

DEPARTAMENTO DE RADIOLOGIA Y MEDICINA FISICA,
FACULTAD DE MEDICINA, UNIVERSIDAD DE GRANADA.

TESIS DOCTORAL.

"ASPECTOS CLINICOS Y EXPERIMENTALES DE LA HORMONODEPENDENCIA TUMORAL EN CANCER DE MAMA".

MARIA DEL ROSARIO DEL MORAL AVILA

ASPECTOS CLINICOS Y EXPERIMENTALES DE LA HORMO-
NODEPENDENCIA TUMORAL EN CANCER DE MAMA.

Tesis presentada por D^a Maria
del Rosario del Moral Avila,
para optar al Grado de Doctor
en Medicina de la Universidad
de Granada.

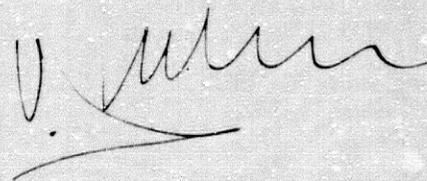


a Juan José

D. VICENTE PEDRAZA MURIEL, CATEDRATICO 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 la Universidad de Granada, D^a María del Rosario del Moral Avila, sobre el tema: "ASPECTOS CLINICOS Y EXPERIMENTALES DE LA HORMONODEPENDENCIA TUMORAL EN CANCER DE MAMA", ha sido realizada bajo mi dirección, siendo expresión de la capacidad técnica e interpretativa de su autora, en condiciones tan aventajadas que le hacen acreedora al grado de Doctor en Medicina, siempre que así lo considere el citado Tribunal. Lo que certifico en Granada a dos de junio de mil novecientos ochenta y siete.

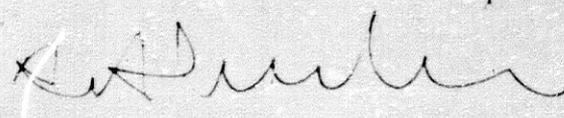


Fdo.: Vicente Pedraza Muriel

D. 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 la Universidad de Granada, D^a Maria del Rosario del Moral Avila, sobre el tema: "ASPECTOS CLINICOS Y EXPERIMENTALES DE LA HORMONODEPENDENCIA TUMORAL EN CANCER DE MAMA", ha sido realizada bajo mi dirección, siendo expresión de la capacidad técnica e interpretativa de su autora, en condiciones tan aventajadas que le hacen acreedora al grado de Doctor en Medicina, siempre que así lo considere el citado Tribunal.
Lo que certifico en Granada a dos de junio de m.l novecientos ochenta y siete.


Edo.: Mariano Ruiz de Almodovar Rivera

AGRADECIMIENTOS.

Al Profesor Vicente Pedraza Muriel, Catedrático de Radiología y Medicina Física de la Universidad de Granada, por haberme permitido la realización del presente trabajo, poniendo a mi alcance todos los medios necesarios.

Al Profesor J. Mariano Ruiz de Almodovar Rivera, Profesor Titular de Radiología y Medicina Física tengo que agradecerle la inestimable dedicación mostrada en esta memoria desde la confección del proyecto original hasta la obtención de los últimos resultados. Su apoyo ha sido constante durante todo el tiempo de realización del presente trabajo.

Al Profesor Nicolás Olea Serrano, Profesor Titular de Radiología y Medicina Física, al Doctor Juan Villalba Moreno y al resto de mis compañeros del laboratorio por su incondicional ayuda.

A Juan Carlos Fernandez Rodriguez y a Juan de Dios López-Gonzalez Garrido, con los cuales me he iniciado en las técnicas de cultivo de laboratorio y a Concepción Martín Sánchez por la asistencia prestada en el mantenimiento de la infraestructura necesaria para la realización del presente trabajo.

A Juan José, Consuelo, Luis y Francisco Javier por la inapreciable ayuda en la elaboración técnica de esta tesis.

Al Profesor G. Leclercq, Profesor del Instituto Jules Bordet de Bruselas por habernos proporcionado parte del material biológico empleado en el presente estudio.

Al Profesor José Luis García Puche, Profesor Titular del Departamento de Radiología y Medicina Física y Jefe del Servicio de Radioterapia y Oncología y al resto de mis compañeros del Servicio. En muchas ocasiones, ellos se encargaron de recoger el material clínico base de este estudio.

COLABORADORES:

Dr. Nicolás Olea Serrano, Profesor Titular del Departamento de Radiología y Medicina Física.

Dr. Juan Villalba Moreno, adscrito al Departamento de Radiología y Medicina Física.

• Dra. Eduarda Molina Alcaide, Colaboradora Científica de la Unidad Estructural de Investigación de Fisiología Animal (C.S.I.C.).

