: 95% de aire y 5% de $CO_2$ con humedad relativa del 95%.

2) Composición del medio de cultivo: para el crecimiento celular, el medio nutricional debe incluir en disolución todos los elementos necesarios para que la célula alcance las fases del ciclo mitótico (aminoácidos esenciales, nucleósidos, vitaminas, sales minerales y oligoelementos); son imprescindibles. además, ciertas moléculas orgánicas capaces de suministrar energía, fundamentalmente glucosa, y otros componentes que las células encuentran en los fluidos biológicos. La presencia en los medios de cultivo de tales moléculas se asegura añadiendo a estos, en proporción variable (5-25%), suero fetal de vaca cuyos componentes son: albúmina, globulina, otras proteínas y polipéptidos de naturaleza hormonal, hormonas no protéicas, metabolitos y factores de crecimiento (108).

Hoy día, afortunadamente, las facilidades comerciales han hecho asequible la elección del medio de cultivo apropiado en cada caso. De igual modo, la fabricación de cajas y discos de plástico poliestireno (COSTAR) tratado con polímeros como la poly-D-lisina o el colágeno, facilitan la aplicación práctica de las técnicas de cultivo celular.

Para evitar laposible contaminación bacteriana de levaduras y hongos es recomendable el empleo de antibióticos suplementados en los medios de cultivo. De entre ellos, los más usados son la penicilina (100 U/ml), la estreptomicina (100 mg/ml) que previenen los crecimientos bacterianos y la gentamicina (40 µg/ml) que suprime el desarrollo de mycoplasmas en el medio de cultivo (322).

Los medios, una vez preparados, se someten a reesterilización mediante su paso a través de unidades de filtración Millipore (Millipore Corporation) con filtros de 0'22 µm de tamaño de poro en una cámara de flujo laminar.

### 1.6.2. Línea celular MCF-7

La línea celular MCF-7 de origen tumoral, fue iniciada en 1973 por Soule y col (270) a partir de un derrame pleural maligno de una paciente postmenopáusica afecta de adenocarcinoma ductal mamario. Su gran difusión como

modelo experimental de cáncer de mama puede ser atribuida a que se trata de la primera línea celular documentada como receptor estrogénico positivo (42) que responde a cambios metabólicos y estructurales mediados por la acción de los estrógenos (36,178,302).

La línea celular MCF-7 presenta, además, receptores específicos para otros agentes hormonales. Entre ellos se encuentran: andrógenos, progestágenos, glucocorticoides, vitamina $D_3$, hormonas tiroideas, prolactina, insulina y calcitonina, así como factores estimuladores del crecimiento celular (97,178).

### 1.6.3. Línea celular EVSA-T

La segunda línea celular utilizada en este trabajo se denomina EVSA-T; es también de origen tumoral mamario. Fue puesta en cultivo por primera vez en 1.976 a partir de un líquido ascítico metastásico de una paciente afecta de un carcinoma ductal infiltrante de mama (178). Sus características e índices de respuesta a diferentes sustancias capaces de modificar su crecimiento han sido exhaustivamente estudiados (97,146). La diferencia primordial con la línea celular MCF-7 radica en la ausencia, en esta segunda línea, de receptores de estrógenos y de progesterona y, por tanto, en la no respuesta a la acción de las hormonas estrogénicas ni a los progestágenos (146).

## 1.6.4. Crecimiento de las Poblaciones Celulares

El estudio de la cinética de la proliferación celular se inició como disciplina en la década de 1950 cuando fue posible, utilizando isótopos radiactivos, el seguimiento de los acontecimientos bioquímicos que aparecen en el período intermitótico (147). En el período del desarollo de este campo de la ciencia ocupan un lugar primordial las experiencias de marcaje de DNA con precursores tritiados. En efecto, las técnicas isotópicas han puesto de manifiesto la continua renovación de todas las moléculas que constituyen las células con la única excepción del DNA que goza de la propiedad de no abandonar la célula de la que forma parte más que cuando la célula muere o se divide.

Los objetivos de los estudios cinéticos sobre poblaciones celulares, tumorales o no, son los siguientes (297):

a) Establecer para cada uno de los tejidos del organismo la duración de la vida de las células que lo componen.

b) Definir el origen de esas células, sus movimientos en el interior del organismo y su devenir.

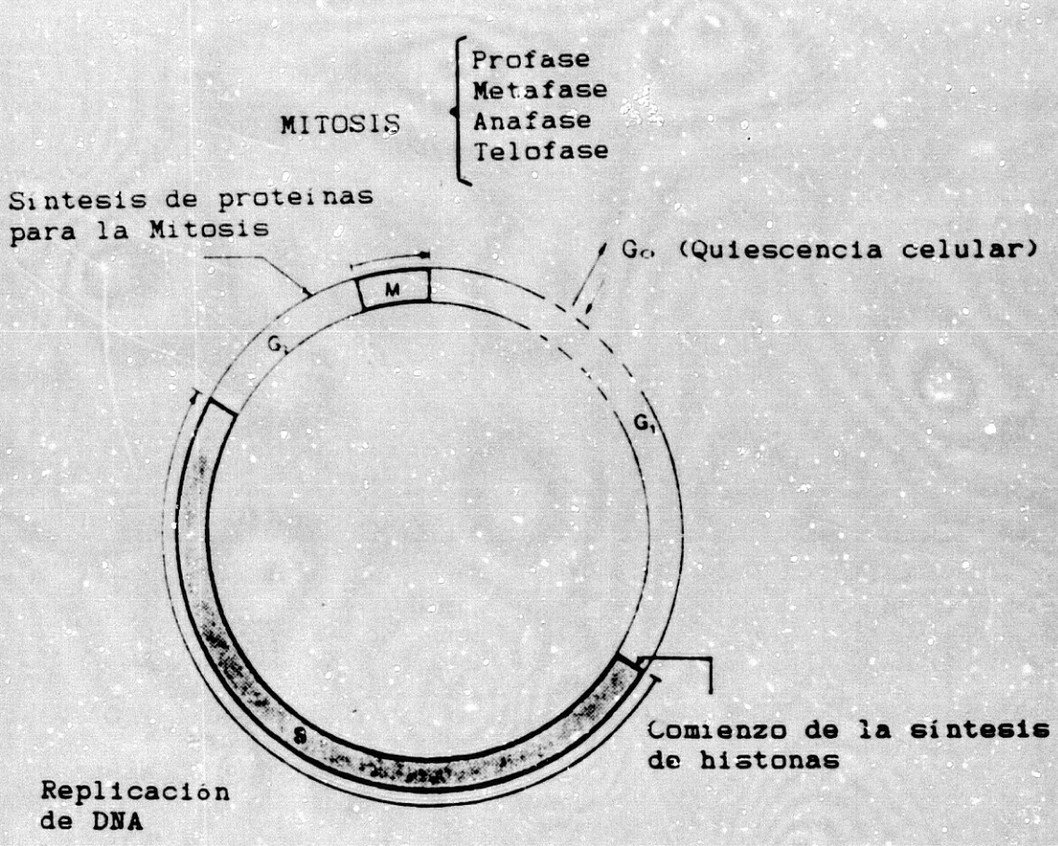
c) Conocer las leyes que rigen su multiplicación y, eventualmente, su diferenciación.

d) Descubrir, finalmente, los mecanismos gracias a los cuales los tejidos mantienen constante su número de células y son capaces de ofrecer una respuesta biológica a la despoblación celular ocasionada por una agresión (cirugía, radioterapia, quimioterapia, etc.).

### 1.6.4.1. Algunos conceptos generales

Se denomina tiempo de generación o de ciclo celular (Tc) al período necesario para que las células de una determinada población celular completen un ciclo divisorio. La bioquímica de la división celular es extraordinariamente compleja: cambios en la actividad enzimática, procesos de síntesis de organelas, tales como los centriolos, alteraciones en la magnitud del contenido de aminoácidos y nucleótidos, etc.. La regulación de toda la actividad biosintética celular, resulta ser, por otra parte, función del tránsito de la célula a lo largo de cada una de las fases del ciclo (300).

A continuación se representa esquemáticamente el ciclo celular.




Para que se divida una célula es necesario que se reproduzca cada una de las macromoléculas de DNA, de forma que las dos células hijas reciban la totalidad de la información genética. Esta duplicación del material genético o síntesis del DNA se efectúa durante una etapa concreta del ciclo celular denominada fase S.

Se llama $G_1$ (Gap presintético) a la porción de tiempo que se sitúa entre el fin de la mitosis y el inicio de la fase S. En esta etapa, la célula adquiere los sustratos necesarios para iniciar y completar adecuadamente la replicación del DNA. La fase $G_2$ (Gap postsintético) está situada entre el final de S y la nueva mitosis M, y durante este período las funciones celulares se orientan hacia la síntesis de la "maquinaria" mitótica útil para el proceso de división celular.

Las fases S , $G_2$ y M del ciclo celular tienen una duración aproximadamente constante. El período $G_1$ es el más variable en cuanto a duración y los mecanismos de regulación del crecimiento tienen lugar por detención del ciclo mitótico en algún punto específico de $G_1$ (233). Se dice entonces que la célula clonogénica se estanca en fase $G_0$ y, en esta situación, los elementos celulares están sometidos a complejos mecanismos de control (mecanismos celulares u hormonales) que los mantienen en estado quiescente o que, por el contrario, promueven su entrada al ciclo divisorio (300).

Cuando la población no crece sincrónicamente y cuando en el tejido, o en el cultivo, coexisten elementos en ciclo con células quiescentes, se utiliza el tiempo de duplicación ($T_D$), definido como el intervalo de tiempo necesario para que el grupo celular duplique sus elementos (297), para describir la cinética de la proliferación celular.

La cantidad de DNA contenida en un núcleo en $G_2$ es doble que la que existe en un núcleo en $G_1$. Las células en S tienen contenidos de DNA intermedios.

Hay que tener en cuenta que no todas las células que finalizan la división mitótica entran de nuevo, inmediatamente, en el ciclo celular. Existen, en la mayoría de los tejidos, células con características morfológicas y bioquímicas idénticas a las que poseen en $G_1$ pero que están "quiescentes". Es decir, son elementos en los que no se ha iniciado la secuencia de acontecimientos bioquímicos que caracterizan al ciclo celular. Este hecho ha sido demostrado por el retraso de aproximadamente 10 a 12 horas que se observa entre el momento en que se acaba de efectuar una agresión mecánica (por ejemplo, resección de una parte de hígado) o bioquímica capaz de estimular las células en reposo, y el momento en que éstas entran en fase de síntesis de DNA (297). Parte de este tiempo corresponde, sin duda, a la duración de $G_1$ que es, en ciertos tejidos, muy corto (del orden de una a dos horas e incluso menos) como es posible demostrar en el curso de los ciclos celulares siguientes; el resto del tiempo está dedicado a la puesta a punto de la maquinaria bioquímica necesaria para la realización de la síntesis enzimática que caracteriza a la fase $G_1$ propiamente dicha. Por desgracia, estos procesos son mal conocidos y no se puede distinguir a las células quiescentes de las células en $G_1$.

Consideraciones de este tipo han llevado a distintos autores (147,300) a llamar $G_0$ al estado en que las células

se encuentran fuera del ciclo, reservando la denominación de $G_1$ a la fase presintética previamente dicha. La indefinición surge a causa de la variedad de fenómenos a los que corresponde a la quiescencia celular. Ciertas células quiescentes son, como hemos visto, células en reposo capaces de dividirse bajo el influjo de un estímulo hormonal (300). Este grupo constituye realmente la población de células en $G_0$. Otras células "quiescentes" son aquellas en las que la fase $G_1$ es particularmente larga (147). Por último, existen con morfología idéntica células que han llegado a ser incapaces de dividirse, incluso bajo la influencia de un estímulo, constituyendo las denominadas células "inertes" (297). Células en $G_0$ y células quiescentes no son pues sinónimos. Las dos expresiones corresponden a nociones conceptualmente claras pero experimentalmente imprecisas y por ello es necesario definir el concepto de tiempo intermitótico (297) como la duración de la vida celular entre dos mitosis sucesivas, tiempo que es diferente del tiempo de ciclo si las células pasan por una fase quiescente más o menos larga, antes de entrar en un nuevo ciclo.

Mendelshohn (204) para resolver teóricamente este problema ha introducido el concepto de Fracción de Crecimiento, que se define mediante la relación entre el número de células proliferativas y el número total, proliferativas y quiescentes, de elementos celulares del cultivo (o tumor).

En una población celular se pueden distinguir varios compartimentos. Por ejemplo, en el seno de una población

de células hematopoyéticas medulares se distinguirá el compartimento de las células madre, el de las células en vías de proliferación y diferenciación, y el de las células diferenciadas maduras (funcionales) que no se dividen. Esta subdivisión en compartimentos es operacional, es decir, ha sido introducida por necesidades de ciertos estudios o cálculos particulares y puede reposar sobre criterios morfológicos o puramente conceptuales.

Denominamos tiempo de tránsito en un compartimento al espacio de tiempo comprendido entre el instante en que una célula entra en él y el instante en que ella, o sus descendientes, lo abandonan. El tiempo de tránsito puede ser igual a varias duraciones de la vida celular. En un compartimento de células que no se dividen (glóbulos rojos, por ejemplo), tiempo de tránsito y duración de la vida celular son equivalentes.

Denominamos flujo celular, de entrada o salida de un determinado compartimento, al número de células que entran o salen de ese compartimento por unidad de tiempo. Se dice que una población está en equilibrio cuando el número de elementos que la componen permanece constante; es decir, cuando el flujo de entrada es igual al flujo de salida. Este es el caso de todos los tejidos normales en el hombre adulto y el equilibrio se alcanza de múltiples formas (138). Un caso particular de población en equilibrio es aquel en que todas las células tienen la misma duración de vida y donde a cada "nacimiento" (o entrada en el

compartimento) corresponde la desaparición de una célula que ha alcanzado el término de su vida.

La edad de un elemento celular determinado tiene como origen de tiempos (T=0) la mitosis y entendemos por distribución de las edades celulares de una población el reparto de sus elementos de acuerdo con diferentes clases de edad. La distribución de edades depende de la cinética de proliferación de la población. En el caso de una población en equilibrio, sin variabilidad, el número de células, en cada una de las clases de edad, es igual y la distribución por edades adopta una forma rectangular. En el caso de una población en crecimiento, hay mayor proporción de células jóvenes. Así, si cada célula, al inicio de un tiempo Tc, se divide y hace nacer dos nuevas células, habrá dos veces más células jóvenes que acaban de nacer que células que alcanzan la edad Tc y comienzan una nueva división.

### 1.6.4.2. Cinética Celular

Cada célula proliferante da lugar a dos células hijas que continuan el proceso proliferativo, por lo que la población celular incrementará geométricamente su número.

Simplificando el proceso, podemos imaginar una población celular sincrónica en la que todas las células alcancen la mitosis exactamente al mismo tiempo.

Matemáticamente este incremento geométrico puede ser expresado de la forma siguiente:

$$N_{(t)} = 2^{x}$$

$N_{(t)}$: Número de células en la población para el tiempo t

x : Número de divisiones que la población ha llevado a cabo en este tiempo.

La base 2 se utiliza en razón a que el proceso de mitosis que conduce el incremento de la población es una fisión binaria.

El crecimiento de la población celular (dN) para cualquier incremento de tiempo (dT) es debido exclusivamente al paso de células a través de la mitosis M. Para una población asincrona que contiene N células, una fracción constante (K) de las mismas pasaría a través de M por unidad de tiempo. Entonces (300):

$$\frac{dN}{dt} = K\,N$$

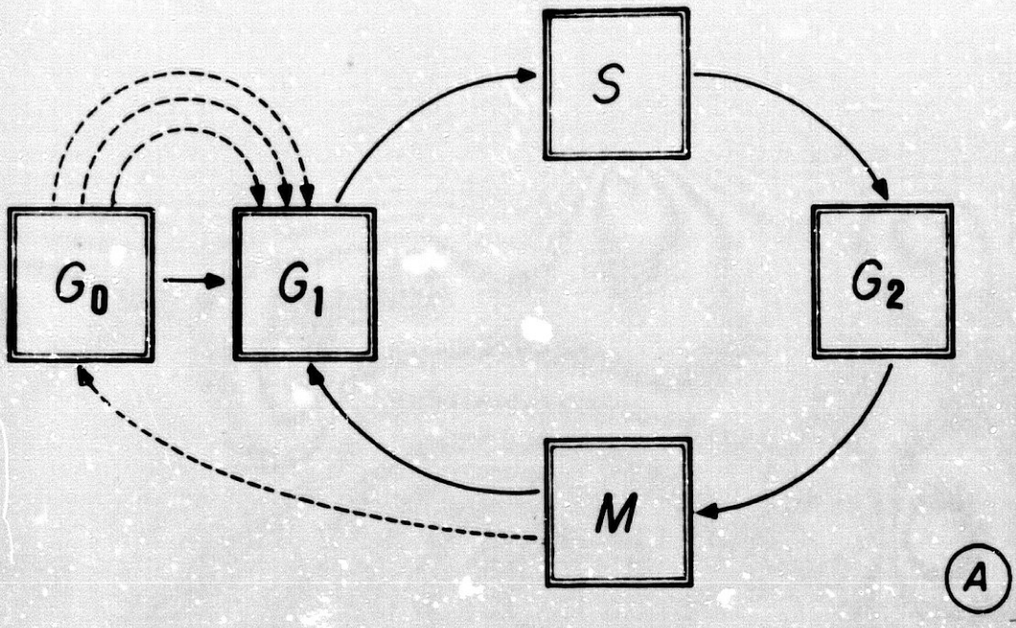
e integrando : $N_{(t)} = N_{(o)}\, e^{Kt}$ (I)

Donde $N_o$ : número de células en el origen de tiempos.

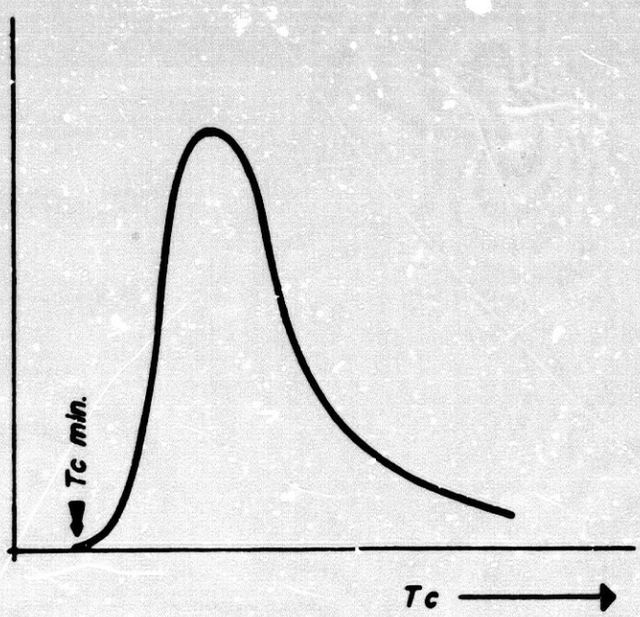
El crecimiento de un tumor sólido puede ser considerado como el resultado final de diversos procesos que se inician en la repetida e incontrolada división de las células neoplásicas. Cuando se cumple que todas las células están en ciclo y no hay pérdida celular, el número de células se duplica para cada valor del tiempo de ciclo, Tc:

$$2N_o = N_o\, e^{kTc} \; ; \qquad K = \frac{Ln\ 2}{T_c}$$

Consideremos ahora una población celular en la cual, si bien no existe pérdida celular, no todas las células están en ciclo, existiendo cierta fracción de ellas en fase $G_o$ o quiescentes. Este concepto puede ser fácilmente entendido si pensamos que existe un valor de $T_c$ mínimo necesario para que una célula complete un ciclo divisorio, pero no hay límite para el valor del $T_c$ máximo. Este hecho se debe fundamentalmente a la indefinición del tiempo de tránsito entre $G_o \rightarrow G_1 \rightarrow S$. La representación de la Fig.2 esquematiza este fenómeno al asignar caminos de longitud variable para el proceso de entrada de células en $G_o$ en el ciclo divisorio.




A




B

A.- ESQUEMA DEL CICLO CELULAR.