Dr. Andrés González Carmona, Profesor Titular de Estadística e Investigación Operativa.

INDICE

INDICE.

1. INTRODUCCION.....	9
1.1. CANCER DE MAMA. GENERALIDADES.....	9
1.2. PRINCIPIOS TERAPEUTICOS EN CANCER DE MAMA.....	11
1.2.1. Papel de la irradiación postoperatoria.....	11
1.3. RESUMEN.....	39
1.4. EL CANCER DE MAMA COMO ENFERMEDAD SISTEMICA.....	40
1.4.1. Estimación de la masa tumoral residual.....	44
1.4.2. Heterogeneidad celular tumoral.....	46
1.5. TERAPIA SISTEMICA ADYUVANTE EN CANCER DE MAMA.....	59
1.5.1. Quimioterapia.....	59
1.5.1.1. Eficacia de la quimioterapia adyuvante en relación a factores determinantes del pronóstico.....	62
1.5.2. Tratamiento endocrino adyuvante.....	67
1.5.2.1. Selección de pacientes para el trata- miento hormonal.....	69
1.5.2.2. La determinación de receptores hormo- nales.....	70
1.5.2.3. Receptores de estrógenos y pronóstico en cancer de mama.....	74

1.5.2.4.	Teoría actual de la acción estrogénica..	77
1.5.2.5.	Síntesis y degradación del receptor.....	80
1.5.2.6.	Efecto del crecimiento celular sobre los niveles de receptores de estróge- nos.....	82
1.6.	OBJETIVOS.....	84
2.	MATERIAL Y METODOS.....	88
2.1.	INSTRUMENTACION.....	88
2.1.1.	Congeladores.....	88
2.1.2.	Cámara frigorífica.....	89
2.1.3.	Pulverizador.....	89
2.1.4.	Homogeneizador.....	89
2.1.5.	Ultracentrífuga.....	90
2.1.6.	Centrífuga refrigerada.....	90
2.1.7.	Centrífuga.....	91
2.1.8.	Contador de centelleo líquido.....	91
2.1.9.	Espectrofotómetro.....	94
2.1.10.	Balanza de precisión.....	95
2.1.11.	pH metro.....	95
2.1.12.	Estufa para cultivos celulares.....	95
2.1.13.	Cámara de flujo laminar.....	96
2.1.14.	Microscopio invertido.....	97
2.1.15.	Unidad de filtración.....	97
2.2.	REACTIVOS.....	97
2.2.1.	Hormonas radiactivas.....	97
2.2.2.	Hormonas no radiactivas.....	99

2.2.3.	Soluciones tampón.....	99
2.2.4.	Carbón dextrano.....	100
2.2.5.	Líquido de centelleo.....	100
2.2.6.	Medios de cultivo celular.....	101
2.2.7.	Enzimas.....	101
2.2.8.	Precursores marcados.....	102
2.2.9.	Factores de crecimiento.....	102
2.3.	MATERIAL BIOLÓGICO.....	103
2.3.1.	Muestras de carcinoma mamario humano.....	103
2.3.2.	Serie clínica: características.....	103
2.3.3.	Modelo biológico de cáncer de mama.....	104
2.3.3.1.	Cultivos celulares.....	111
2.3.3.2.	Línea celular MCF-7.....	115
2.3.3.3.	Línea celular EVSA-T.....	119
2.3.4.	Otro material.....	122
2.3.4.1.	Frascos y discos de cultivo.....	122
2.3.4.2.	Pipetas.....	122
2.3.4.3.	Filtros.....	123
2.3.4.4.	Otro material fungible.....	123
2.4.	MÉTODOS.....	124
2.4.1.	Estimación de la probabilidad de supervivencia en pacientes afectas de cáncer de mama.....	124
2.4.2.	Ensayo de receptores de estrógenos y progesterona en cáncer de mama.....	126
2.4.2.1.	Obtención del citosol.....	126
2.4.2.2.	Cuantificación de proteínas.....	127
2.4.2.3.	Análisis de saturación.....	129

2.4.2.4.	Transformación matemática de Scatchard.....	132
2.4.3.	Cuantificación de DNA.....	141
2.4.4.	Ensayo de receptores de estrógenos y progesterona en células intactas.....	143
2.4.5.	Cinética de proliferación de la población celular MCF-7.....	145
2.4.5.1.	Efecto del suero fetal tratado con carbón dextrano sobre el crecimiento de las células MCF-7.....	146
2.4.5.2.	Influencia del EGF sobre el crecimiento de MCF-7.....	147
2.4.5.3.	Crecimiento de células MCF-7 en presencia de EGF. Influencia de los estrógenos endógenos.....	148
2.4.5.4.	Cinética de proliferación celular MCF-7 en ausencia de FCS. Efecto del EGF.....	149
2.4.6.	Incorporación de precursores marcados a células MCF-7.....	150
2.4.7.	Receptores de estrógenos y progesterona en diferentes fases del ciclo celular.....	152
3.	RESULTADOS.....	155
3.1.	ESTIMACION DE LA PROBABILIDAD DE SUPERVIVENCIA GLOBAL Y SUPERVIVENCIA LIBRE DE ENFERMEDAD EN CANCER DE MAMA....	155
3.2.	CICLO CELULAR Y CONTENIDO DE RECEPTORES DE ESTROGENOS Y PROGESTERONA.....	216

3.2.1.	Crecimiento de la población celular sincronizada MCF-7. Rescate con MEM + FCS.....	216
3.2.2.	Crecimiento de la población celular sincronizada MCF-7. Rescate con MEM + FCS _{es}	218
3.2.3.	Crecimiento de la población celular sincronizada MCF-7. Rescate con MEM + FCS _{es} + GF.....	218
3.2.4.	Influencia del FCS y FCS _{es} combinados con EGF sobre el crecimiento celular en cultivos de células MCF-7 sincronizadas.....	223
3.2.5.	Incorporación de timidina tritiada en cultivos de células MCF-7 sincronizadas.....	225
3.2.6.	Receptores de estrógenos y progesterona en dife- rentes fases del ciclo celular.....	227
4.	DISCUSION.....	253
4.1.	CRECIMIENTO Y DISEMINACION DEL CANCER DE MAMA.....	253
4.2.	FACTORES DE PRONOSTICO EN CANCER DE MAMA.....	259
4.2.1.	Tamaño del tumor.....	259
4.2.2.	Estado de los linfáticos axilares.....	267
4.2.3.	Receptores de estrógenos.....	276
4.2.4.	Receptores de progesterona.....	291
4.2.5.	Grado histológico de diferenciación.....	297
4.3.	CANCER DE MAMA: ACTIVIDAD PROLIFERATIVA CELULAR Y HORMONODEPENDENCIA TUMORAL.....	301
4.3.1.	Cinética de proliferación celular en cultivos MCF-7.....	304

4.3.2.	Efecto del tamoxifeno sobre la proliferación de células MCF-7.....	305
4.3.3.	Efecto del estradiol sobre cultivos celulares MCF-7 parcialmente sincronizados en fase G ₀ -G ₁	308
4.3.4.	Efecto del EGF sobre cultivos celulares MCF-7 parcialmente sincronizados en fase G ₀ -G ₁	313
4.3.5.	Efecto del EGF sobre la incorporación de timidina en células MCF-7 parcialmente sincronizadas...	331
4.3.6.	Receptores de estrógenos y progesterona y ciclo celular.....	333
4.3.7.	Influencia del EGF sobre la evolución de los niveles de receptores en células MCF-7 sincronizadas.....	355
4.4.	HIPOTESIS FINAL.....	369
5.	CONCLUSIONES.....	389
6.	BIBLIOGRAFIA.....	398

INTRODUCCION

I. INTRODUCCION.

1.1. CANCER DE MAMA. GENERALIDADES.

El cáncer de mama es, en la actualidad, el tumor maligno de mayor incidencia en el sexo femenino (6,45,311) y la segunda causa de muerte por enfermedad neoplásica, tras el cáncer de pulmón, en la mujer (6). Según datos de la American Cancer Society, parece probable, que una de cada once mujeres pueda desarrollar un cáncer de mama clínico a lo largo de su vida (5,6). Si se tiene en cuenta, además, que el 46% de las mujeres que presentan cáncer de mama acaban muriendo por esta enfermedad y que desde el punto de vista etiológico, la vida en países industrializados, en su más amplio sentido representa -por encima de elementos causa-

les genéticos, hormonales o raciales- la mayor amenaza para la aparición de cáncer de mama en una mujer determinada, resulta fácil entender la importancia médica y social del problema.

Las cifras de supervivencia a largo plazo (5 o más años) han experimentado por otra parte en los últimos cincuenta años, sólo leves modificaciones (10% de incremento máximo según datos de Cutler (63)) y ello, más que a la eficacia de las distintas modalidades de tratamiento utilizadas, se debe a los esfuerzos realizados en el diagnóstico precoz de la enfermedad. Esta situación, distinta de la que ofrecen otras localizaciones tumorales (leucemias, linfomas, tumores testiculares, etc.) en las que se han conseguido avances terapéuticos significativos, junto con un leve y sostenido incremento en la incidencia anual de nuevos casos: ~55 nuevos casos / 100.000 mujeres / año en el cuatrienio de 1.940 a 1.944, frente a 72 nuevos casos / 100.000 mujeres / año entre 1.965 y 1.969, (63)- mantienen, en todos los círculos médicos una viva inquietud y un esfuerzo constante en busca de las causas y las soluciones de tan grave enfermedad.