B.- IDEALIZACION DE LA DISTRIBUCION DE FRECUENCIAS DEL TIEMPO DE CICLO (Tc).

FIG. - 2

En la situación esquematizada para cualquier valor de $t=T_c$, el número de células existentes en la población no se duplica, esto és:

$$N = aN_o \neq 2N_o$$

Donde a es un número cualquiera comprendido entre 1 y 2.

Sustituyendo estos valores en la ecuación general de proliferación (I):

$$aN_o = N_o \cdot e^{KTc} \; ; \; K = \frac{Lna}{Tc} \qquad (II)$$

Por otra parte, si $T_D$ es el tiempo necesario para que el número de elementos celulares se duplique:

$$2N_o = N_o \cdot e^{KTD} \; ; \; K = \frac{Ln\ 2}{T_D} \qquad (III)$$

Combinando las ecuaciones II y III resulta:

$$T_D = \frac{Ln\ 2}{Ln\ a} Tc$$

Es posible definir, ahora, la fracción de crecimiento como la relación:

$$Fc = \frac{\text{Células en ciclo divisorio}}{\text{Total de células}} = \frac{aN_o - N_o}{N_o} = a-1$$

## 1.6.4.3. Cinética celular de la línea MCF-7

El patron de crecimiento de las células MCF-7 en cultivo en monocapa se adjunta a una curva sigmoidal típica con tres fases claramente definidas: fase "lag" o de retraso, fase de crecimiento exponencial y fase de "plateau" o meseta. Efectivamente, es posible poner de manifiesto, tras la siembra (Fig.3), cuando los elementos celulares son escasos y la densidad de la siembra (nº células / superficie) es baja, la existencia de un índice de replicación también bajo, que se traduce en tiempos de duplicación tremendamente largos (aproximadamente 24 días) (307). La duración de esta primera fase es muy variable y parece estar determinada por el estado de crecimiento de las células utilizadas para la siembra inicial (278).

La utilización de células separadas de cultivos con gran densidad de elementos y que, por tanto, se encuentran en fase de "plateau", es decir, con bajo índice proliferativo, o lo que es igual, con baja producción de elementos celulares en el ciclo divisorio respecto al número total de componentes dela población, influye junto

# CRECIMIENTO DE MCF - 7.

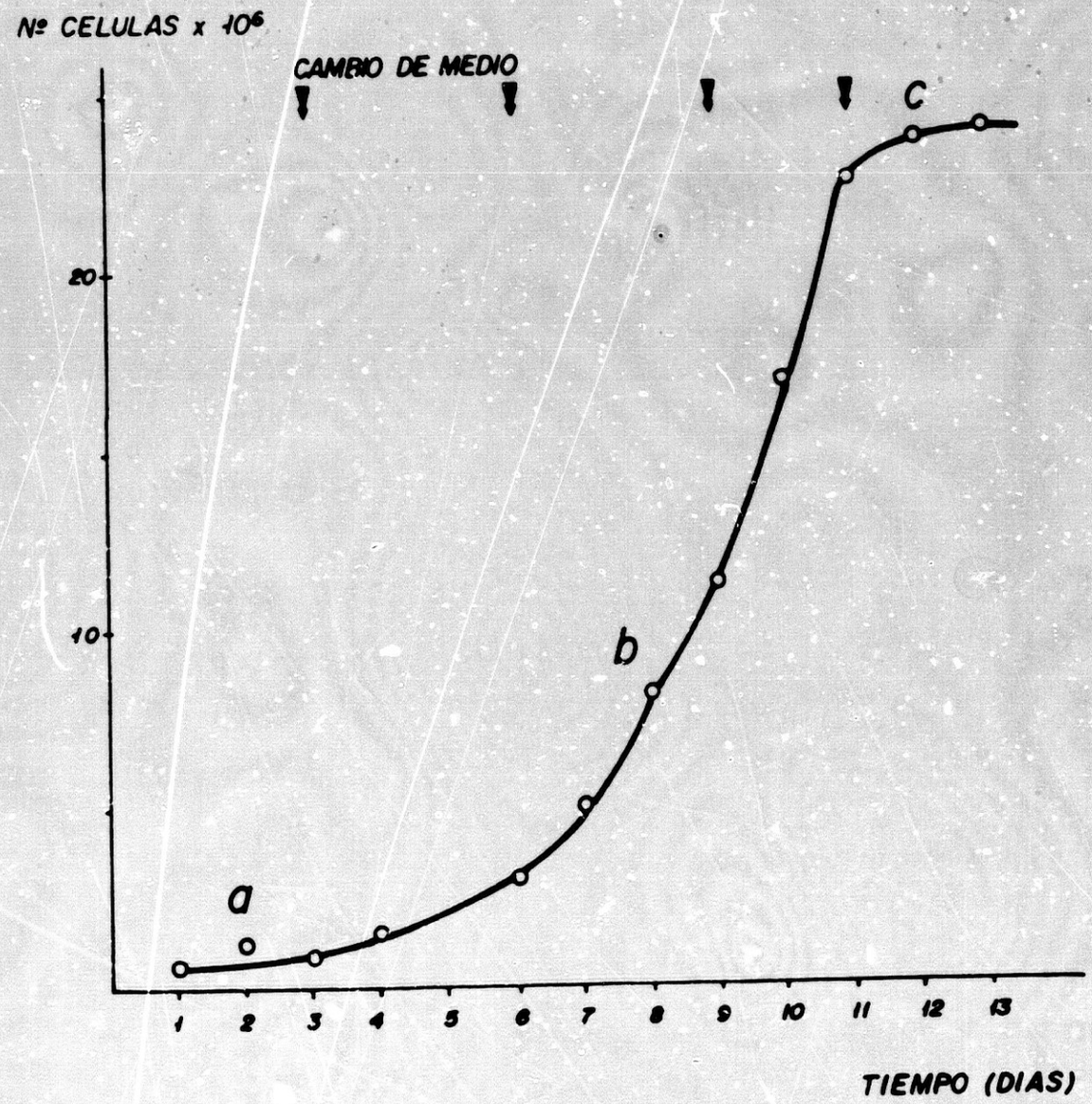



FIG. - 3

con otros factores de tipo metabólico y de autorregulación en la velocidad de multiplicación del cultivo. Por otro lado, si bien la baja densidad inicial es un factor negativo, se sabe que para las células MCF-7, aún en estas condiciones, existe un fenómeno de secreción activa de determinados péptidos que actuan estimulando el crecimiento general de la población. Su relación con la hormono-receptividad está aún por esclarecer (304).

Tras la fase "lag" y pasando un tiempo variable dependiente de factores microambientales y metodológicos, se observa un rápido incremento de la proliferación celular, lo cual motiva que el crecimiento celular se ajuste a una nueva fase que se denomina fase exponencial. La multiplicación de los elementos en el cultivo es tan rápida que en el examen microscópico puede observarse la disminución paulatina de los espacios libres intercelulares. La fase de crecimiento exponencial se utiliza, habitualmente, para realizar el cálculo del tiempo de duplicación ($T_D$) de esta línea celular. Sobre este parámetro se admite una relativa variabilidad determinada por las condiciones del cultivo.

Aunque se realicen cambios regulares de medio de cultivo celular con el consiguiente aporte de nuevos materiales nutrientes, lo cierto es que los elementos celulares llegan a un estado de preconfluencia, situación en la que se produce una pérdida de elementos por muerte celular y despegue de los elementos no viables del soporte sólido. Esto ocasiona que el medio ambiente se llene de detritus y sustancias potencialmente tóxicas para el resto

de las células. Todo ello conlleva a una modificación en el ritmo de crecimiento por disminución del número de elementos celulares la fase activa del ciclo y, por tanto, a un aplanamiento de la curva de crecimiento (fase de meseta).

### 1.6.4.4. Cinética celular de la línea EVSA-T

El patrón de crecimiento de las células EVSA-T, al igual que las MCF-7, en cultivo monocapa, se adapta a una curva sigmoidal típica con una clara definición de las fases: "lag", exponencial y de meseta (Fig. 4). Sobre la zona correspondiente a la fase de crecimiento exponencial es posible deducir el parámetro del tiempo de duplicación.

Por último, la cinética del crecimiento define una fase de plateau de horizontalización de la curva sigmoidal ocasionada por el estado preconfluente de las células y el acúmulo de detritus.

# CRECIMIENTO DE EVSA - T.

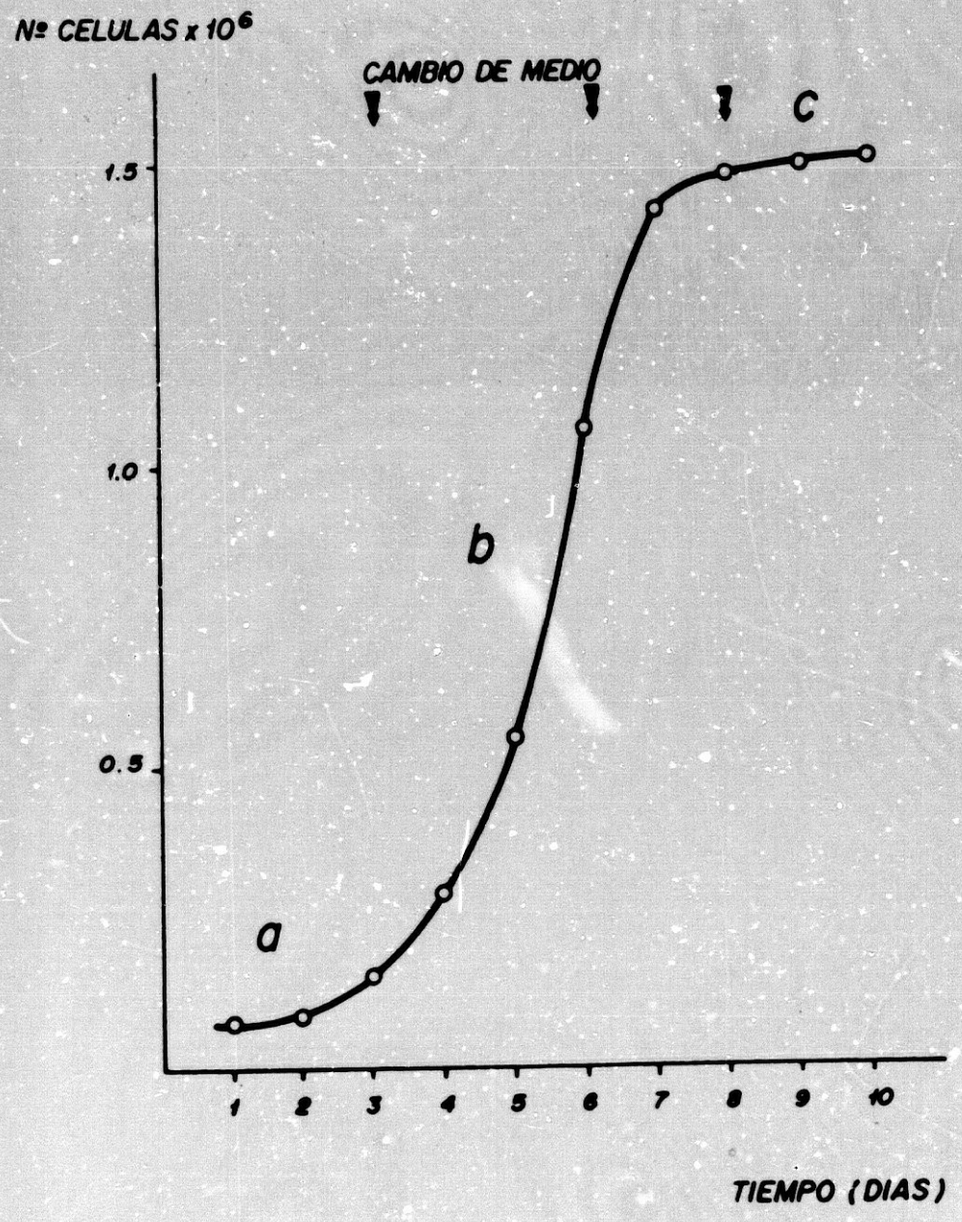



FIG. - 4

## 1.7. ASPECTOS MOLECULARES DEL CRECIMIENTO CELULAR

El crecimiento de un tumor en un organismo vivo representa una ruptura del equilibrio celular. Ciertos acontecimientos son consecuencia de esa disregulación; entre ellos, los cambios observados en la diferenciación celular, la pérdida de la histología normal del tejido y la deformación de los tejidos peritumorales son ejemplos claros de efectos provocados por la transformación neoplásica. Para que un tumor pueda ser considerado como maligno debe invadir el espacio que lo rodea y/o progresar local o distalmente para dar origen a otras localizaciones tumorales secundarias (metástasis). Del comportamiento biológico del tumor "in vivo" se deduce su caracter maligno. Sin embargo es dificil trasladar estos conceptos a las condiciones experimentales definidas para los cultivos celulares.

El término "transfomación" ha sido utilizado para describir la transición entre células no tumorales a células capaces de originar un tumor. Esta transformación puede ser inducida por virus, por el estímulo de ciertos carcinógenos químicos o espontáneamente a través de una serie de sucesos ocurridos al azar (227). Sin embargo, la relación entre transformación "in vitro" y malignidad "in vivo" no es clara. Una célula normal puede transformarse "in vitro" y dar origen a una linea celular derivada de ella que puede, o no, producir un tumor cuando se inocula en un huésped. El tumor producido puede ser, aunque no necesariamente, maligno. Por otra parte, células obtenidas

de un tumor maligno y puestas en cultivo, pueden ser "transformadas" in vitro dando origen a una población celular de más rápida cinética de proliferación, con dependencia disminuida respecto al anclaje, con modificaciones en su grado de aneuploidia, etc.

Como quiera que la malignidad no puede ser demostrada "in vitro" se utilizan, para describirla, determinadas aproximaciones que se relacionan a continuación:

i) Origen de la línea celular: Se incluyen aquí las células aisladas a partir de tumores malignos y también aquellas otras que han sido "transformadas" "in vitro" por virus o por agentes químicos siempre que, estas últimas, sean potencialmente capaces de dar origen a un tumor en el animal de experimentación. Desafortunadamente algunas características de las células transformadas "in vitro" no se encuentran en células derivadas de los tumores espontáneos; por ello se aceptan como criterios diferenciadores aquellas propiedades que, generalmente, exhiben las células tumorales "in vitro". Algunas de ellas aparecen también en cultivos de elementos no neoplásicos (y no todas, simultáneamente, coinciden en las líneas tumorales). Estos hechos han dado origen a la idea de que la malignidad no es resultado del desarrollo de características celulares nuevas, sino más bien de la inadecuada expresión de propiedades celulares, normales (109).

ii) Crecimiento independiente del anclaje: Muchas de las propiedades asociadas con la transformación neoplásica "in vitro" son el resultado de cambios en la superficie celular. Como consecuencia de estas modificaciones las células adquieren la capacidad de crecer sin necesidad de unión (anclaje) con el soporte y pueden cultivarse en medios líquidos sometidos a agitación continua o en medios semisólidos (133).

iii) Limitación del crecimiento a causa de la densidad celular. Inhibición por contacto: Cuando los cultivos en monocapa de células no tumorales se aproximan a la confluencia, tiene lugar una disminución progresiva del ritmo de proliferación celular hasta que el crecimiento cesa. En células transformadas o neoplásicas, la pérdida de las interacciones célula-célula da origen a un patrón de multiplicación celular desorganizado que puede ser puesto de manifiesto por análisis microscópico del cultivo o por procedimientos bioquímicos. Estos métodos demuestran que la población celular continua creciendo a pesar de cubrir totalmente la monocapa (110). En estas condiciones, las células pueden dar origen a agregados multicelulares tridimensionales (colonias o esferoides) (1).

iiii) Anormalidades cromosómicas: Tanto en células neoplásicas como en células transformadas es posible observar modificaciones del número de cromosomas así como incremento de las aberraciones cromosómicas (19).

iiiii) Composición de los medios de cultivo. Efecto de la concentración de suero: Las células "transformadas" y las neoplásicas requieren menos proporción de suero en el medio de cultivo que la que necesitan las células normales de las que proceden (90). Una posible explicación a la escasa dependencia celular respecto a la concentración de suero viene dada por la demostración de que las células tumorales pueden secretar sus propios factores de crecimiento (290). Los factores de crecimiento son polipéptidos que estimulan la proliferación a través de su enlace con un receptor específico presente en la membrana celular. Estas sustancias proteicas difieren de las hormonas polipeptídicas no sólo en la respuesta celular que consiguen, sino también en el modo de alcanzar la célula blanco a partir de la célula secretora. Los factores de crecimiento no actuan a la manera endocrina. Presumiblemente ejercen su acción localmente en la misma célula que los sintetiza o en las vecinas a las que alcanza por difusión (activación autocrina o paracrina). Las células no transformadas requieren, imprescindiblemente, de los factores de crecimiento para proliferar en cultivo -generalmente necesitan más de uno-. El suero con el que se suplementan los medios de cultivo aporta estos factores en baja proporción (59,219).

Las células transformadas por retrovirus liberan al medio de cultivo un factor de crecimiento, SGF (Sarcoma growth factor), que puede transmitir a células de mamíferos algunas de las propiedades biológicas anteriormente enumeradas (entre estas propiedades se incluye la promoción del crecimiento independiente del

anclaje, la disminución de las necesidades del suplemento sérico y la pérdida de la inhibición del crecimiento por contacto) (10,79,80,243,292).

Los factores SGF han sido encontrados en el medio de cultivo de fibroblastos de rata transformados por ciertos virus-DNA como el SV-40, polyoma y adenovirus (104,158,159) y se cree que los SGF forman parte del mismo grupo de factores que colectivamente reciben el nombre de TGF (Transforming growth factor) (160,292). Los TGF han podido ser purificados parcialmente a partir de varias líneas celulares tumorales humanas y de tumores sólidos tanto de animales de experimentación (rata, ratón), como de la especie humana (131,198,215,325). Se han aislado también de tejidos no neoplásicos (242,298) y de fluidos biológicos (59,260). De lo anterior resulta claro que los factores de crecimiento están presentes en un amplio espectro de tejidos y que pueden ser liberados por células en cultivo.

Por otra parte, los receptores de membrana para estos factores polipeptídicos están también presentes en una amplia variedad de tipos celulares distintos (124). Dentro del grupo de TGF se distinguen dos entidades moleculares diferentes. La primera de ellas, TGFα, está constituida por una cadena única de 50 aminoácidos cuyo peso molecular se estima en 5'6 Kdalton (198). La secuencia de aminoácidos muestra notables similitudes con lo que define al Epidermal Growth factor (EGF) (68). Como consecuencia de esta analogía, el TGFα se enlaza al mismo receptor de membrana que el EGF (79,291). La presencia de TGFα en

tejidos embrionarios y la ausencia de esta molécula en tejidos adultos no cancerosos es demostrativa de que en las células tumorales se produce la inadecuada síntesis de estos factores por reactivación de genes embrionarios (124).

La especie molecular TGFβ es muy diferente de la TGFα, tanto en su estructura primaria proteína oligomérica constituida por dos monomeros idénticos de 112 aminoácidos cada uno, unidos por enlaces disulfuro y peso molecular de 25 Kdalton. (81,198), como en su actividad biológica. La interacción del TGFβ con la célula se produce en un receptor de membrana distinto del específico para el EGF o el TGFα y, esta proteína, puede actuar tanto estimulando como inhibiendo el crecimiento celular (207,244,297).

El factor de crecimiento EGF fué identificado por Cohen en 1.962 (68) y descrito como un péptido capaz de estimular la apertura de los ojos y la erupción de los dientes en el ratón recién nacido. Su capacidad para estimular el crecimiento de las células en cultivo se reconoció más tarde (51,139). La molécula de EGF madura está constituida por una cadena única de 53 aminoácidos de 6 Kdalton de peso molecular y posee tres enlaces disulfuro intracatenarios (286). Para investigar la presencia y la función del EGF en extractos de tejidos se han desarrollado procedimientos analíticos basados en el radioinmunoensayo (74) y en las técnicas de radiorreceptor (52). El EGF es mitogénico para células mesenquimales y epiteliales en cultivo y su actividad se potencia por la insulina (248,261). Sus analogías estructurales y

funcionales con los TGFα, permiten suponer que el EGF sea la forma adulta del TGFα embrionario (124). No se ha demostrado la presencia de EGF en ningún tumor.

### 1.7.1. Estimulación autocrina y paracrina en el cáncer

La producción autóloga de un factor de crecimiento por una célula que posee receptores para el mismo factor, constituye uno de los mecanismos que permiten explicar el crecimiento infinito y no sometido a control de los procesos tumorales. La investigación de los acontecimientos que se suceden tras el enlace del factor de crecimiento con su receptor de membrana y que conducen a la iniciación de la síntesis del DNA es, sin duda, una de las líneas de interés más actual en biología celular y en biología del cáncer. Nuestros conocimientos actuales pueden resumirse brevemente, en la forma siguiente:

i) El factor de crecimiento, GF, se enlaza al receptor de superficie. En respuesta a este enlace, el receptor puede cambiar su forma alostérica (activación), produciéndose una redistribución en la membrana o una asociación, con otras proteínas. El receptor de EGF, por ejemplo, es una glicoproteína de 170 Kdalton que se localiza en la superficie de la célula y que posee tres dominios; uno extracelular, en el que existe el locus de unión para el péptido, el segundo en la propia membrana celular y el tercero en el citoplasma de la célula. En esta última región se encuentran los sitios de enlace para

el ATP y para los sustratos y se desarrollan los procesos de fosforilación (69).

ii) El receptor "activado" transfiere parte de su energía de activación a cierto número de sustratos intracelulares. Puede fosforilarse a sí mismo (300) o fosforilar otros sustratos (18,71,72,99,103,126,236,257).

iii) Los incrementos en las concentraciones intracelulares de inositol-trifosfatos y de diacilglicerol se siguen de una elevación transitoria de $Ca^{++}$ libre en el citoplasma, de la activación de los enzimas proteinquinasa-C y adenil-ciclasa y de la reorganización del citoesqueleto (46,60,174,203).

iV) La estimulación con GF de células quiestentes conduce a la activación determinados genes (66,96,175). Unas de las más sorprendentes consecuencias de la acción de los GF es la inducción de C-oncogenes (123,127,164).

V) Se ha demostrado la presencia intracelular de proteínas cuya síntesis se induce por los GF y que pueden estar involucradas en la activación pleiotrópica de los genes reguladores del crecimiento (2,5,100,210,220).

## 1,8. IDEAS ACTUALES SOBRE LA ACCION ESTROGENICA

El receptor de estrógenos, RE, es una proteína intracelular que existe en ciertos tejidos y que desempeña un importante papel en la mediación de la acción estrogénica. La concentración del RE es el factor determinante de la sensibilidad celular a estrógenos y antiestrógenos (161). Durante los últimos 20 años se ha llevado a cabo un considerable esfuerzo para dilucidar los mecanismos moleculares a través de los cuales las hormonas esteroideas regulan, tanto la expresión de los genes, como las funciones metabólicas o, en definitiva, el crecimiento celular en los tejidos hormonodependientes. Sin embargo, a pesar de este esfuerzo, la mayor parte de los procesos incluidos en la captación intracelular del estrógeno (238,306) y el enlace de esta molécula con la proteína receptora, así como las interacciones del complejo activado con la cromatina y la cadena de acontecimientos que modula el proceso transcripcional permanecen, hoy día, confusos y controvertidos. Los hallazgos bioquímicos (313) e inmunocitoquímicos (166,234,235) recientes sugieren que la mayor parte del receptor de estrógenos funcional se localiza en el núcleo de la célula y que el enlace de la hormona al receptor se traduce por una asociación más fuerte entre el complejo y los componentes nucleares (128). Si bien no se conoce cual es el aceptor del receptor activado, se cree que determinadas secuencias específicas del DNA (53,70,155,228), las ribonucleoproteínas (177), ciertas proteínas básicas no-histonas (235), la matriz nuclear (16,17) y los complejos entre el DNA y las proteínas ácidicas no-histonas (272) pueden

intervenir como escalones intermediarios de la respuesta a la acción hormonal.

La interpretación actual de la acción hormonal esteroidea se muestra esquemáticamente en la Figura 5. De acuerdo con este modelo (82), el estradiol pasa a través de la célula hasta el núcleo, bien por difusión pasiva o quizás enlazado débilmente a proteínas citoplasmáticas utilizando sitios de unión de baja especificidad, (receptor tipo II) (64). En el núcleo interacciona con el receptor "no ocupado" y como resultado de esa interacción se forma un complejo [RE-$E_2$] activado (dimérico?) (102). Al menos dos formas distintas del complejo activado se enlazan en la cromatina. Una de ellas puede ser extraida con solución salina de ClK 0,4M, mientras que la otra es resistente a este proceso de extracción y puede estar asociada con el DNA activo de la matriz nuclear (128).

## 1.8.1. Síntesis y degradación del receptor

Como consecuencia de la accion del 17-β-$E_2$, las células de los tejidos hormonodependientes incrementan su ritmo proliferativo. No se conocen, a nivel molecular, las etapas intermedias entre la acción y el efecto y, para su explicación, se utilizan tres ideas claramente diferentes (269):

a) La teoría de la acción directa positiva, de acuerdo con la cual el 17-β-$E_2$, por sí mismo, estimularía

# ESQUEMA DE LA ACCION ESTROGENICA EN LA CELULA BLANCO

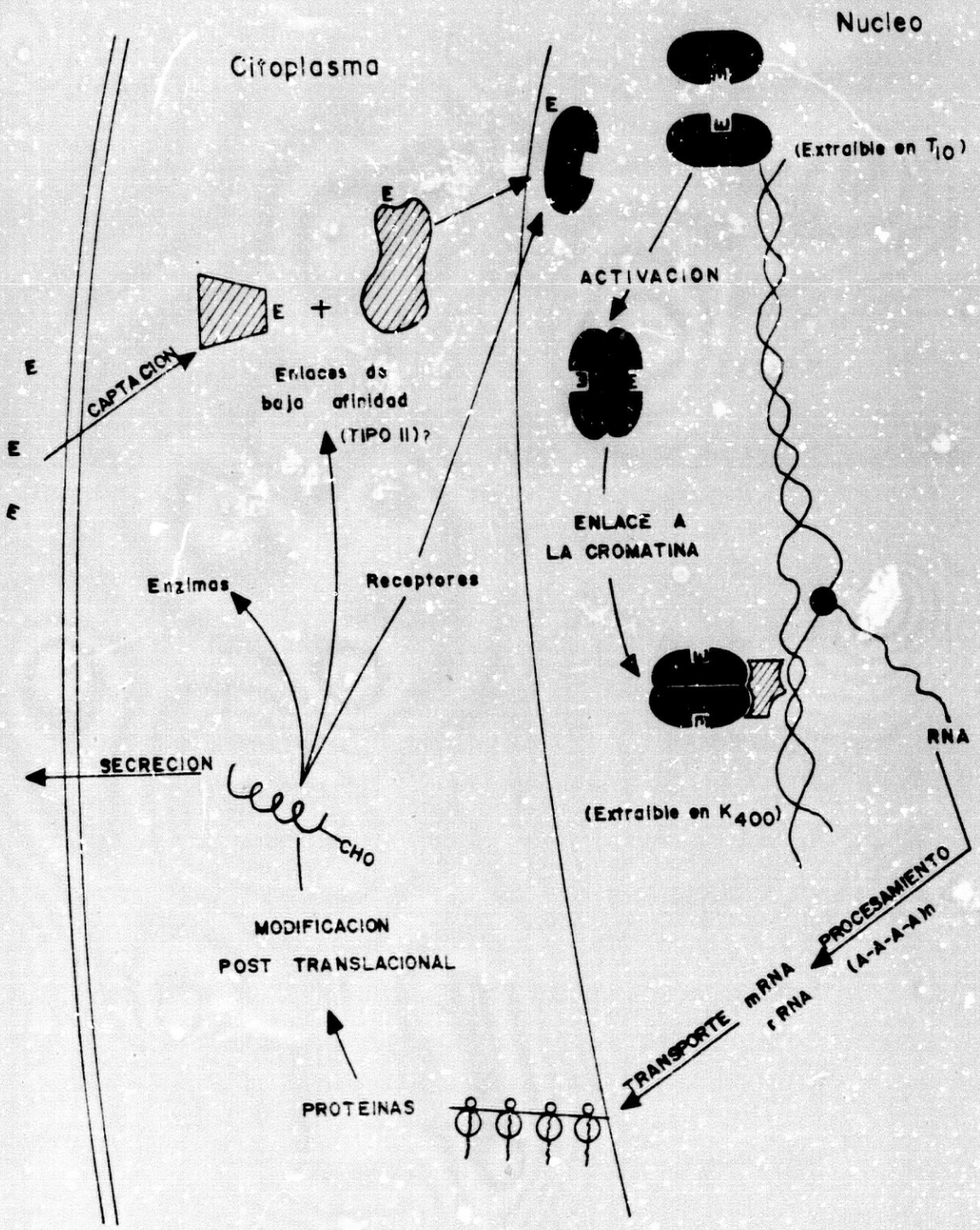



FIG.- 5

la proliferación celular en los tejidos "blanco" de la acción estrogénica.

b) La hipótesis indirecta positiva mediante la cual se sugiere que el estradiol desencadena la síntesis y/o la liberación de un factor de crecimiento (estromedina) que sería el iniciador del proceso proliferativo o, tal vez, de un factor facilitante (activador del plasminógeno), que hiciera posible la invasión de los espacios adyacentes por nuevas células.

c) La teoría indirecta negativa que supone que el 17β$E_2$: 1) bloquea la síntesis y/o la liberación de un factor inhibidor específico secretado por las células sensibles a la acción estrogénica, 2) neutraliza la acción de cierto inhibidor existente en el plasma.

Las hipótesis anteriores coinciden, sin embargo, en que el receptor de estrógenos es imprescindible para el desarrollo de la acción hormonal. Por tanto, todos aquellos cambios de la bioquímica celular que modifiquen o alteren el ritmo de síntesis, o degradación, de esta proteína, pueden afectar de manera notable la respuesta de la célula al estímulo. Las técnicas de ultracentrifugación y la utilización de aminoácidos marcados con isótopos pesados $^{2}H_{2}$, $^{15}N_{7}$, $^{13}C_{6}$, han permitido estudiar, sobre MCF-7, la velocidad de síntesis y el turnover del receptor de estrógenos (256,92). De esta forma se ha podido averiguar que la proteína se sintetiza muy rápidamente (0,3-0,5 pmol/mg.×DNA×h) (92) y que su vida media biológica es corta (≃ 4h. tanto para la fracción extraible del receptor citosólico como para el receptor nuclear)

(92). Se conoce también que la presencia del estradiol en el medio de cultivo celular acelera los procesos metabólicos que afectan a la síntesis y degradación del receptor y, como consecuencia, acortan significativamente su vida media biológica. Estos hallazgos han permitido postular que las células hormonosensibles están dotadas de cierto mecanismo mediante el cual los niveles celulares de receptor de estrógenos pueden ser rápida y precisamente regulados (92).

### 1,8,2. Efecto del crecimiento celular sobre los niveles de receptores de estrógenos

Numerosos investigadores han demostrado que la concentración del receptor en los tumores de mama resulta dependiente de ciertos factores entre los que se incluye la edad (199,251,263), la historia terapéutica de la paciente y la celularidad del tumor (200,309). Cuando las investigaciones se llevan a cabo utilizando modelos tumorales (células MCF-7 en cultivo, por ejemplo) los niveles de receptor estrogénico se modifican en relación con determinadas condiciones del cultivo entre las que se han citado la exposición de las células a sustancias de acción hormonal (prolactina (258), insulina (48) y estrógenos (143)), el laboratorio de origen de las células (146), y la fase de crecimiento en que se encuentre el cultivo (41,58). Los resultados obtenidos demuestran la existencia de una relación inversa entre la actividad proliferativa y la concentración del receptor (150) y, por otra parte, han puesto de manifiesto que en células sincronizadas el contenido en RE depende de la fase del

ciclo celular en la que se encuentre, predominantemente, el cultivo (150).

### 1.8.3. Respuesta celular a la acción estrogénica

#### 1.8.3.1. Activación del Complejo Receptor - Estrógeno (RE)

El modelo de acción hormonal en doble escalón de Jensen (153) supone que el enlace de unión del estradiol a la estrofilina, implica la conversión de ésta a una forma activa capaz de traslocarse al núcleo, en cuyo interior el complejo receptor estrógeno (R.E.) activado se asocia a la cromatina y, de alguna manera, desencadena la síntesis de diversos tipos de RNA que son característicos de los tejidos hormonodependientes. Con este proceso se comienza una compleja serie de reacciones cuyo resultado final es la acción trófica tisular. Este modelo mantiene que las moléculas del RE no enlazadas a la hormona se encuentran "exclusivamente" en el compartimento citoplasmático y que pasan al interior del núcleo cuando, en presencia de estradiol, se produce el proceso de activación y translocación de la estrofilina. De ello se deduce que la formación del receptor nuclear es absolutamente dependiente de la presencia de ambos: estradiol y estrofilina. Este mecanismo, parece ser clave en la acción hormonal de los esteroides..

### 1,8,3,2. Interacción del Complejo RE con el DNA

La hipótesis del complejo de unión entre la cromatina nuclear y el RE está sostenida por dos experiencias básicas:

1) La acción de las deoxirribonucleasas sobre los núcleos de las células uterinas impide la formación del complejo nuclear estradiol-receptor (8,211).

2) El estradiol enlazado en los núcleos de las células del útero puede ser liberado mediante tratamiento con deoxirribonucleasa (135).

En general, el enlace entre el RE y el DNA no parece depender del origen del DNA (293) aunque se ha sugerido que la forma molecular 4S del R.E. muestra un enlace preferencial con el DNA extraído de la rata comparado con el DNA procedente de otros organismos (323). Yamamoto y Alberts han demostrado que el enlace nuclear del receptor 4S se asocia con su conversión a una forma 5S por adquisición de una subunidad adicional (324).

Por otra parte, el RE del citosol de útero de rata se enlaza en mayor extensión a la cromatina uterina que a la extraída del hígado, bazo, pulmón o riñón. A altas concentraciones de R.E. el enlace es saturable (273). Cuando los estudios del enlace se realizan en presencia de cromatina libre de histonas tanto la especificidad como el número de "sitios" de enlace se conservan (273). Por tanto, las histonas no forman parte del aceptor para el

R.E. y no existen evidencias de que proteínas no-histonas de la cromatina puedan constituir componentes primarios de los sitios aceptores para el receptor nuclear. Estas moléculas protéicas (no histonas) parecen ser reguladoras de ciertas funciones genéticas específicas (274) y los estrógenos, si bien no inducen cambios cualitativos ni cuantitativos en las histonas, incrementan los niveles de proteínas cromosómicas no-histonas durante los estadios iniciales de la diferenciación celular, para decrecer durante los estadios finales de la maduración (67).

### 1.8.3.3. Efecto del Estradiol sobre la Síntesis del RNA

La estimulación de la síntesis de RNA en el núcleo de células uterinas puede observarse a partir de los diez minutos de la inyección intraperitoneal de estradiol (202). El análisis del RNA sintetizado puede efectuarse utilizando precursores marcados y separando por ultracentrifugación en gradiente de densidad el RNA nativo o desnaturalizado para evitar estados de agregación (169). El alto peso molecular de las especies RNA identificadas y su heterogeneidad permite postular que las moléculas marcadas corresponden, efectivamente, a RNA nuclear. Este precoz incremento en la síntesis del RNA resulta bloqueado por la actinomicina D, pero no por la cicloheximidina, lo que sugiere que la continuada síntesis de proteínas no es necesaria para este efecto inicial del estrógeno (202).

Además de la estimulación precoz de RNA nuclear, escasas horas después de la administración del estrógeno, la síntesis de ribosomas 45S, 32S, 28S, 18S y 5S muestra también un incremento (168,185) y se induce la síntesis de mRNA (168). Por otra parte, se ha demostrado también que los estrógenos provocan la síntesis de nuevas secuencias de RNA que no es posible identificar en células no estimuladas (62).

Las experiencias de Gorski (119) son demostrativas de la inducción por el 17βE$_2$, del enzima Polimerasa I dependiente del Mg en células del útero de rata inmadura. Esta estimulación se sigue del incremento en los niveles de Polimerasa II a las 12-24 horas de la administración de estradiol, estimulación que ha resultado ser bifásica (119) con un primer pico a los 30 minutos de la inyección de 17βE$_2$ y un segundo incremento de actividad cuando el tiempo entre inyección y detección sobrepasa las 12 horas. En contraste, el aumento de la Polimerasa I es monofásico y ocurre entre los 30-60 minutos. Hallazgos similares han sido encontrados por otros autores utilizando como tejido blando de la acción estrogénica útero de conejo (37) y oviducto de pollo (73).

### 1.8.3.4. Efecto del Estradiol sobre la Síntesis de Proteínas Específicas

Las hormonas sexuales esteroideas influyen sobre el crecimiento y la diferenciación de sus respectivos órganos blancos a través, probablemente, de la modulación ejercida

sobre el metabolismo de algunos enzimas y de distintas proteínas estructurales (111,230).

Notides y Gorski han demostrado, en efecto, por electroforesis en gel, la presencia de una banda de proteína especifica, denominada "proteína inducida" (P.I.), en el citosol de útero de rata y cuya síntesis esta mediada por la acción del estrógeno (218). En el curso de experiencias realizadas tanto "in vivo" como "in vitro" se ha puesto de manifiesto, además, que la inducción de la síntesis ocurre a los 30-40 minutos de la administración de la hormona (162,268), pudiendo ser bloqueada por la cicloheximina (218). La actinomicina D bloquea la inducción de la síntesis, incluso a concentraciones del inhibidor que sólo tienen efectos mínimos sobre el resto de los procesos de síntesis proteica (78). La proteína inducida purificada se ha demostrado que es un polipéptido de peso molecular aproximado a 45.000 dalton (165). No se conoce cual es la función especifica de su molécula aunque existen fuertes evidencias que señalan que la inducción estrogénica de la proteína está mediada por la síntesis de mRNA y que la velocidad de acumulación de este mensajero es el factor limitante del proceso de activación (56). De ello puede pensarse que las hormonas esteroideas actuan, predominantemente, a nivel transcripcional.

Particular interés presenta el hecho de que el receptor de progesterona, en las células uterinas, sufre un notable incremento que se inicia a las 4-12 horas de la administración de estradiol, y que tras cuatro días de

tratamiento hormonal, los niveles de receptor de progesterona (RPg) cuantificados en citosol uterino, llegan a ser 10 veces superiores a los que se encuentran en animales castrados (106). Cuando la administración de estrógenos se interrumpe, los niveles de RPg disminuyen lentamente con una vida media del orden de 3 días (106).

La identificación del receptor de estrógenos (RE) citoplasmático en cáncer de mama humano (151,152) y la posterior demostración en este mismo tumor de la presencia del RPg (141) ha llevado a proponer que este último receptor, cuya síntesis está controlada por los estrógenos, pueda servir como un marcador de la acción estrogénica en cáncer de mama (145). Así, la presencia de RPg en un tumor podría indicar que la secuencia completa que incluye el enlace de 17$\beta E_2$ al receptor citoplasmático, el movimiento del complejo 17$\beta E_2$-RE hasta el núcleo, su enlace a la cromatina y la estimulación por el mismo de determinados productos finales es un camino metabólico cuya integridad puede suponerse para el tumor en cuestión (143).

En la línea celular establecida MCF-7 (270), el tratamiento durante 4 ó 5 días con 17$\beta E_2$ (0,0001 a 100 nM) ocasiona un incremento comprendido entre 3 y 6 veces respecto a los niveles basales de RPg. La respuesta del RPg al estradiol es dosis dependiente (143) y puede ser suprimida por la presencia en el medio de cultivo de antiestrógenos. Resultados similares han sido descritos por Allegra y col (6) utilizando la línea celular ZR-75-1

(98), demostrando además que concentraciones no fisiológicas de $E_2$ ($10^{-6}$M a $10^{-11}$M) no inducen la síntesis del receptor de progesterona.

En la actualidad no existe ningún test que pueda predecir, de manera exacta, la eficacia de la terapia hormonal en cáncer de mama. La identificación de proteínas inducidas por acción de los estrógenos -peroxidasa (193), glicoproteína de 46.000 dalton (315), fosfoproteín-fosfatasa (194), IP (197), multiples proteínas inducidas por los estrógenos en la línea celular MCF-7 (194,314)- y la posibilidad de que tales sustancias puedan servir como marcadores de la acción estrogénica o indicadores de la hormonodependencia tumoral de mama, confiere a estas investigaciones extraordinario interés. La complejidad de la respuesta a la acción estrogénica en los modelos de tejidos o células blanco utilizadas y el hecho de que sean múltiples las proteínas cuya síntesis se induce por el estradiol, ha hecho pensar (194) que el análisis o la utilización de una sola de ellas como criterio de la hormono-dependencia puede resultar engañoso. Por otra parte, el que alguna de estas proteínas inducidas en la línea celular, bajo la acción de los estrógenos, estimulen la propia proliferación celular en el medio de cultivo (304), sugiere una función biológica para la IP cuyas implicaciones están aún por conocer.

### 1.8.3.5. La localización intracelular del receptor

El modelo original que describe el mecanismo de acción de los estrógenos fué introducido en la década de 1.960 (122,281,319) y se encuentra, aún hoy día, ampliamente aceptado. Brevemente descrito el modelo supone que, en ausencia de estradiol, el receptor se localiza en el citoplasma de las células "blanco" (122,153,281,319,320). Cuando la hormona entra en la célula se produce el enlace de ésta con el receptor y mediante un proceso dependiente de la temperatura, el complejo receptor -estrógeno pasa al núcleo donde se inician los efectos dependientes y característicos de la acción hormonal. Gran número de experimentos son compatibles con el modelo "en dos etapas"explicativo de los mecanismos de acción de los esteroides (45). Sin embargo, ciertos trabajos realizados en los últimos diez años, ponen en duda la generalidad de este proceso y se ha demostrado que el receptor citoplasmático puede traslocarse al núcleo en ausencia de la hormona esteroidea (259).

Williams y Gorski (319,320) fueron los primeros en plantear la hipótesis de que la distribución intracelular de la proteína receptora podría ser estudiada en base a los principios cinéticos del equilibrio. Su análisis sugiere que el receptor existe en dos estados que exhiben propiedades distintas. Uno de ellos incluye aquellas proteínas receptoras que existen libres o están débilmente ligadas a componentes nucleares, de forma que pueden ser fácilmente extraídas con la fracción citosólica. El

segundo estado contempla las proteínas RE que se encuentran fuertemente enlazadas con las estructuras nucleares o poseen la propiedad de poder asociarse en circustancias particulares. En ausencia de estradiol es predominante el receptor distribuido de acuerdo con el primer estado, mientras que la formación del complejo receptor-hormona desplaza el equilibrio de la distribución hacia el segundo estado. Esta hipótesis postula que, en ambas formas, el receptor libre y el receptor unido al estradiol, se encuentran en equilibrio -de acuerdo con su coeficiente de reparto- entre el citoplasma y el núcleo. En la regulación de este estado de equilibrio influye de manera fundamental la concentración de estrógenos (ligando) presente.

Por otra parte, estudios realizados utilizando técnicas autorradiográficas han permitido poner de manifiesto que, tanto en ausencia de estradiol como en presencia de la hormona, a la temperatura de 0°C, existe un estado de equilibrio reversible para el complejo receptor - hormona distribuido entre el núcleo y el citoplasma de la célula blanco, de forma que la cantidad de complejo existente en el núcleo es un simple reflejo de la magnitud del compartimento acuoso al que el RE tiene acceso por difusión. De acuerdo con esta hipótesis, la localización nuclear del receptor puede ocurrir en estado de no estimulación con independencia del enlace nuclear del RE a la cromatina. Si la hipótesis de Martín y Sheridan es correcta, la localización predominante del receptor estrogénico, tanto libre como enlazado al estrógeno, es nuclear (253).

En ausencia de hormona no hay activación del receptor y en presencia de 17βE₂, a la temperatura de 0°C, la velocidad de transformación o activación del complejo RE nuclear es baja; por ello el reparto de RE entre citoplasma y núcleo puede modifificarse cuando se altera el compartimento acuoso (por ejemplo, durante el proceso de homogeneización). A la temperatura de 37°C el complejo RE está fuertemente asociado con el núcleo o posee la capacidad de enlazarse a la cromatina por inactivación de algún factor inhibidor (253). Esta teoría rompe con el modelo tradicional en "dos etapas" propuesto para el mecanismo de acción de los esteroides, puesto que el hallazgo de RE en alta concentración en el citosol de los tejidos blanco puede ser un artefacto debido simplemente al procedimiento de obtención del citosol. La confirmación de esta hipótesis, utilizando procedimientos bioquímicos, para obtener fracciones subcelulares de alta pureza (313) o mediante el empleo de anticuerpos monoclonales frente a la estrofilina (160) ha cuestionado fuertemente el modelo de Jensen (153) para explicar los mecanismos de acción/respuesta de las hormonas estrogénicas sobre los tejidos blanco y ha abierto una interesante controversia científica (283).

## 1.9. LA FORMA Y CITOESQUELETO DE LAS CELULAS DE CANCER DE MAMA HUMANO

La "transformación" celular "in vitro" se acompaña, a menudo, por alteraciones de la morfología que pueden directa o indirectamente relacionarse con el cáncer (39). Hay evidenciasque sugieren que algunas de las propiedades

de las células transformadas pueden estar condicionadas por alteraciones citoplasmáticas que afectan a la delicada red de microtúbulos y microfilamentos que colectivamente reciben el nombre de citoesqueleto (12,40,170,229). El citoesqueleto juega un papel fundamental en la definición del contorno y la forma de la célula (118,229), en la motilidad celular (7,119), en el crecimiento independiente del anclaje (231) y en la modulación de las proteínas celulares de superficie (13,214). En el intento de responder a la pregunta de la posible vinculación del citoesqueleto celular con el potencial metastásico del tumor o con la transformación maligna, Brinkley y col (39) han estudiado 13 líneas celulares tumorales mamarias establecidas, procedentes todas ellas de carcinoma metastásico de mama, y han demostrado que las células "in vitro" pueden ofrecer una amplia variedad de formas con patrones diferentes de expresión del citoesqueleto. Estos hallazgos han permitido concluir que la apariencia óptica de los microfilamentos y de los microtúbulos es una característica del fenotipo celular que no ayuda a la diferenciación del grado de agresividad del tumor.

Por otra parte, cuando se analiza el efecto del estradiol sobre líneas celulares tumorales dotadas del sistema receptor estrogénico, además de los efectos mitógenos de la molécula sobre las células, se ha podido demostrar que el 17$\beta E_2$ induce modificaciones progresivas de la forma celular. Estas modificaciones afectan a la longitud y a la densidad de los microvilli (302) y al aspecto de la célula, que cambia su morfología para convertirse en una célula "secretora" capaz de liberar al medio de cultivo diversas sustancias proteicas entre las

que se encuentra una glicoproteína de peso molecular 52 Kdalton (315). Estos efectos del estradiol han sido observados también en otras líneas receptor estrogénico positivo pero no en células carentes del sistema receptor (302).

La existencia de una relación cierta entre productos de oncogenes y factores de crecimiento (310) o receptores para esos factores (89) que pueda ser responsable de la estimulación autocrina del crecimiento celular han conducido al grupo de Rochefort (303) a investigar los efectos de la glicoproteína de 52 Kdalton sobre el modelo experimental definido por la línea MCF-7 cultivada en monocapa. La demostración de la acción mitógena de esta proteína se apoya en los siguientes hechos: 1) En respuesta a la estimulación estrogénica , los niveles de la glicoproteína 52 Kdalton en el medio de cultivo se elevan con anterioridad a la objetivación del incremento del número de células. 2) La proteína descrita no se segrega cuando las células son tratadas con antiestrógenos o progestágenos. 3) Cuando se utilizan como sistema experimental clonos celulares de MCF-7 resistentes a la acción de los antiestrógenos, el tamoxifeno induce la síntesis de esta proteína pero no la de otras proteínas estrógeno - inducidas. 4) El medio condicionado de células tratadas con 17$\beta E_2$ estimula el crecimiento de MCF-7 en medios privados de estradiol. 5) La glicoproteína de 52 Kdalton aislada y purificada ejerce sobre la población celular MCF-7 un efecto de estimulación del crecimiento y modifica la superficie celular induciendo la formación de microv'lli de manera análoga a lo que sucede tras el tratamiento del cultivo con 17$\beta E_2$. Los efectos mitógenos

producidos por la glicoproteína de 52 Kdalton, que anteceden a los que produce el estradiol son indicativos de que la citada proteína es un mitógeno autocrino para las células MCF-7 y sostienen la hipótesis de que el 17βE estimula el crecimiento de los tumores mamarios hormonodependientes mediante la secrecion de proteínas que actúan de manera autocrina o paracrina como factores de crecimiento (303).

### 1.9.1. Relación entre antígeno polipeptídico tisular y citoesqueleto

A partir de datos preliminares que sugieren, de manera indirecta, la existencia de cierta relación entre el antígeno polipeptídico tisular y las proteínas del citoesqueleto, Weber y col (311) han demostrado, utilizando microscopía de fluorescencia, que las líneas celulares epiteliales Hela, MCF-7 y A-431, son reconocidas por anticuerpos anti-TPA, mientras que el enlace del anticuerpo no ocurre sobre células de origen no epitelial. Los patrones de fijación positiva coinciden con los filamentos intermediarios tipo queratina y concretamente, los anticuerpos anti-TPA se fijan sobre las queratinas 8, 18 y 19. El proceso inverso es también cierto: Anticuerpos anti-queratinas reaccionan positivamente con el antígeno TPA. Este hallazgo permite interpretar los altos niveles de TPA circulante en enfermos portadores de cáncer como derivados de la liberación o solubilización de ciertos fragmentos de este particular subgrupo de queratinas.

## 1,10. HIPOTESIS DE TRABAJO

El antígeno polipeptídico tisular, constituyente del citoesqueleto de la célula epitelial de cáncer de mama, puede responder, modificando su ritmo de síntesis, secreción o liberación, a las acciones hormonales que ejercen tanto estrógenos como antiestrógenos. Los niveles séricos de TPA y la evolución de los mismos en enfermas de cáncer de mama diseminado sometidas a tratamiento pueden, por ello, predecir la hormono-respuesta del tumor y ofrecer una aproximación acerca de su carácter dependiente o independiente de la acción hormonal.

## 1,11. OBJETIVOS

La terapéutica endocrina juega, hoy día, un papel fundamental en las enfermas afectas de cáncer de mama. La supresión -quirúrgica o radiológica- de las fuentes corporales de estrógenos y el uso de compuestos de acción antiestrogénica constituyen los pilares básicos sobre los que asienta el tratamiento. Objetivos preferentes de éste son, en casos avanzados, la consecución de elevados índices de respuesta o remisión tumoral y, en situaciones de enfermedad subclínica, el control de la enfermedad a largo plazo. Como la fracción de enfermas tributaria de una u otra forma de tratamiento dista mucho del 100% de los casos de cáncer mamario, un tema fundamental en la investigación oncológica general ha sido y continua siendo en la actualidad la búsqueda y hallazgo de criterios de predicción de respuesta positiva a la manipulación

hormonal. Hasta 1.965 se utilizó, con este propósito, el Discriminante de Bulbrook-Hayward (44). La introducción posterior - por Jensen (153) y Mc Guire (199) entre otros - de los métodos de identificación y medida de receptores de estrógenos (RE) y progesterona (RP) en el homogeneizado de cáncer de mama humano y la demostración de respuesta positiva en un determinado número de casos RE (+) han contribuido a dibujar un procedimiento de selección de pacientes para tratamiento hormonal racional y riguroso.

A pesar de su generalización, la utilidad del procedimiento descrito se resiente debido a la existencia de dos órdenes distintos de problemas: a) el fenotipo RE(+) se presenta sólo en una cierta fracción de cánceres (≈ 60%); b) la correspondencia o relación binomial RE(+) / Respuesta Favorable no alcanza el 100% de los casos. La necesidad de encontrar elementos de predicción más segura y fiable es, por ello, imperiosa. Se conoce, en este sentido, que los estrógenos modulan el metabolismo intracelular de diferentes proteínas - enzimáticas y/o estructurales (entre las cuales se encuentran las propias moleculas RE/RP) - alguna de las cuales, si resulta secretada al medio extracelular y alcanza en éste una concentración mensurable, podría servir como "marcador" de la acción estrogénica y, en consecuencia, como elemento definidor de la hormonodependencia tumoral. A este modelo de comportamiento parece ajustarse el Antígeno Polipeptídico Tisular (TPA) que, fácilmente identificable en el suero de pacientes neoplásicos, parece específicamente relacionado con la actividad proliferativa de tumores de origen epitelial.

A la vista de todo lo indicado, los objetivos concretos que hemos pretendido alcanzar en el curso del presente trabajo de investigación son los siguientes:

1.11.1.

Demostración de la presencia o no del Antígeno Polipeptídico Tisular en el medio de cultivo de dos líneas celulares experimentales de cáncer de mama (MCF-7 y EVSA-T) y determinación de la relación existente, si la hubiere, entre su concentración y el ritmo proliferativo de una y otra población celular.

1.11.2.

Análisis de los cambios producidos en el medio -en términos de concentración de TPA e índice de crecimiento de la población celular respectiva- en respuesta a la influencia de hormonas esteroideas (17-β-$E_2$) o preparados de acción antiestrogénica (TAM/OH-TAM) puestos en el medio en variables grados de concentración.

1.11.3.

Estudio de la cinética de secreción del TPA en células MCF-7 sincronizadas y establecimiento de los niveles de relación oportunos entre este proceso, la incorporación de

Timidina-$H^3$ por los elementos celulares de la población de referencia y la densidad celular del cultivo.

**1.11.4.**

Dependencia entre muerte celular y liberación de antígeno polipeptídico tisular al medio de cultivo de la línea celular MCF-7. (Ensayo de Quimiosensibilidad frente a Adriamicina (ADM), 5-Fluoruracilo (5-FU), Vincristina (VCR) y Methotrexate (MTX)).

# MATERIAL Y METODOS

# II. MATERIAL Y METODOS

## 2.1. INSTRUMENTACION

### 2.1.1. Estufa para Cultivos Celulares

Se ha utilizado un incubador ASSAB T-304, termostatizado con regulador de dióxido de carbono. Las experiencias de cultivo se llevaron a cabo a la temperatura de 37°C, en aire con 5% de $CO_2$ y atmósfera saturada de humedad. El control tanto de temperatura como de gases se realiza automáticamente mediante dispositivos electrónicos. La saturación de vapor de agua se logra haciendo burbujear el $CO_2$, inyectado en el incubador, a través de dos cubetas llenas de agua destilada. Por otra parte, las variaciones de temperatura en el interior de la estufa no superaron los ± 0,3°C. Para la regulación de la presión parcial de $CO_2$ se utilizó un sensor basado en la medida de la conductividad térmica de la mezcla de gases, capaz de detectar cambios en el nivel de $CO_2$ superiores al intervalo ± 0,1 %.

## 2.1.2. Cámara de Flujo Laminar

Se ha empleado una cabina de flujo laminar, suministrada por Flow Laboratories, para prevenir y evitar la contaminación biológica de los cultivos celulares. La circulación de aire dentro de la cabina, en dirección vertical y con velocidad máxima de 0,46 m/seg., se consigue mediante un ventilador.

El aire, antes de entrar en la cabina, se filtra y el rendimiento del proceso de filtración (99,997% de retención de todas las partículas mayores de 0,3 $\mu$ de diámetro) garantiza el mantenimiento de las condiciones de esterilidad necesarias para llevar a cabo todas las experiencias.

## 2.1.3. Microscopio Invertido

Hemos utilizado un microscopio invertido Olympus IMT-201 dotado con tres objetivos 10X, 20X y 40X para fotografía con contraste de fases.

## 2.1.4. Espectrofotómetro

Se ha empleado un espectrofotómetro ultravioleta/visible Beckman, modelo 34C de Beckman Instruments Inc., Irvine, California, USA, dotado de

doble haz, con fuente capaz de operar entre 190 y 700 nm. Como accesorios, el aparato dispone de un registro gráfico e impresora digital y de una bomba peristáltica para introducir automáticamente las muestras en la cubeta de flujo.

En la mayor parte de las experiencias realizadas se han utilizado cubetas estandar de vidrio (para determinación de la densidad óptica en la zona del visible) de un centímetro de paso de luz, o de cuarzo (medidas de absorbancia en UV) de las mismas dimensiones. Cuando el volumen de muestra a analizar era muy escaso hemos empleado microcubetas de cuarzo.

### 2.1.5. Espectrómetro de Centelleo Líquido

Se ha utilizado un espectrómetro de centelleo líquido, marca Beckman, modelo LS2800, de Beckman Instruments Inc, Irvine, California, USA, con capacidad para 336 o 648 muestras que pueden ser analizadas automáticamente en tres canales energéticos. El proceso de centelleo se fundamenta en la conversión de parte de la energía cinética de la partícula ionizante emitida por el trazador radioactivo en fotones luz, al quedar dicha radiación atenuada, o frenada, en ciertos materiales. Cuando se utiliza como material centelleador un compuesto orgánico (tolueno, benceno o dioxano por ejemplo) que hace de disolvente de otros compuestos orgánicos

especiales (solutos), el proceso se denomina centelleo líquido y a la disolución centelleadora líquido de centelleo o "fósforo". El material radioactivo, solubilizado en ese líquido, puede ser analizado en condiciones de máxima eficiencia. Una solución para "centelleo líquido" consta, en consecuencia, de tres partes básicas: el disolvente, el soluto y la muestra.

El proceso de centelleo resulta afecto por la naturaleza y las cantidades de cada una de esas partes. El átomo radioactivo, que puede ser la muestra o estar incorporado a una molécula más compleja, excita al desintegrarse a las moléculas del disolvente y la energía transferida en procesos de excitación puede llegar a las moléculas de soluto. Si la elección de este compuesto es adecuada, la transferencia: Energía de excitación del disolvente → Energía de excitación del soluto puede ser cuantificada. Los solutos se eligen de forma tal que el rendimiento de este proceso de transferencia de energía sea elevado y que su decay energético a nivel basal ocurra por fluorescencia predominantemente (rendimiento ≈ 90%) con emisión de fotones-luz cuya longitud de onda sea eficientemente medida por tubos fotomultiplicadores comerciales.

El soluto primario constituye, usualmente, el 1% respecto al disolvente y en algunos casos suele añadirse un segundo soluto a la mezcla centelleadora si se desea desplazar la longitud de onda de la emisión fluorescente a rangos que sean más eficazmente

cuantificados por el fotomultiplicador. Los fotones son emitidos isotópicamente por el centelleador y utilizando unos reflectores ópticos apropiados se dirigen la mitad de los fotones luz emitidos a cada uno de los dos tubos fotomultiplicadores que "ven" la muestra. Cuando suficiente número de fotones inciden sobre el fotomultiplicador, se genera un impulso eléctrico de voltaje proporcional al número de fotones luz detectados.

El rendimiento de estos procesos puede ser reducido por diferentes mecanismos que se denominan genéricamente "quenching" o extinción para cuya corrección es necesario acudir a procedimientos experimentales que exigen determinados cálculos matemáticos capaces de relacionar el "quenching" con la eficiencia del contaje.

El equipo utilizado por nosotros corrige, de manera automática, la extinción de la muestra haciendo uso del procedimiento de relación de canales externos y utilizando $^{137}Cs$ como fuente radiactiva externa.

Todas las determinaciones de radioactividad en la muestra han sido efectuadas preseleccionando un tiempo de contaje mínimo (10 minutos) o acumulando un número de cuentas suficiente como para que el error estadístico del contaje fuese menor del 1% y sustrayendo de la velocidad de recuento experimental (cpm) el valor numérico estimado para la radiación de fondo.

## 2.1.6. Cámara Frigorífica

Para el almacenamiento de reactivos y tampones, así como para la realización de experiencias a baja temperatura hemos utilizado una cámara frigorífica instalada por Pedro y López S.A., cuya temperatura está regulada a 4 ± 1 °C.

## 2.1.7. Centrífuga

Para separar por centrifugación componentes de muestras que no sufren alteración a temperatura ambiente, se ha empleado una centrífuga marca Kokusan, con capacidad máxima de 108 tubos de 1,2 cm de diámetro, capaz de alcanzar la velocidad de 3.000 rpm.

## 2.1.8. Centrífuga Refrigerada

Se ha utilizado una centrífuga convencional, marca Beckman, modelo TJ-6, dotada con una unidad adicional de refrigeración que permite centrifugar muestras a 4°C.

La centrífuga consta de un rotor, con soportes intercambiables, para la centrifugación simultánea de un número de muestras variable (4-120 muestras). La

máxima velocidad de centrifugación depende del rotor utilizado.

### 2.1.9. Ultracentrifuga

Para eliminar detritus celulares y aislar en el medio de cultivo el TPA, se ha utilizado una ultracentrífuga, marca Beckman, modelo L8-70, en las siguientes condiciones de uso: 100.000 g. (Rotor SWTi 60) durante 30 minutos, a 4°C, en vacio.

### 2.1.10. Balanza de precisión

Se ha utilizado una balanza de precisión Mettler H 35-AR, capaz de alcanzar la décima de miligramo.

### 2.1.11. Congeladores

Para el almacenamiento de muestras se ha utilizado un arcón congelador, marca Selecta modelo 455, capaz de alcanzar la temperatura de -80°C. La temperatura de operación del mismo durante el período de tiempo en el que se llevaron a cabo las experiencias incluidas en el presente trabajo fue de -70°C.

## 2.1.12. PH-metro

Para la regulación del pH de los medios de cultivo celular o de los tampones empleados hemos utilizado un pH-metro suministrado por la firma Orion Research modelo 501, cuya precisión se estima en 0,01 unidades de pH.

## 2.1.13. Unidad de Filtración

Se han utilizado sistemas de filtración asépticos Millipore XX11 04710 previamente esterilizados en autoclave, cada uno de los cuales consta de 2 receptáculos, el superior de 250 cc. de capacidad para introducir la sustancia a esterilizar y el inferior con igual capacidad para recoger el líquido filtrado. Ambos receptáculos están separados por una membrana de filtración recambiable de 0,22 $\mu$ de poro y 47 mm. de diámetro, tipo Millipore GSWP 04700.

## 2.2. REACTIVOS

### 2.2.1. Medios de Cultivo Celular

Como medio de cultivo celular se ha utilizado Medio Esencial Mínimo con sales de Earle (MEM) (Gibco Bio-cultd., Scotland) suplementado con 10% de suero de feto de ternera y antibióticos (Penicilina 100 U/ml, Estreptomicina 100 µg/ml y Gentamicina 40 µg/ml). El suero de feto de ternera se inactivó antes de su uso, mediante baño en agitación a 56°C durante 45 a 60 minutos y el pH se reguló a 7,56 utilizando bicarbonato sódico 4,2 µg/ml (Merck) y Hepes 20mM (Sigma).

Los medios, una vez preparados, se sometieron a reesterilización mediante su paso a través de unidades de filtración Millipore con filtros de 0,22 µ de tamaño de poro.

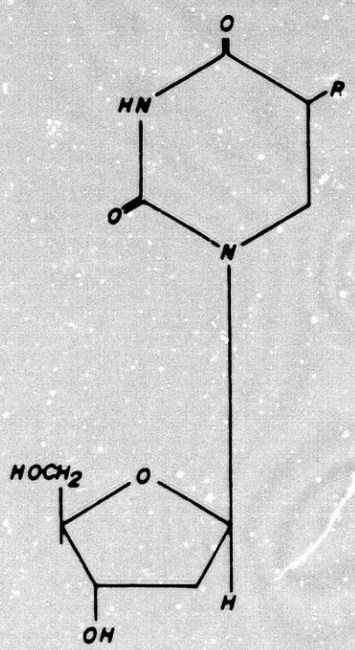
### 2.2.2. Mezcla de Centelleo

En las medidas de la radiactividad incorporada al DNA celular se ha utilizado como mezcla centelleadora Normascint-22 suministrada por los laboratorios Scharlau (España), cuya constitución es la siguiente: PPO (4g/1), POPOP (0,5 g/1), Triton X-100 (100 ml) y Tolueno hasta completar 1 litro.

## 2.2.3. Precursores Marcados

En las experiencias realizadas con objeto de valorar la capacidad de incorporación celular de compuestos que forman parte del DNA se ha utilizado como precursor Timidina marcada con tritio (Metil-$^{3}$H-Timidina, $^{3}$HTdR, Amershan).

La timidina es un nucleósido formado por la base pirimidínica timina y el azúcar desoxirribosa. La fórmula estructural de este compuesto se indica a continuación.



## 2.2.4. Factores de Crecimiento

Se ha empleado el Epidermal Growth Factor (EGF) obtenido a través de la firma comercial Sigma, que nos fue suministrado como liofilizado estéril. A partir de él se preparó por disolución de HANK'S una solución stock de 10 µg/ml. Alicuotas de 1 ml de esta solución se guardaron a -20°C, hasta el momento de su uso.

## 2.2.5. Enzimas

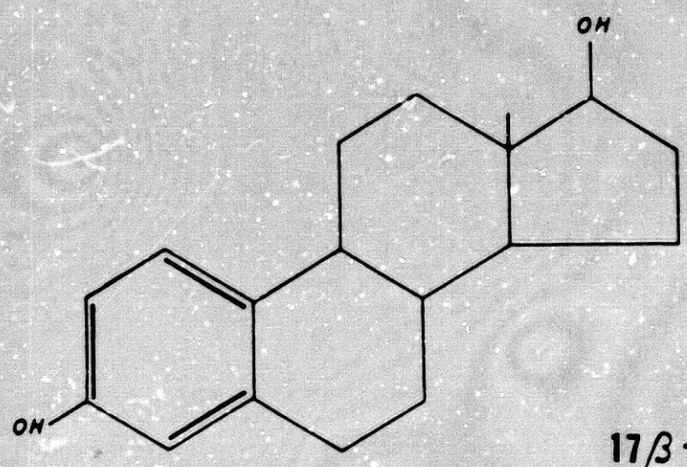
Para llevar a cabo tanto los subcultivos celulares como la cuantificación de los elementos celulares presentes en el cultivo se ha utilizado una solución de Tripsina-EDTA (Tripsina 0,05% - EDTA 0,025%) capaz de despegar las células que crecen adheridas al soporte. Tras aspirar el MEM y lavar con HANK'S el tapiz celular, una cantidad determinada de la disolución enzimática se añadió a los discos o cajas de cultivo y se dejó actuar durante < 5 minutos a 37 ºC. La suspensión resultante, transferida a un tubo, se centrifugó. finalmente, a 1.000 g., durante 10 minutos a temperatura ambiente.

## 2.2.6. Hormonas

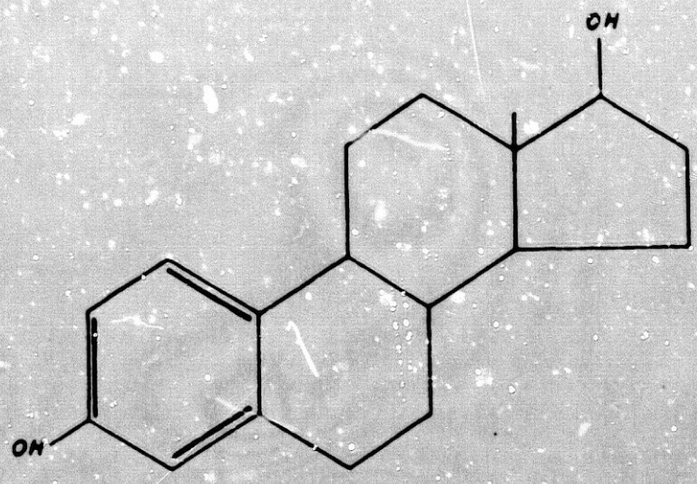
Hemos utilizado el 17β-Estradiol (Sigma, Ref: E-8875), el 17α-Estradiol (Sigma, Ref: E-8750), el Dietilestilbestrol (Sigma, Ref: D-4628) y la Estrona (Sigma, Ref: E-9750) en concentraciones $10^{-7}$M en MEM + FCS.

Como sustancias de acción antiestrogénica se ha empleado el Hidroxitamoxifeno (Ref: 79.280) suministrado por Ici - Pharma, en concentración $10^{-7}$M. en MEM + F.C.S.

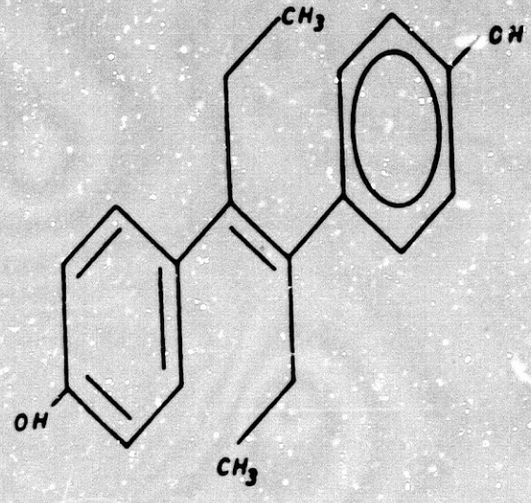
Las estructuras de estas cinco moléculas se representan a continuación.



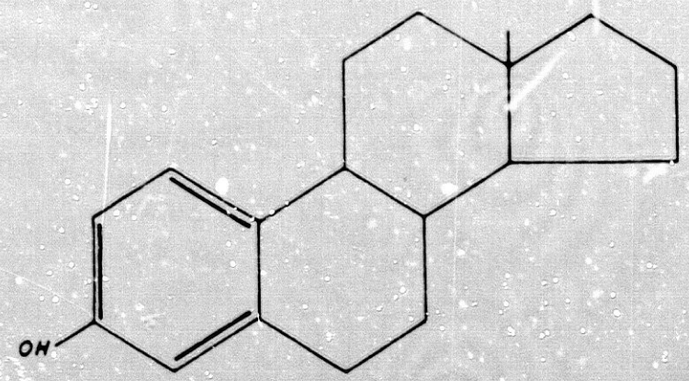

17β-ESTRADIOL



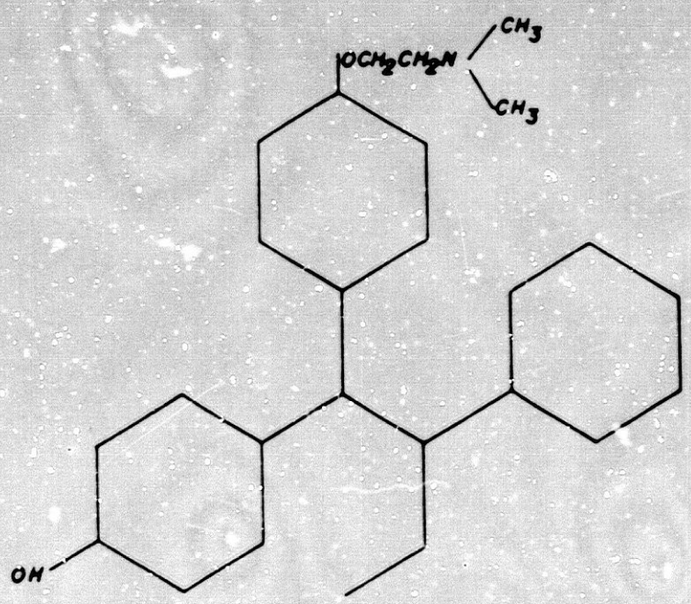

17 α – ESTRADIOL




DIETILESTILBESTROL




ESTRONA




4 – HIDROXI – TAMOXIFENO

## 2.2.7. Quimioterápicos

Para los ensayos de Quimiosensibilidad se han empleado los siguientes quimioterápicos:

Farmiblastina (Farmitalia): Adriamicina o Doxorubicina.

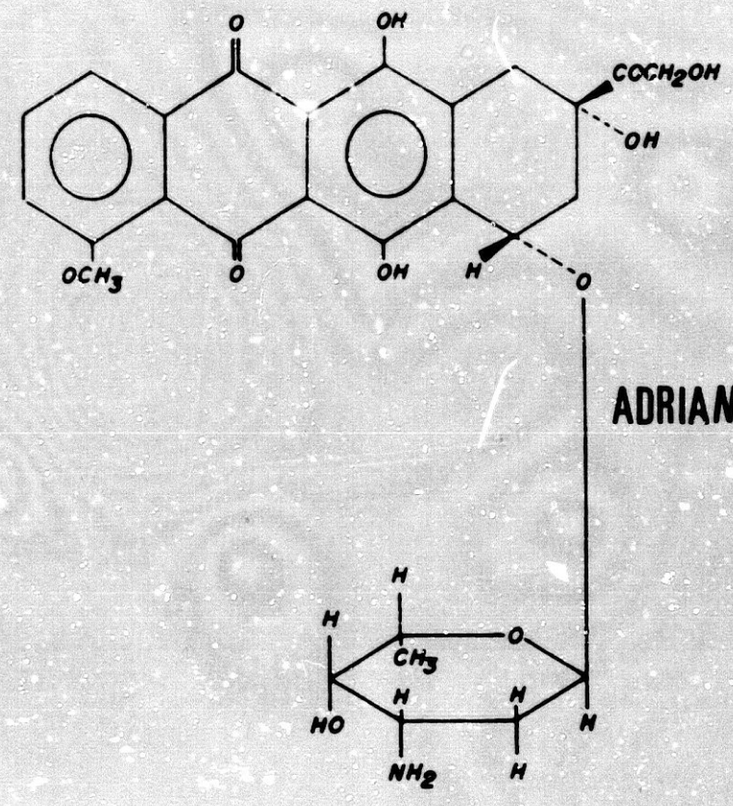
Fluoro-Uracil (Roche): 5-Fluorouracilo.

Vincrisul (Lilly): Vincristina.

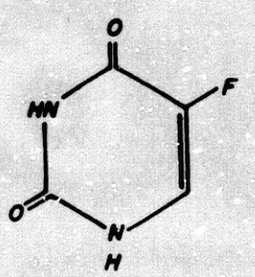
Methotrexato (Lederle): Methotrexate.

Dichos agentes citotóxicos en solución estéril, fueron diluidos con MEM hasta alcanzar concentraciones comprendidas entre 0,005 y 5 µg/ml.

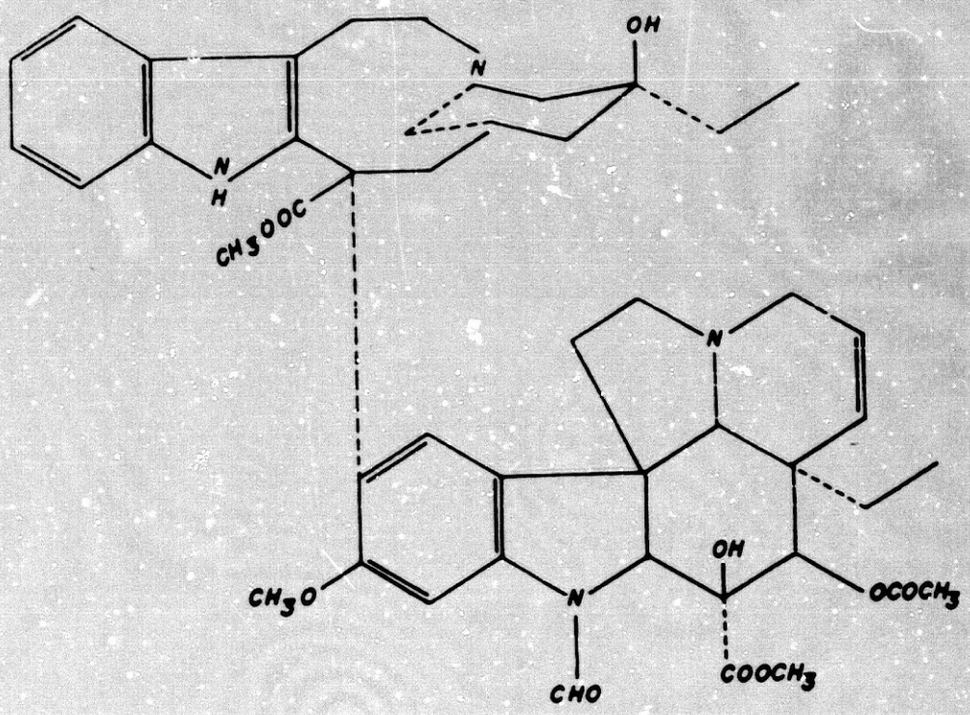
La estructura de estas moléculas quimioterápicas es la siguiente:



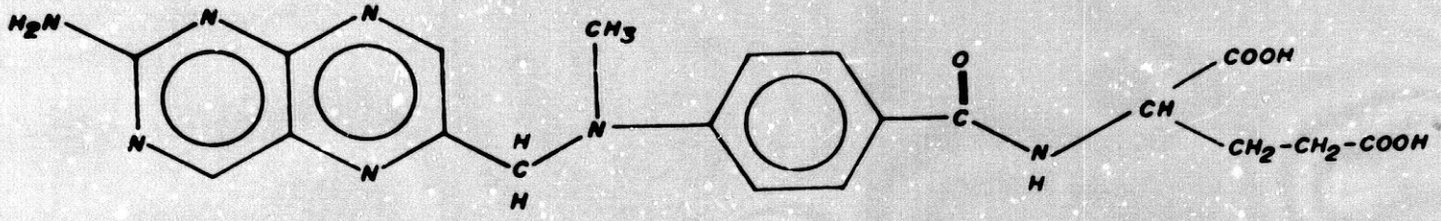

ADRIAMICINA




5–FLUOROURACILO




**VINCRISTINA**




METOTREXATE

## 2.3. MATERIAL

### 2.3.1. Filtros

Para la esterilización de pequeños volúmenes se han utilizado filtros de un solo uso tipo Millipore HAWR 02500 con membrana porosa de 0,22 $\mu$.

### 2.3.2. Frascos y Discos de Cultivo

Se han empleado para el almacenamiento de las células en cultivo, frascos Costar 3050 y 3075 de 25 y 75 $cm^2$ de área de crecimiento y de 50 y 75 ml de volumen, respectivamente. Dichos frascos son de plástico tratado de manera especial para proporcionar una fijación y crecimiento celular óptimo. Están esterilizados con $Co^{60}$.

Para los ensayos de quimiosensibilidad en monocapa se han utilizado, así mismo, placas tipo Petri, de 35 x 10 mm, con un área de crecimiento de 9 $cm^2$ tratadas de igual forma que los frascos de cultivo marca Costar 3035.

### 2.3.3. Pipetas

Se utilizaron pipetas estériles marca Costar, empaquetadas individualmente y taponadas con algodón hidrófobo, de volumen constrastado y capacidad, según tipo, de 2 cc., 5 cc y 10 cc. Por otra parte se utilizaron pipetas tipo Pasteur, de vidrio, Lab. Clinics, PPV/9 y PPV/6.

### 2.3.4. Otro Material Fungible

Cuando las experiencias lo han requerido se han utilizado:

- Tubos de polipropileno con tapón de rosca, y fondo cónico, de 13 ml de volumen, estériles.

- Micropipetas, Lab Clinics, de 50 y 100 µl.

- Viales para contadores de centelleo.

- Erlenmeyer, probetas, matraces, vasos de precipitado, embudos, etc.

## 2.4. CULTIVOS CELULARES

Como modelo tumoral para análisis de la liberación del TPA al medio de cultivo se han utilizado dos líneas celulares tumorales establecidas procedentes de cáncer metastásico de mama. La primera de ellas, denominada MCF-7, posee receptores para hormonas esteroideas y para progestágenos (42). La segunda conocida por EVSA-T resulta independiente de la acción del 17β-estradiol y no posee receptores para estrógenos (146).

Ambas líneas celulares se cultivaron en monocapa utilizando Medio Mínimo Esencial con sales de Earle (MEM) suplementado con 10% de suero de feto de ternera y antibióticos (apartado 1.6.1.).

## 2.5. ESTIMACION DEL NUMERO DE ELEMENTOS CELULARES EN CULTIVO

### 2.5.1. Determinación del DNA

Un procedimiento indirecto para cuantificar el número de células presentes en el cultivo consiste en determinar, por métodos bioquímicos (Técnica de Burton (47)) la cantidad de ácido desoxirribonucleico (DNA) extraible de las células. Para ello, se procedió a despegar el tapiz celular en las condiciones anteriormente indicadas y un volumen conocido de la

suspensión resultante se trató con igual cantidad de $ClO_4H$, 1N con objeto de lisar las células.

El DNA es insoluble a baja temperatura (4°C). Por ello, trás una hora a 4°C, se sometieron las muestras a centrifugación (10 minutos, 3.000 r.p.m.), recogiéndose a continuación el precipitado, del cual se extrajo el DNA solubilizándolo en $ClO_4H$, 0'5 N, por calentamiento en baño a 70 °C durante 20 minutos en agitación. Alicuotas de esta disolución se incubaron con el reactivo de Burton durante 20 horas a 30°C, en estufa.

La reacción entre el DNA hidrolizado y la difenilamina en medio ácido produce una coloración azul característica que puede ser cuantificada en un espectrofómetro a $\lambda$ = 600 nm. Comparando la densidad óptica obtenida con una curva patrón construida utilizando soluciones de concentraciones conocidas de DNA de origen bovino, (timo de vaca, Sigma), sometidas a idéntico tratamiento que las muestras, resulta fácil cuantificar el DNA nuclear.

La composición del reactivo de Burton, para 100 ml., es la siguiente:

- Difenilamina (Merck): 1'5 g.
- Acido acético (Merck): 98 ml.
- Acido sulfúrico 95% (Merck): 1'5 ml.
- Acetaldehido (solución madre 16 mg/ml, Merck): 500 µl.

## 2.5.2. Cuantificación de proteínas

El crecimiento celular puede ser también indirectamente evaluado utilizando como índice del mismo la cantidad de proteínas extraídas del cultivo. Para ello el tapiz celular, tras ser lavado con una solución salina equilibrada, se trata con NaOH 1N durante 45 minutos a 37°C. Sobre una alicuota de la solución resultante (0'5 ml.) se añaden 3 ml de solución que contiene $CO_3Na_2$ al 2%, $SO_4Cu\ 5H_2O$ al 0'001% y Tartrato sódico-potásico al 0'02% y se deja incubar 10 minutos, transcurridos los cuales se adicionan 0'2 ml. de reactivo de Folín-Ciocalteau (método de Lowry (184)) que da lugar a la aparición de una coloración azul-violeta que puede ser cuantificada en el espectrofotómetro a $\lambda$ = 660 nm. Los valores de concentración proteica se calculan, entonces, mediante la comparación de las densidades ópticas encontradas con las que ofrece una serie de disoluciones de proteínas (albúmina bovina) de concentración conocida.

## 2.6. DEMOSTRACION DE LA PRESENCIA DE TPA EN EL MEDIO DE CULTIVO DE CELULAS MCF-7 Y EVSA-T

Alicuotas de una suspensión celular de MCF-7 o EVSA-T en MEM + FCS, conteniendo aproximadamente 10.000 elementos por milímetro, se siembran en discos Petri de 30 mm de diámetro y se mantienen en estufa de cultivo durante períodos de tiempo variables, realizando los oportunos cambios de medio para mantener las células en fase de crecimiento exponencial. Los parámetros que se extraen del experimento son: el número de células (medido a través de su contenido en DNA) existente en los discos y la concentración de antígeno polipeptídico tisular determinada por Radioinmunoanálisis sobre el medio de cultivo.

Para efectuar esta determinación el medio de cultivo se somete a ultracentrifugación (100.000 g, 30 minutos a 4°C) para eliminar detritus celulares y se almacena a -20°C hasta la realización del radioinmunoensayo.

### 2.6.1. Radioinmunoensayo de Antígeno Polipeptídico Tisular

El test radioinmunológico para la determinación de antígeno polipeptídico tisular se basa en la utilización secuencial de dos anticuerpos: el

antisuero obtenido en caballo frente a antígeno TPA derivado de la línea celular tumoral Hela, se incuba con la muestra, enlazándose al TPA presente. Trás esta primera reacción se adiciona al medio una cierta cantidad de TPA - $^{125}I$, que compite con el TPA de los standard o las muestras por enlazarse a los sitios de unión del anticuerpo. Como resultado de esta competencia, cierta fracción de TPA - $^{125}I$ quedará unida al anticuerpo en una proporción que depende de la concentración de antígeno TPA presente en el ensayo. La separación de las fracciones libre y ligada se efectúa utilizando un segundo anticuerpo, obtenido en conejo, frente a las inmunoglobulinas del caballo. Los complejos inmunes: ($TPA\text{-}Ac_1$ $TPA\text{-}Ac_2$) se separan por precipitación y posterior centrifugación, midiéndose la radiactividad del precipitado en un contador gamma.

Las muestras, tras la extracción de aproximadamente 5 ml de sangre, se dejan reposar para que se produzca la coagulación y se centrifugan, después, para separar el suero, almacenándose en congelador a -20°C hasta el momento de proceder al ensayo. Se ha demostrado que no existe pérdida de actividad inmunológica si la muestra se guarda, en estas condiciones, durante un período de tiempo de 2 meses. No resultan válidas para el ensayo muestras en las que la hemolisis sea evidente.

## 2.6.2. Procedimiento técnico

El Kit para la dosificación sérica de TPA suministrado por SANTEG MEDICAL, Bormma, Suecia, contiene los siguientes reactivos:

a) Antisuero Anti-TPA: Vial cuyo contenido está liofilizado y que debe ser reconstruido con disolución tampón 1 hora antes de su utilización.

b) TPA - $^{125}$I: Vial con antigeno polipeptídico tisular liofilizado cuyo contenido debe ser reconstruido con solución tampón 3 horas antes de su uso.

c) Anticuerpo precipitante: segundo anticuerpo (inmunoglobulinas de conejo frente a inmunoglobulinas de caballo) que, como en casos anteriores, se suministra liofilizado y debe ser reconstruido para su uso.

d) TPA standard: liofilizado en cantidad suficiente para preparar 2 ml de TPA cuya concentración resulte ser 3.000 UI/litro. A partir de esta disolución y por sucesivas diluciones se obtienen los siguientes puntos de la curva standard: 2.000, 1.000, 500, 250, 125, 62, 31 y 0 U/l.

El Kit permite la realización de 120 test que se distribuyen de la forma siguiente: Actividad total, enlaces no específicos, concentración cero ($B_0$), muestras de concentración conocida ($B_i$,

i=1,2,.....,7), muestras para control de calidad y muestras problema. Todos los ensayos se realizan por duplicado.

Esquemáticamente el ensayo se realiza de acuerdo con las siguientes etapas:

1. Se pipetean 100µl de standard, controles y problemas en sus tubos correspondientes.

2. Se adicionan 100µl de Anti-TPA en todos los tubos excepto los correspondientes a los enlaces no específicos y a la actividad total.

3. Se incuba a 4°C durante 18 horas.

4. Se añaden 100µl. de $^{125}$I-TPA en todos los tubos.

5. Nuevamente se incuba a 4°C durante 18-24 horas.

6. Se pipetean 100µl de anticuerpo precipitante en todos los tubos salvo los correspondientes a actividad total (A.T.).

7. Se incuban a 4°C durante 2 horas.

8. Se agrega 1 ml. de Disolución Tampón fría (4°C) a todos los tubos excepto a los A.T.

9. Se centrifuga a 2.000 g. durante 30 minutos utilizando centrífuga refrigerada (4°C).

10. Se aspira el sobrenadante.

11. Por ultimo se lava con Disolución Tampón, se centrifuga en las condiciones establecidas en el punto 9 y se someten las muestras a contaje de su actividad.

12. Los resultados se procesan sustrayendo las cuentas correspondientes a los enlaces no especificos de la actividad medida en el resto de los tubos.

Los enlaces no especificos no deben ser superiores al 5% de la actividad total. La relación $B_0$ (actividad correspondiente al tubo de concentración cero) dividida por la actividad total debe estar comprendida dentro del rango del 50-70 %. Los valores $B/B_0$ se obtienen dividiendo la media de las cuentas medidas para cada concentración por la actividad media de los tubos de concentración cero. Igual procedimiento se sigue para el cálculo de la relación $B/B_0$ correspondiente a controles o problemas. La curva standard puede ser representada directamente en papel milimetrado ($B/B_0$ en ordenadas, concentración de TPA en abcisas) o transformada de acuerdo con el procedimiento logit $y=f(\log [c])$ (véanse Figuras 2.1 y 2.2). Una vez obtenida la representación gráfica de la curva standard o su transformación logit, la interpolación de los valores $B/B_0$ para controles y problemas y la deducción de la concentración correspondiente puede hacerse gráficamente o con la ayuda del computador.

# EJEMPLO DE CURVA STANDARD DE ANTIGENO POLIPEPTIDICO TISULAR

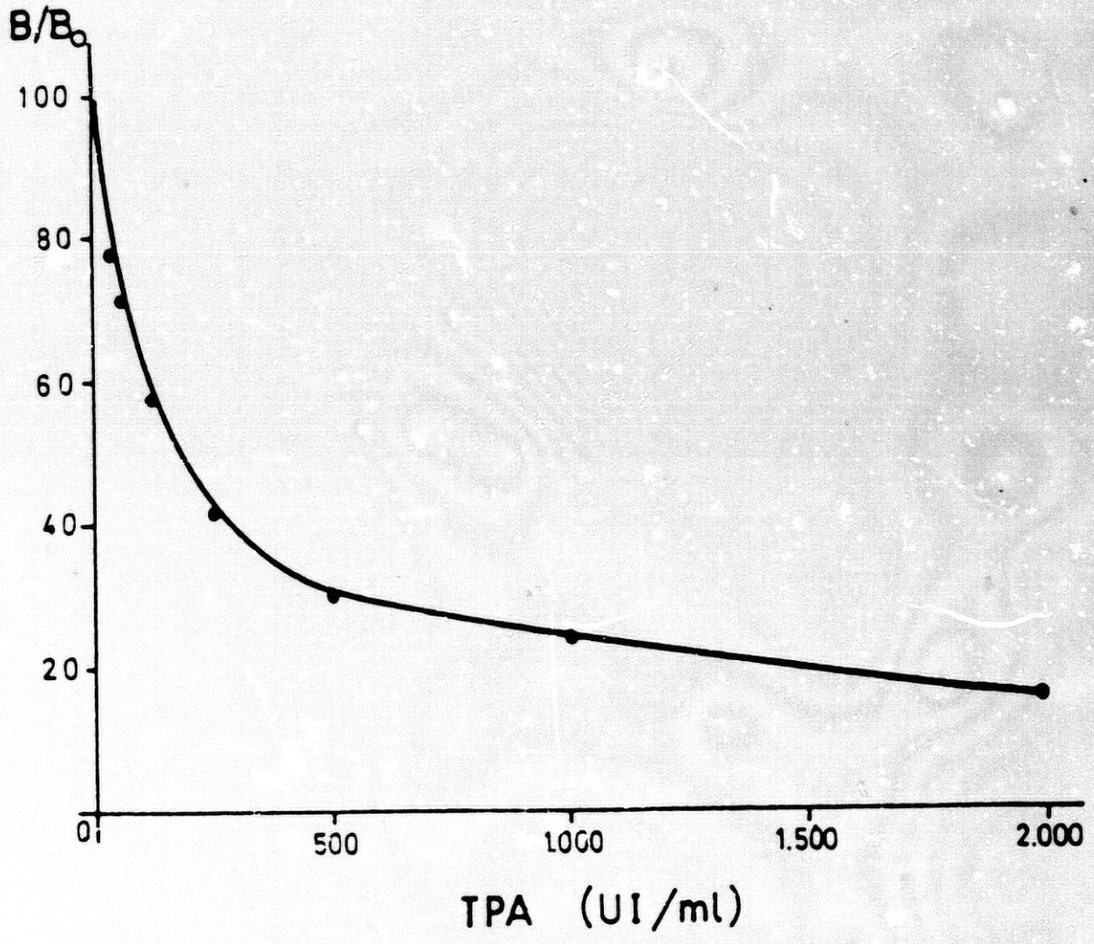



FIG.- 2.1

# EJEMPLO DE TRANSFORMACION LOGIT/log DE CURVA STANDARD DE TPA

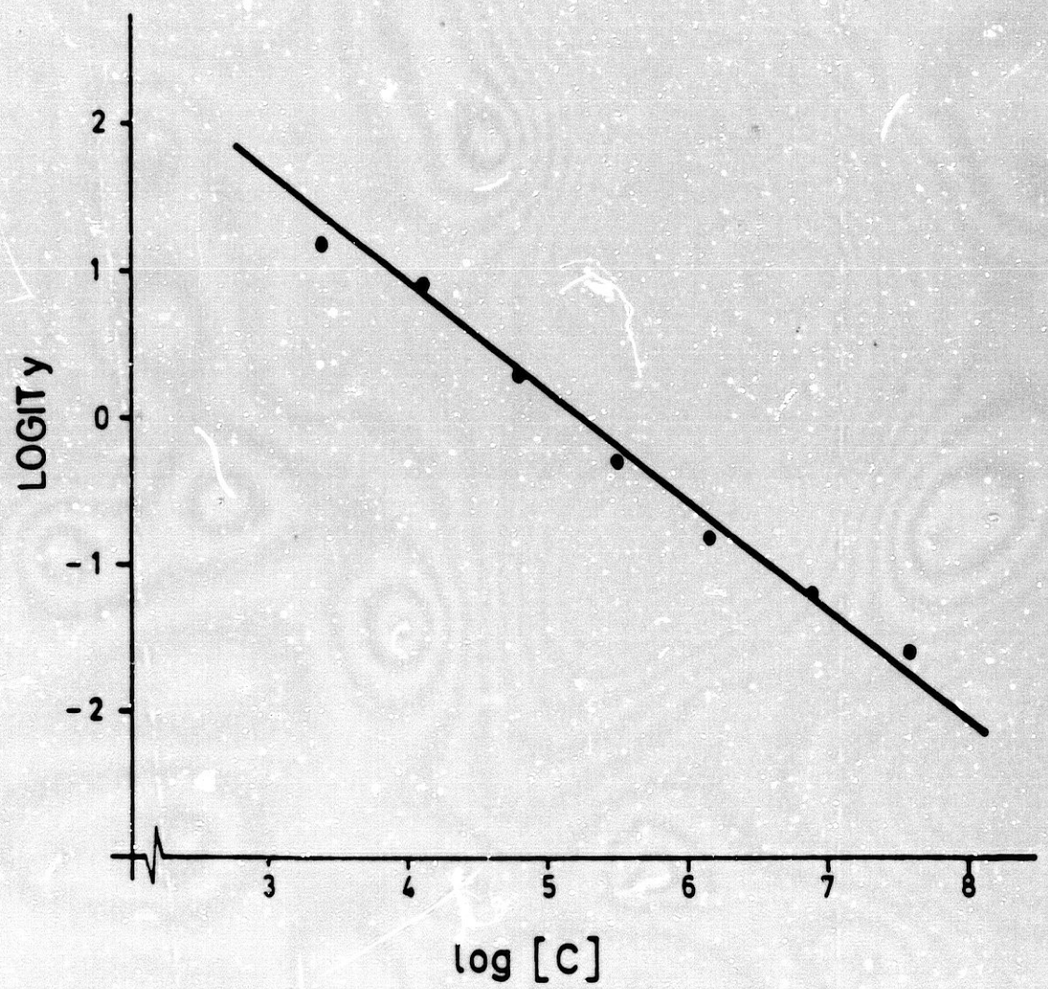



FIG.- 2.2

## 2.7. CINETICA DE LIBERACION DE ANTIGENO POLIPEPTIDICO TISULAR

Utilizando ambas líneas celulares (MCF-7 y EVSA-T) hemos realizado un experimento para estudiar la liberación del TPA al medio de cultivo y relacionar este fenómeno con la proliferación celular. Para ello, utilizando discos Petri de 30 mm de diámetro se sembraron aproximadamente 50.000 células por disco y tanto el DNA como el TPA se cuantificaron cada día durante todo el tiempo de duración del ensayo. El experimento finalizó a las 192 horas (8 días) de la siembra. Las determinaciones de DNA y TPA se realizaron por quintuplicado.

## 2.8. INFLUENCIA DE DIVERSAS HORMONAS ESTEROIDEAS Y DE ANTIESTROGENOS SOBRE LA LIBERACION DE TPA

Para investigar los efectos de las hormonas esteroideas -17βEstradiol, 17αEstradiol, Estrona y Dietilestilbestrol- sobre el crecimiento celular de las células MCF-7 cultivadas en monocapa y conocer si estas sustancias tienen alguna acción sobre la liberación de TPA al medio de cultivo, se ha realizado un experimento en el que a las 24 horas de la siembra de aproximadamente 50 000 células por disco, se sustituyó el medio de cultivo inicial (MEM + FCS 10%) por MEM + FCS 10% suplementado con cada una de las hormonas descritas a la concentración $10^{-7}$M. Se

realizaron cambios de medio a los 3 y 6 días del inicio del ensayo, utilizando MEM + FCS 10 % + Hormona $10^{-7}$M y los resultados se valoraron al octavo día de cultivo. Todas las determinaciones se realizaron por cuadruplicado. El antiestrógeno OH-TAM se ensayó en las mismas condiciones experimentales.

## 2.9. LIBERACION DE TPA POR CELULAS MCF-7 PARCIALMENTE SINCRONIZADAS

La exposición del cultivo de células MCF-7 al Hidroxitamoxifeno $10^{-7}$M produce la inhibición del crecimiento celular por bloqueo de la fase $G_1$ del ciclo mitótico (178,221,308). Se obtiene, de esta forma, un cultivo cuyos elementos se encuentran mayoritariamente distribuidos en fase $G_0/G_1$. La eliminación del medio de cultivo que contiene OH-TAM $10^{-7}$M y su sustitución por MEM + FCS + 17$\beta E_2$, rescata a las células MCF-7 sensibles al antiéstrógeno, que, de forma simultánea y bajo la influencia del 17$\beta$-$E_2$, inician un nuevo ciclo mitótico (178,221,308).

Pues bien, utilizando el modelo experimental desarrollado en nuestro Departamento (308) hemos sometido a estudio el efecto del tratamiento combinado OH-TAM $10^{-7}$M durante 72 horas primero y 17$\beta E_2$ $10^{-7}$M (grupo estradiol) durante 72 horas, después, sobre la población celular MCF-7 y la respuesta al mismo de los elementos de ésta en términos de crecimiento celular

(contenido en DNA) y liberación al medio de cultivo de TPA.

Las determinaciones analíticas de TPA o DNA se realizaron a las 72 horas de iniciada la exposición celular al OH-TAM y a las 24, 48 y 72 horas siguientes al cambio de medio en el grupo estradiol.

Las determinaciones de DNA se efectuaron por quintuplicado. Las de TPA por duplicado.

## 2.9.1. Liberación del TPA y fase del ciclo celular

Utilizando el procedimiento de sincronización y rescate de MCF-7 anteriormente descrito, hemos sometido a estudio la dependencia de la liberación de TPA respecto a la fase del ciclo celular en la que mayoritariamente se encuentra distribuido el cultivo. Para ello tras someter a las células MCF-7, cultivadas en cajas T-25, a la acción durante 72 horas de OH-TAM $10^{-7}$M, se efectuó el cambio del medio por otro que contuviese MEM + FCS + 17βE$_2$ $10^{-7}$ M. Las determinaciones de TPA y DNA se iniciaron a las 6 horas de efectuado el cambio de medio y, después, cada 6 horas hasta completar 72 horas.

El experimento concluyó con la medida de TPA y DNA a las 96, 120 y 144 horas del cambio de medio.

## 2.10. EFECTO DEL EPIDERMAL GROWTH FACTOR (EGF) SOBRE CULTIVOS SINCRONICOS DE CELULAS MCF-7

Para estudiar los efectos del factor de crecimiento EGF sobre elementos celulares MCF-7 previamente sometidos a sincronización con OH-TAM $10^{-7}$M hemos realizado los experimentos cuya metodología se especifica a continuación.

### 2.10.1. Actividad mitógena del EGF

El experimento inicial se llevó a cabo añadiendo a discos de 30 mm de diámetro alícuotas de 2 ml de una suspensión celular (≈ $10^5$ cel./ml.) en MEM suplementado con suero de feto de ternera y con OH-TAM $10^{-7}$M. El antiestrógeno se dejó actuar durante 72 horas transcurridas las cuales se separó el medio de cultivo por aspiración y se sustituyó por 2 ml de MEM + FCS (Grupo A), MEM + FCS + EGF 10ng/ml (Grupo B), MEM + FCS(s) (Grupo C) y MEM + FCS(s) + EGF 10ng/ml (Grupo D).

Las siglas FCS(s) corresponden a suero de feto de ternera inactivado térmicamente y tratado con carbón-

dextrano en la forma siguiente: sobre un vaso de precipitado se añaden 100 ml de FCS más 150 ml de MEM suplementado con antibióticos. A la disolución resultante se incorporan 750 mg de carbón activo recubierto con 7'5 mg de Dextrano T-70. Trás una agitación inicial la mezcla se deja en reposo durante 18 horas a 4°C. Durante este tiempo, los esteroides libres al igual que otras moléculas de pequeño tamaño, son adsorbidas por el carbón activo. Terminado el tiempo de adsorción, la mezcla se centrifuga en tubos cónicos de plástico a 1500 g. durante 10 minutos a 4°C. Se separa el componente líquido y se filtra utilizando un sistema Millipore de 0'22μ de diámetro de poro, para esterilizar la solución. Para conseguir una proporción adecuada de FCS en MEM (10% de FCS)una parte de la solución resultante se combina con 3 partes de MEM.

La cantidad de DNA y la concertración de TPA en el medio de cultivo se analizaron a las 0, 24, 48 y 72 horas del cambio de medio en cada uno de los grupos celulares sometidos a investigación.

### 2.10.2. Efecto del EGF sobre la incorporación de Timidina tritiada ($^3$HTdR) al cultivo

Utilizando el mismo esquema anterior, (tratamiento del cultivo durante 72 horas con OH - TAM $10^{-7}$M y rescate con cambio de medio), hemos sometido a

análisis los efectos del EGF sobre la población MCF-7 valorando la incorporación al DNA de un precursor marcado (Timidina, 3H-TdR). Los grupos estudiados: MEM + FCS (Grupo A), MEM + FCS + EGF, 10ng/ml (Grupo B), MEM + FCS(s) (Grupo C) y MEM + FCS(s) + EGF, 10ng/ml (Grupo D), fueron idénticos a los definidos en el apartado anterior analizándose los resultados a las 0, 6, 12, 18, 24 y 30 horas del cambio de medio.

Brevemente descrita la incorporación de timidina tritiada al cultivo celular se efectúa en la forma siguiente:

Se separa el medio nutriente por aspiración y se adicionan al cultivo 2 ml una disolución de $^{3}$HTdR en MEM cuya actividad específica en volumen se ajusta a 1µCi/ml. El tiempo de exposición de las células al precursor marcado se limita a 1 hora. Transcurrido ese tiempo las células se lavan con solución salina, se elimina el líquido de lavado y se trata el tapiz celular con 2 ml ácido tricloroacético ($Cl_3C$-COOH) al 5 % durante 30 minutos, a 4°C. Después se lava con etanol absoluto para eliminar los restos de timidina no enlazada al DNA y fijar las células al soporte. Por último, las células se someten a la acción de 2 ml de NaOH 1N, durante 45 minutos, a 37°C. Durante este proceso se solubiliza todo el material celular residual a las etapas de lavado anteriores. Una alíquota de esta solución previamente neutralizada con idéntico volumen de ClH 1N, se somete, por último, a

contaje beta utilizando como líquido de centelleo 4 ml de Normas cint (Scharlau).

### 2,10,3. Efecto del EGF en ausencia de FCS sobre el crecimiento celular y la liberación de antígeno TPA

Hemos investigado los efectos del EGF sobre células MCF-7 sincronizadas mediante tratamiento con OH-TAM y rescate por cambio de medio en presencia y en ausencia de FCS(s). Para ello, se han definido siete grupos experimentales sometidos a las condiciones que se especifican a continuación:

| | |
|---|---|
| Grupo Control: | MEM + FCS(s). |
| Grupo 1: | MEM + FCS(s) + EGF ( 1 ng/ml). |
| Grupo 2: | MEM + FCS(s) + EGF ( 10 ng/ml). |
| Grupo 3: | MEM + FCS(s) + EGF (100 ng/ml). |
| Grupo 4: | MEM + EGF ( 1 ng/ml). |
| Grupo 5: | MEM + EGF ( 10 ng/ml). |
| Grupo 6: | MEM + EGF (100 ng/ml). |

Los cultivos de cada uno de los grupos se sometieron a analisis mediante determinación de DNA Y TPA a los siguientes tiempos: 0,24,48,72 y 96 horas tras el cambio de medio.

## 2.11. DESTRUCCION CELULAR QUIMIOINDUCIDA Y LIBERACION DE TPA

Para investigar los efectos de la Adriamicina (ADM), 5-Fluorouracilo (5-FU), Vincristina (VCR) y Methotrexate (MTX) sobre la supervivencia celular y la liberación de TPA al medio nutriente se ha realizado el siguiente experimento (120).

Se siembra un número adecuado de discos de 3 cm de diámetro con alicuotas de 2 ml de una suspensión celular en MEM + FCS que contiene alrededor de 35.000 células por mililitro. Para que el crecimiento celular alcance su fase exponencial, los discos se incuban en las condiciones normales de cultivo (37°C, 5% $CO_2$, humedad relativa del 100%) durante 48 horas; transcurrido este período se elimina por aspiración el medio nutriente y se adiciona 1 ml de disolución de droga en MEM. Las concentraciones utilizadas abarcan el intervalo de 0'005 a 5 µg de sustancia activa por mililitro. Para obtener valores representativos todas las concentraciones se ensayan por quintuplicado. Se deja actuar el fármaco durante 1 hora a 37°C en estufa de cultivo y después se aspira el líquido, se añaden 2 ml de MEM + FCS y se prosigue el cultivo durante 72 horas más. Por último el tapiz celular se despega con Tripsina-EDTA, se transfiere a un tubo de ensayo de fondo cónico y se añade igual volumen de $ClO_4H$, 1N. El experimento concluye con la medida del DNA extraido de las células (apartado 2.5.1.) y con la determinación analítica de TPA en el medio de cultivo. Los

resultados obtenidos se expresan en relación a una serie de discos control sometidos a idénticas manipulaciones experimentales pero expuestos durante 1 hora a la acción del vehículo (MEM) de la droga ensayada.

## 2.12 CINETICA DE LA LIBERACION DE TPA EN CELULAS SINCRONIZADAS TRATADAS CON CITOTOXICOS

Para estudiar la liberación de TPA en función del tiempo en células MCF-7 sincrónicas, hemos llevado a cabo un experimento en el que tras exposición del cultivo a OH-TAM durante 72 horas, se sometieron las células a la acción de ADM (0'1 µg/ml), 5-FU (5µg/ml), VCR (0'01 µg/ml) y MTX (0'5 µg/ml) durante 1 hora en las condiciones anteriormente expuestas (apartado 2.11). La cantidad de células existente en los discos y el TPA liberado al medio se analizaron a los siguientes tiempos medidos tras la acción del quimioterápico: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 18, 24 y 30 horas.

Los resultados se han expresado en función de los niveles de TPA y de DNA encontrados en el grupo control (discos sometidos a idénticas manipulaciones experimentales pero no sometidos a QT). Todas las determinaciones se realizaron por quintuplicado.

# RESULTADOS

# III. RESULTADOS

## 3.1. DEMOSTRACION DE LA PRESENCIA DE TPA EN EL MEDIO DE CULTIVO DE LINEAS CELULARES DE ESTIRPE EPITELIAL

Los ensayos obtenidos en el análisis por radioinmuno ensayo del medio de cultivo condicionado por el crecimiento de células MCF-7 y EVSA-T se ofrecen en las tablas III - 1 y III - 2. Ninguno de los componentes del medio nutriente fresco posee inmuno - reactividad con los anticuerpos anti - TPA. En las tablas III - 1 y III - 2 se especifican los datos correspondientes a la densidad de elementos celulares en el cultivo (expresada en función del valor medio y la desviación estandar del TPA), la concentración de TPA en unidades por litro de medio y la cantidad total de este antigeno.

# T A B L A  III - 1

Presencia de antígeno polipeptídico tisular en medios de cultivo de células MCF-7.

| [DNA] (µg) | [TPA] (U/L) | [TPA] (U) |
|---|---|---|
| 2 ± 0'2 | 1620 | 3'24 |
| 3'5 ± 0'8 | 1595 | 3'19 |
| 3'9 ± 0'8 | 1758 | 3'52 |
| 4'8 ± 0'7 | 2140 | 4'28 |
| 5'3 ± 1'0 | 2040 | 4'08 |
| 7'5 ± 0'9 | 3340 | 6'68 |
| 10'1 ± 0'8 | 3440 | 6'88 |
| 10'3 ± 1'2 | 5555 | 11'11 |
| 12'6 ± 0'9 | 6500 | 13'00 |
| 13'0 ± 1'1 | 5680 | 11'36 |
| 13'2 ± 1'1 | 4683 | 9'37 |
| 15'1 ± 1'2 | 6550 | 13'10 |

Medio Nutriente fresco : TPA indetectable

## 4.4. PROLIFERACION CELULAR Y LIBERACION DE TPA TRAS SINCRONIZACION DEL CULTIVO

Se ha demostrado, en cáncer de mama clínico (279), en tejido endometrial humano (280) y de rata (280), en el hígado de rata (321) y en líneas celulares establecidas de cáncer de mama (206), la presencia de un receptor específico, distinto del RE, para los antiestrógenos del grupo del tamoxifeno. La concentración de esa proteína no está relacionada con el contenido intracelular de receptor estrogénico. Su función es desconocida pero se cree que no guarda relación con las modificaciones del crecimiento celular que inducen los antiestrógenos. Se ha sugerido, por ello, que el mecanismo responsable de los efectos antiproliferativos es el enlace del tamoxifeno al receptor de estrógenos (206). Dependiendo del nivel de concentración ensayado, los efectos del TAM pueden ser reversibles -con estradiol- o irreversibles (192). Los efectos reversibles se asocian con la acumulación de las células en la fase $G_0/G_1$ del ciclo mitótico (277). Los efectos irreversibles predominan a elevadas concentraciones de antiestrógeno en las que, esta sustancia, ejerce una acción citotóxica que induce la muerte celular (277). Existe, por último, un tercer mecanismo inhibitorio que parece no necesitar del concurso del receptor estrogénico y que, aunque no conduce a la citolisis celular, resulta irreversible al estradiol (277). Este hecho sugiere que ciertas acciones del TAM pueden ser independientes del carácter receptor estrogénico positivo o negativo de la línea celular -o el tumor clínico- sometida a tratamiento habiéndose demostrado a este respecto (125) que, sobre líneas

# T A B L A  III - 2

Presencia de antigeno polipeptidico tisular en medios de cultivo de células EVSA-T.

| [DNA] (µg) | [TPA] (U/L) | [TPA] (U) |
|---|---|---|
| 5'6 ± 0'6 | 85 | 0'17 |
| 7'6 ± 0'9 | 141 | 0'28 |
| 9'6 ± 0'5 | 155 | 0'31 |
| 11'6 ± 0'8 | 203 | 0'40 |
| 17'1 ± 0'9 | 260 | 0'52 |
| 23'8 ± 0'7 | 353 | 0'71 |
| 25'1 ± 0'9 | 430 | 0'86 |
| 35'9 ± 1'2 | 594 | 1'19 |

Medio Nutriente fresco: TPA indetectable

## 3.2. CINETICA DE LIBERACION DEL ANTIGENO POLIPEPTIDICO TISULAR

Los resultados del estudio de liberación de antígeno TPA al medio de cultivo, en función del tiempo, para células MCF-7 y EVSA-T se muestran en las tablas III - 3 y III - 4. En dichas tablas se incluye el valor medio correspondiente a cada uno de los ensayos realizados así como la desviación estandar.

# T A B L A  III - 3

Cinetica de liberación del antigeno TPA. Linea celular MCF-7.

| t (dias) | [DNA] (µg) | [TPA] (U/L) | [TPA] (U) |
|---|---|---|---|
| 1 | --- | --- | --- |
| 2 | --- | 530 ± 95 | 1'06 |
| 3 | --- | 806 ± 128 | 1'61 |
| 4 | 2'6 ± 0'8 | 1250 ± 164 | 2'50 |
| 5 | 3'7 ± 0'8 | 1958 ± 193 | 3'92 |
| 6 | 5'8 ± 0'7 | 2908 ± 225 | 5'82 |
| 7 | 8'6 ± 0'9 | 4497 ± 289 | 8'99 |
| 8 | 13'2 ± 1'2 | 6735 ± 431 | 13'47 |

# T A B L A  III - 4

Cinética de liberación del antígeno TPA. Línea celular EVSA-T.

| t (días) | [DNA] (µg) | [TPA] (U/L) | [TPA] (U) |
|---|---|---|---|
| 2 | 5'6 ± 0'6 | 85 | 0'17 |
| 2'5 | 7'6 ± 0'9 | 141 | 0'28 |
| 3'0 | 9'6 ± 0'5 | 155 | 0'31 |
| 3'5 | 11'6 ± 0'8 | 203 | 0'40 |
| 4'0 | 17'1 ± 0'9 | 260 | 0'52 |
| 4'5 | 23'8 ± 0'7 | 353 | 0'71 |
| 5'0 | 25'1 ± 0'9 | 430 | 0'86 |
| 5'5 | 35'9 ± 1'2 | 594 | 1'19 |

## 3.3. INFLUENCIA HORMONAL SOBRE LA LIBERACION DE TPA

Los valores de cantidad de DNA y de concentración de antígeno TPA en medios de cultivo de células MCF-7 sometidas a la acción de diversas sustancias de acción hormonal y antihormonal (concentración ensayada $10^{-7}$M) se exponen en la tabla III - 5. El dato correspondiente al TPA resulta del análisis efectuado sobre alícuotas homogéneas de los sucesivos medios nutrientes que se utilizan para mantener las células en el cultivo. En todos los casos se especifica el valor medio y la desviación estandar de los cuatro ensayos correspondientes a cada grupo. Los resultados obtenidos se han comparado con un grupo de células MCF-F no sometido a tratamiento hormonal ni a la acción de antihormonas (experimento control).

# T A B L A  III - 5

Influencia de hormonas y antihormonas sobre la liberación de TPA.

| HORMONA ($10^{-7}$M) | [DNA] (µg) | [TPA] (U/L) | [TPA] (U) |
|---|---|---|---|
| ---(*) | 13'0 ± 0'5 | 6692 ± 301 | 13'38 |
| 17βE₂ | 12'4 ± 0'6 | 6764 ± 242 | 13'49 |
| 17βE₂ | 13'0 ± 0'4 | 6601 ± 278 | 13'20 |
| E₁ | 13'2 ± 0'5 | 6972 ± 226 | 13'94 |
| DES | 13'0 ± 0'4 | 6711 ± 218 | 13'42 |
| OH-TAM | 8'1 ± 0'2 | 4126 ± 180 | 8'25 |

(*): Experimento control

17 β $E_2$ = 17 β Estradiol

17 α $E_2$ = 17 α Estradiol

$E_1$ = Estrona

DES: Dietilestilbestrol

OH-TAM: Hidroxitamoxifeno

## 3.4. LIBERACION DE TPA POR CELULAS MCF-7 PARCIALMENTE SINCRONIZADAS

El tratamiento con OH-TAM $10^{-7}$M durante 72 horas y el rescate de la población celular MCF-7 con 17βE$_2$ o mediante simple cambio de medio permiten estudiar la proliferación celular en condiciones próximas al crecimiento síncrono de todos los elementos existentes en el cultivo. Los resultados obtenidos en lo que al crecimiento celular y a la liberación del TPA al medio nutriente se refiere, se recogen en la tabla III - 6.

# T A B L A  III - 6

Liberación de TPA en células sometidas a OH-TAM $10^{-7}$M / 72 horas y rescatados posteriormente con 17βE₂.

| GRUPO | TIEMPO (horas) | DNA (µg) | TPA (U/L) | TPA (U) |
|---|---|---|---|---|
| --- | 0(*) | 1'0 | 2164 | 4'33 |
| CONTROL | 24 | 2'1 ± 0'4 | 3664 | 7'32 |
| | 48 | 4'0 ± 0'8 | 5185 | 10'37 |
| | 72 | 7'6 ± 0'5 | 8086 | 16'17 |
| 17 β $E_2$ | 24 | 2'7 ± 0'5 | 3664 | 7'32 |
| | 48 | 5'7 ± 0'4 | 5519 | 11'03 |
| | 72 | 9'6 ± 0'4 | 10125 | 21'65 |

(*) El valor para t=0 corresponde a la cuantificación de TPA en el medio de cultivo de células MCF-7 expuestas durante 72 horas a OH-TAM $10^{-7}$M.

## 3.5. CINETICA DELIBERACION DE TPA EN CELULAS MCF-7 PARCIALMENTE SINCRONIZADAS

Los resultados del crecimiento celular (valores de DNA) y del estudio de liberación de TPA en células sometidas a OH-TAM $10^{-7}$M durante 72 horas y "rescatadas" en medio MEM + FCS + 17$\beta$E$_2$ $10^{-7}$M se ofrecen en las tablas III - 7 y III - 8.

# T A B L A III - 7

Proliferación celular de la población MCF-7 tras tratamiento con OH-TAM $10^{-7}$M durante 72 horas y rescate posterior con MEM + FCS + 17βE$_2$ $10^{-7}$M.

| TIEMPO (horas) | DNA (µg) |
|---|---|
| 6 | 6'0 |
| 12 | 6'5 |
| 18 | 8'3 |
| 24 | 10'7 |
| 30 | 11'3 |
| 36 | 13'3 |
| 42 | 18'0 |
| 48 | 20'8 |
| 54 | 23'0 |
| 60 | 31'8 |
| 66 | 34'3 |
| 72 | 35'2 |
| 96 | 41'8 |
| 120 | 65'1 |
| 144 | 74'5 |

# T A B L A  III - 8

Liberación celular de TPA por células MCF-7 sometidas a tratamiento con OH-TAM durante 72 horas y rescate posterior con MEM + FCS + 17βE$_2$ $10^{-7}$M

| TIEMPO (horas) | TPA (U) | DNA (µg) |
|---|---|---|
| 6 | 3440 | 8'60 |
| 12 | 3800 | 9'50 |
| 18 | 4380 | 10'95 |
| 24 | 4536 | 11'34 |
| 30 | 4960 | 12'40 |
| 36 | 6076 | 15'19 |
| 42 | 6664 | 16'66 |
| 48 | 7880 | 19'70 |
| 54 | 8356 | 20'89 |
| 60 | 10516 | 26'29 |
| 66 | 11108 | 27'77 |
| 72 | 11540 | 28'85 |

## 3.6. EFECTO DEL EPIDERMAL GROWTH FACTOR (EGF) SOBRE CULTIVOS SINCRONICOS DE CELULAS MCF-7

Los datos correspondientes al estudio de la actividad mitógena del EGF sobre células MCF-7 previamente tratadas con MEM + FCS (Grupo Control) o MEM + FCS + EGF, 10 ng/ml (Grupo EGF) se presentan en la tabla III - 9. Los resultados del crecimiento celular, en términos de DNA, corresponden al valor medio y la desviación estandar de cada grupo de 5 ensayos realizados.

La tabla III - 10 recoge los resultados de un experimento realizado en paralelo en el que se utiliza como suplemento del Medio Esencial Mínimo (MEM) suero de feto de ternera tratado con carbón-dextrano: FCS(s).

# T A B L A  III - 9

Influencia del EGF sobre el crecimiento celular y la liberación de TPA en células MCF-7. Grupos FCS.

| GRUPO | TIEMPO (horas) | DNA (µg) | TPA (U) |
|---|---|---|---|
| --- | 0(*) | 13'3 ± 1'7 | 7'84 |
| CONTROL | 24 | 20'6 ± 1'1 | 11'67 |
| | 48 | 30'4 ± 3'4 | 14'87 |
| | 72 | 39'0 ± 2'9 | 32'50 |
| | 96 | 39'3 ± 2'2 | 69'63 |
| + EGF | 24 | 23'3 ± 1'5 | 10'72 |
| | 48 | 29'3 ± 3'1 | 14'80 |
| | 72 | 39'2 ± 2'5 | 33'03 |
| | 96 | 39'9 ± 0'2 | 67'55 |

(*) Las cifras de TPA y DNA correspondientes a t=0 son las encontradas en el cultivo tratado durante 72 horas con OH-TAM $10^{-7}$M que constituye, en este experimento, el origen de la escala de tiempos.

# T A B L A  III - 10

Influencia del EGF sobre el crecimiento celular y la liberación de TPA en células MCF-7. Grupos FCS(s).

| GRUPO | TIEMPO (horas) | DNA (µg) | TPA (U) |
|---|---|---|---|
| --- | 0(*) | 13'3 ± 1'7 | 7'64 |
| CONTROL | 24 | 17'9 ± 1'8 | 11'42 |
| | 48 | 28'1 ± 4'0 | 15'83 |
| | 72 | 40'3 ± 2'3 | 28'17 |
| | 96 | 41'3 ± 3'1 | 56'58 |
| + EGF | 24 | 19'1 ± 1'5 | 11'11 |
| | 48 | 29'5 ± 3'1 | 15'88 |
| | 72 | 38'4 ± 0'8 | 28'94 |
| | 96 | 42'8 ± 3'2 | 65'83 |

(*) Las cifras de TPA y DNA correspondientes a t=0 son las encontradas en el cultivo tratado durante 72 horas con OH-TAM $10^{-7}$M que constituye, en este experimento, el origen de la escala de tiempos.

## 3.7. EFECTO DEL EGF SOBRE LA INCORPORACION DE TIMIDINA TRITIADA A LAS CELULAS DE LA POBLACION MCF-7

Los valores de cantidad de timidina tritiada ($^{3}$HTdR), expresados en desintegraciones por minuto, que incorporan las células MCF-7 ensayadas a distintos tiempos (origen de tiempo: "rescate" de la población celular tratada durante 72 horas con OH-TAM $10^{-7}$M), se ofrecen en las tablas III - 11 (Grupo A: MEM + FCS; Grupo B: MEM + FCS + EGF 10 ng/ml) y III - 12 (Grupo C: MEM + FCS(s) y Grupo D: MEM + FCS(s) + EGF 10 ng/ml).

# T A B L A  III - 11

Incorporación de $^{3}$HTdR a células MCF-7 sincronizadas. Grupos FCS.

| GRUPO | TIEMPO (horas) | DNA (µg) | $^{3}$HTdR (dpm × $10^{3}$) |
|---|---|---|---|
| --- | 0(*) | 13'3 | 509 |
| A | 6 | ---- | 314 |
| | 12 | ---- | 631 |
| | 18 | ---- | 933 |
| | 24 | 20'6 | 922 |
| | 30 | ---- | 112 |
| B | 6 | ---- | 223 |
| | 12 | ---- | 616 |
| | 18 | ---- | 914 |
| | 24 | 23'3 | 1053 |
| | 30 | ---- | 144 |

(*) Las cifras de DNA y $^{3}$HTdR correspondientes a t=0 son las encontradas en el cultivo tratado durante 72 horas con OH-TAM $10^{-7}$M.

# T A B L A  III - 12

Incorporación de $^{3}$HTdR a células MCF-7 sincronizadas. Grupos FCS(s).

| GRUPO | TIEMPO (horas) | DNA (µg) | $^{3}$HTdR (dpm × $10^{3}$) |
|---|---|---|---|
| --- | 0(*) | 13'3 | 509 |
| C | 6 | ---- | 369 |
| | 12 | ---- | 539 |
| | 18 | ---- | 632 |
| | 24 | 17'9 | 761 |
| | 30 | ---- | 97 |
| D | 6 | ---- | 187 |
| | 12 | ---- | 588 |
| | 18 | ---- | 770 |
| | 24 | 19'1 | 887 |
| | 30 | ---- | 102 |

(*) Las cifras de DNA y $^{3}$HTdR correspondientes a t=0 son las encontradas en el cultivo tratado durante 72 horas con OH-TAM $10^{-7}$M.

## 3.8. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD DEL EGF SOBRE CELULAS MCF-7

Los resultados obtenidos en la investigación de la actividad mitógena del EGF, ensayado a diversas concentraciones, en presencia y en ausencia de FCS(s) se exponen en las tablas III - 13 a III - 19.

# T A B L A  III - 13

Acción del EGF sobre cultivos de células MCF-7 sincronizadas.

| GRUPO | TIEMPO (horas) | DNA (µg) | TPA (U) |
|---|---|---|---|
| --- | 0(*) | 11'8 ± 0'2 | 3'45 |
| CONTROL | 24 | 15'8 ± 0'6 | 6'45 |
| +FCS(s) | 48 | 20'9 ± 1'5 | 10'55 |
| [EGF]=0 | 72 | 23'2 ± 2'6 | 21'34 |
| | 96 | 27'4 ± 2'6 | 83'66 |

(*) Los valores de DNA y TPA correspondientes a t=0 se obtuvieron en cultivos sometidos a OH-TAM $10^{-7}$M durante 72 horas (origen de tiempos en el experimento).

# T A B L A  III - 14

Acción del EGF sobre cultivos de células MCF-7 sincronizadas.

| GRUPO | TIEMPO (horas) | DNA (µg) | TPA (U) |
|---|---|---|---|
| --- | 0(*) | 11'8 ± 0'2 | 3'45 |
| 1 | 24 | 15'3 ± 0'6 | 7'43 |
| +FCS(s) | 48 | 16'4 ± 1'6 | 9'96 |
| [EGF] = | 72 | 23'9 ± 1'5 | 16'54 |
| 1 ng/ml | 96 | 25'3 ± 1'5 | 67'54 |

(*) Los valores de DNA y TPA correspondientes a t=0 se obtuvieron en cultivos sometidos a OH-TAM $10^{-7}$M durante 72 horas (origen de tiempos en el experimento).

# T A B L A  III - 15

Acción del EGF sobre cultivos de células MCF-7 sincronizadas.

| GRUPO | TIEMPO (horas) | DNA (µg) | TPA (U) |
|---|---|---|---|
| --- | 0(*) | 11'8 ± 0'2 | 3'45 |
| 2 | 24 | 15'1 ± 0'5 | 7'65 |
| +FCS(s) | 48 | 20'8 ± 1'4 | 11'80 |
| [EGF] = | 72 | 31'3 ± 1'9 | 23'05 |
| 10 ng/ml | 96 | 31'7 ± 1'7 | 89'55 |

(*) Los valores de DNA y TPA correspondientes a t=0 se obtuvieron en cultivos sometidos a OH-TAM $10^{-7}$M durante 72 horas (origen de tiempos en el experimento).

# T A B L A  III - 16

Acción del EGF sobre cultivos de células MCF-7 sincronizadas.

| GRUPO | TIEMPO (horas) | DNA (µg) | TPA (U) |
|---|---|---|---|
| --- | 0(*) | 11'8 ± 0'2 | 3'45 |
| 3 | 24 | 12'3 ± 2'2 | 6'70 |
| +FCS(s) | 48 | 23'0 ± 1'1 | 12'92 |
| [EGF] = | 72 | 25'9 ± 2'5 | 22'07 |
| 100 ng/ml | 96 | 25'4 ± 2'6 | 73'19 |

(*) Los valores de DNA y TPA correspondientes a t=0 se obtuvieron en cultivos sometidos a OH-TAM $10^{-7}$M durante 72 horas (origen de tiempos en el experimento).

# T A B L A  III - 17

Acción del EGF sobre cultivos de células MCF-7 sincronizadas.

| GRUPO | TIEMPO (horas) | DNA (µg) | TPA (U) |
|---|---|---|---|
| --- | 0(*) | 11'8 ± 0'2 | 3'45 |
| 4 | 24 | 9'1 ± 0'4 | 42'69 |
| -FCS(s) | 48 | 5'0 ± 2'1 | 79'59 |
| [EGF] = | 72 | ---- | --- |
| 1 ng/ml | 96 | ---- | --- |

(*) Los valores de DNA y TPA correspondientes a t=0 se obtuvieron en cultivos sometidos a OH-TAM $10^{-7}$M durante 72 horas (origen de tiempos en el experimento).

# T A B L A  III - 18

Acción del EGF sobre cultivos de células MCF-7 sincronizadas.

| GRUPO | TIEMPO (horas) | DNA (µg) | TPA (U) |
|---|---|---|---|
| --- | 0(*) | 11'8 ± 0'2 | 3'45 |
| 6 | 24 | 4'7 ± 0'4 | 43'45 |
| -FCS(s) | 48 | 6'2 ± 0'9 | 73'85 |
| [EGF] = | 72 | ---- | --- |
| 10 ng/ml | 96 | ---- | --- |

(*) Los valores de DNA y TPA correspondientes a t=0 se obtuvieron en cultivos sometidos a OH-TAM $10^{-7}$M durante 72 horas (origen de tiempos en el experimento).

# T A B L A  III - 19

Acción del EGF sobre cultivos de células MCF-7 sincronizadas.

| GRUPO | TIEMPO (horas) | DNA (µg) | TPA (U) |
|---|---|---|---|
| --- | 0(*) | 11'8 ± 0'2 | 3'45 |
| 6 | 24 | 7'4 ± 1'2 | 41'34 |
| -FCS(s) | 48 | 6'2 ± 0'5 | 77'01 |
| [EGF] = | 72 | ---- | --- |
| 100 ng/ml | 96 | ---- | --- |

(*) Los valores de DNA y TPA correspondientes a t=0 se obtuvieron en cultivos sometidos a OH-TAM $10^{-7}$M durante 72 horas (origen de tiempos en el experimento).

## 3.9. DESTRUCCION CELULAR QUIMIO-INDUCIDA Y LIBERACION DE TPA

Los resultados de supervivencia celular obtenidos tras la exposición de cultivos de celulas MCF-7 a la acción de drogas diversas: ADM, 5-FU, VCR y MTX junto con los datos correspondientes al análisis radioinmulogico de TPA en el medio de cultivo se muestran en las tablas III - 20 a III - 23.

# T A B L A  III - 20

Destrucción celular quimioinducida y liberación de TPA.

| [ADM] (µg/ml) | DNA (µg) | TPA (U) |
|---|---|---|
| 0 | 16'4 ± 0'8 | 4'86 |
| 0'005 | 12'8 ± 1'3 | 10'87 |
| 0'05 | 12'1 ± 1'0 | 10'81 |
| 0'1 | 10'9 ± 1'2 | 11'76 |
| 0'2 | 8'5 ± 0'6 | 12'67 |
| 0'4 | 2'4 ± 0'7 | 15'07 |
| 0'5 | 2'4 ± 0'7 | 19'70 |

# T A B L A  III - 21

Destrucción celular quimioinducida y liberación de TPA.

| [5-FU] (µg/ml) | DNA (µg) | TPA (U) |
|---|---|---|
| 0 | 14'3 ± 0'5 | 7'23 |
| 0'5 | 14'3 ± 0'6 | 7'59 |
| 1 | 13'7 ± 1'3 | 8'87 |
| 2 | 12'3 ± 1'1 | 9'89 |
| 4 | 11'6 ± 0'6 | 10'74 |
| 5 | 10'0 ± 1'5 | 11'76 |

# T A B L A  III - 22

Destrucción celular quimioinducida y liberación de TPA.

| [VCR] (µg/ml) | DNA (µg) | TPA (U) |
|---|---|---|
| 0 | 16'4 ± 0'8 | 4'86 |
| 0'005 | 9'6 ± 0'5 | 9'73 |
| 0'05 | 3'7 ± 0'4 | 17'84 |
| 0'1 | 3'6 ± 0'5 | 19'92 |
| 0'2 | 2'9 ± 1'1 | 21'01 |
| 0'4 | 2'5 ± 1'0 | 25'72 |
| 0'5 | 2'0 ± 0'8 | 26'94 |

# T A B L A  III - 23

Destrucción celular quimioinducida y liberación de TPA.

| [MTX] (µg/ml) | DNA (µg) | TPA (U) |
|---|---|---|
| 0 | 16'4 ± 0'8 | 4'86 |
| 0'005 | 16'4 ± 0'9 | 8'43 |
| 0'05 | 16'2 ± 1'3 | 8'81 |
| 0'1 | 15'3 ± 0'3 | 9'18 |
| 0'2 | 14'0 ± 0'8 | 10'58 |
| 0'4 | 9'4 ± 0'8 | 11'95 |
| 0'5 | 5'9 ± 1'4 | 13'59 |

## 3.10. CINETICA DE LA LIBERACION DE TPA AL MEDIO DE CULTIVO DE CELULAS MCF-7 TRATADAS CON CITOSTATICOS

Los resultados de la evolución, en función del tiempo, de cultivos celulares MCF-7 tratados con ADM, 5-FU, VCR y MTX se exponen en las tablas III - 24 a III - 27. En dichas tablas se incluye el crecimiento celular de la población tratada con la droga y la liberación del antígeno TPA al medio de cultivo. Los grupos celulares ensayados han sido previamente sometidos a la acción del OH-TAM durante 72 horas y tratados, brevemente, con el agente citotóxico. A partir del tratamiento químico se inicia la escala de tiempos del experimento.

# T A B L A  III - 24

Cinética de la liberación de TPA por células MCF-7 sometidas a tratamiento con agentes citotóxicos.

| [ADM] (0'1 µg/ml) | TIEMPO (horas) | DNA (µg) | TPA (U) |
|---|---|---|---|
| | 2 | 7'0 ± 1'0 | 3'41 |
| | 4 | 8'3 ± 0'4 | 4'52 |
| | 6 | 8'5 ± 0'5 | 4'52 |
| | 8 | 9'3 ± 0'5 | 4'52 |
| | 10 | 9'6 ± 0'3 | 3'88 |
| | 12 | 9'8 ± 0'8 | 3'80 |
| | 18 | 10'6 ± 0'5 | 4'79 |
| | 24 | 10'8 ± 0'1 | 5'04 |
| | 30 | 11'6 ± 0'5 | 6'53 |
| | CONTROL FINAL | 14'5 ± 0'6 | 5'65 |
| | CONT. INICIAL | 6'4 ± 0'1 | 2'23 |

# T A B L A  III - 25

Cinética de la liberación de TPA por células MCF-7 sometidas a tratamiento con agentes citotóxicos.

| [5-FU] (5 µg/ml) | TIEMPO (horas) | DNA (µg) | TPA (U) |
|---|---|---|---|
| | 2 | 7'2 ± 0'8 | 3'65 |
| | 4 | 7'5 ± 0'3 | 4'60 |
| | 6 | 8'3 ± 0'6 | 4'04 |
| | 8 | 8'5 ± 0'6 | 4'10 |
| | 10 | 8'8 ± 0'2 | 4'18 |
| | 12 | 8'9 ± 0'2 | 5'40 |
| | 18 | 10'9 ± 0'8 | 5'84 |
| | 24 | 10'9 ± 0'3 | 4'39 |
| | 30 | 11'8 ± 0'3 | 6'19 |
| | CONTROL FINAL | 14'5 ± 0'6 | 5'65 |
| | CONT. INICIAL | 6'4 ± 0'1 | 2'23 |

# T A B L A  III - 26

Cinética de la liberación de TPA por células MCF-7 sometidas a tratamiento con agentes citotóxicos.

| [VCR] (0'01 µg/ml) | TIEMPO (horas) | DNA (µg) | TPA (U) |
|---|---|---|---|
| | 2 | 5'8 ± 0'2 | 4'29 |
| | 4 | 7'5 ± 0'8 | 3'98 |
| | 6 | 8'1 ± 0'7 | 4'30 |
| | 8 | 9'0 ± 0'4 | 4'38 |
| | 10 | 9'4 ± 0'5 | 4'62 |
| | 12 | 9'6 ± 0'4 | 5'36 |
| | 18 | 10'7 ± 0'9 | 5'98 |
| | 24 | 11'9 ± 0'5 | 9'45 |
| | 30 | 12'3 ± 0'4 | 12'75 |
| | CONTROL FINAL | 14'5 ± 0'6 | 5'65 |
| | CONT. INICIAL | 6'4 ± 0'1 | 2'23 |

# T A B L A  III - 27

Cinética de la liberación de TPA por células MCF-7 sometidas a tratamiento con agentes citotóxicos.

| [MTX] (0'5 µg/ml) | TIEMPO (horas) | DNA (µg) | TPA (U) |
|---|---|---|---|
| | 2 | 6'6 ± 1'0 | 5'95 |
| | 4 | 7'8 ± 0'6 | 7'50 |
| | 6 | 7'7 ± 0'7 | 6'26 |
| | 8 | 8'4 ± 0'5 | 6'48 |
| | 10 | 8'4 ± 0'2 | 5'43 |
| | 12 | 8'5 ± 0'2 | 6'17 |
| | 18 | 8'6 ± 0'2 | 7'54 |
| | 24 | 8'7 ± 0'8 | 9'54 |
| | 30 | 10'2 ± 0'8 | 7'35 |
| | CONTROL FINAL | 14'5 ± 0'6 | 5'65 |
| | CONT. INICIAL | 6'4 ± 0'1 | 2'23 |

# DISCUSION

# IV. DISCUSION

## 4.1. DEMOSTRACION DE LA PRESENCIA DE TPA EN EL MEDIO DE CULTIVO DE CELULAS MCF-7 Y EVSA-T

La glándula mamaria normal requiere, para su desarrollo, de concentraciones fisiológicas de estradiol. Los estrógenos, por otra parte, juegan un papel importante de la etiología del cáncer de mama (181). Está demostrado, a este respecto, que si no existe estimulación estrogénica (por ejemplo, en el caso de fallo ovárico primario), la incidencia del cáncer de mama se reduce a sólo el 1% de la que ocurre en la mujer normal (182). Se sabe también que algunos cánceres de mama humanos pueden regresar tras ovariectomía (102). La investigación básica en cáncer de mama nos ha permitido conocer además que, en situación clínica de enfermedad metastásica abierta, aproximadamente la tercera parte de los casos conservan la expresión del fenotipo hormonodependiente que caracteriza a la mama normal. Como la hormonoterapia no se utiliza en el tratamiento inicial del cáncer de mama (estadios I y II) no tenemos datos clínicos que demuestren la hormonorrespuesta de los tumores locales o locorregionales. Sin embargo, a través de múltiples experimentos, se conoce que los estrógenos son responsables del continuo crecimiento de los tumores hormonodependientes de la mama. En la base de esta afirmación se encuentran, entre otros, los siguientes hechos:

1) La supresión de las fuentes corporales de estrógenos (ovarios y adrenales) o la terapia con antiestrógenos consigue la regresión del tumor o la paliación de la sintomatología clínica en un determinado número de casos.

2) La respuesta a la endocrinoterapia se asocia de manera estadísticamente significativa a la presencia en el tumor de receptores celulares específicos para los estrógenos.

3) La administración de dosis fisiológicas de estrógenos a mujeres postmenopáusicas o castradas puede estimular la proliferación tumoral "in vivo".

La experimentación "in vitro" ha demostrado, además, que los estrógenos regulan las secreciones de ciertas proteínas específicas entre las que se incluyen factores de crecimiento de acción autocrina y paracrina. Estos factores son responsables de la entrada de células quiescentes en el compartimento proliferativo de la estimulación del crecimiento de los elementos celulares que se encuentran en ciclo mitótico, de la facilitación de la invasividad celular y, por último, de la secreción de macromoléculas capaces de inducir la aparición de características malignas en células no transformadas.

El mecanismo por el que los estrógenos estimulan el crecimiento de las células de cáncer de mama no ha sido descrito en su totalidad y la mayor parte de nuestros conocimientos acerca de este tema derivan de la