Hoy la doctrina terapéutica generalizada hace uso de una combinación racional de medidas locales (cirugía e irradiación) y generales (quimioterapia y hor-

monoterapia) (5). Bajo la óptica del tratamiento combinado, la terapéutica hormonal del cáncer mamario se lleva a efecto bien en forma coadyuvante a las medidas locales, bien con intención paliativa en situaciones de enfermedad avanzada. Su empleo descansa en el papel que el sistema endocrino juega tanto en el desarrollo de la glándula mamaria normal, como en el mantenimiento de las neoplasias originadas en ella.

1.2. PRINCIPIOS TERAPEUTICOS EN CANCER DE MAMA.

Hace sólo veinticinco años la doctrina terapéutica generalizada respecto al carcinoma inicial de mama era una simple rutina: en todos los casos se realizaba una mastectomía radical (110). Desde entonces, nuevos enfoques terapéuticos han creado la incertidumbre y la controversia sobre el tratamiento quirúrgico óptimo de esta patología (11, 87, 115, 122, 177, 215, 230, 290, 291).

1.2.1. Por otra parte, el papel de la irradiación postoperatoria en el tratamiento del cáncer de mama es hoy una de las cuestiones más polémicas dentro del campo de la oncología. Recientemente se han esgrimido argumentos muy variados en contra de su empleo. En síntesis, tales argumentos son los siguientes (193):

1.- La irradiación, asociada a la cirugía, no mejora los índices de supervivencia a largo plazo.

2.- La irradiación no solamente no mejora los índices de supervivencia sino que puede disminuirlos a través de un presunto efecto inmunosupresor.

3.- La irradiación es indeseable porque retrasa el comienzo de la terapéutica sistémica. Como el pronóstico de las enfermas de cáncer de mama depende de la ocurrencia de metástasis distales y no se encuentra influido por la aparición de recidiva locorregional es necesario empezar cuanto antes con quimioterapia y, por tanto, eliminar la irradiación en los casos operables y operados (por el retraso que supone su empleo para el comienzo de la quimioterapia).

4.- Aunque la irradiación pre o postoperatoria se asocia con una importante y significativa disminución de los índices de recidiva locorregional su utilización es innecesaria puesto que las recidivas pueden ser igualmente controladas una vez puestas de manifiesto (214).

5.- La quimioterapia electiva asociada a mastectomía radical puede controlar tanto la enfermedad resi-

dual local como los agregados microscópicos subclínicos distales.

Muchas de las afirmaciones anteriores son, sin embargo, argumentos teóricos que resultan de la generalización de casos anecdóticos; otras veces son consecuencia de estudios clínicos no randomizados, como ocurrió por ejemplo con el primer ensayo de Manchester (214) en el que se compararon, no grupos de enfermas que recibieron radioterapia frente a otras que no la recibieron, sino resultados de la irradiación inmediata frente a los obtenidos cuando la irradiación se pospuso a la aparición de recidiva. Hay, además, una importante consideración a subrayar. En determinados estudios clínicos, como por ejemplo en el ensayo del Guy's Hospital, el grupo de enfermas sometido a irradiación fue tratado en condiciones de dosis insuficiente y mala técnica, según han reconocido sus propios autores posteriormente (9,119).

En cáncer de mama, por consiguiente, la no utilización de la irradiación -si ésta se aplica correctamente desde el punto de vista técnico y conforme a indicaciones precisas- parece una decisión que ignora tres importantes cuestiones:

1. El efecto de la radiación sobre el binomio Tumor-Tejido Sano y su relación con el producido por los procedimientos quirúrgicos convencionales.

2. La influencia de la irradiación sobre la calidad de vida de las pacientes tratadas, en lo que a control local y regional de la enfermedad se refiere.

3. El discreto, pero real y significativo incremento en los niveles de supervivencia observado en determinados subgrupos de pacientes.

Por otra parte, de la correcta e inteligente utilización de la irradiación se derivan un notable número de consecuencias, la más importante de las cuales es la progresiva y creciente utilización, para el control locorregional del carcinoma localizado de la mama, de la combinación cirugía conservadora y radioterapia, procedimiento comúnmente utilizado hoy en numerosos centros y en un número progresivamente mayor de pacientes.

Una de las primeras alternativas a la mastectomía radical en el tratamiento del cáncer de mama localizado surgió de los trabajos de Robert McWhirter, el cual en 1.948, describió una serie de casos de cáncer de mama operable tratados mediante la combinación mastectomía simple y radioterapia postoperatoria sobre los linfáticos axilares. La comparación de ésta con otra serie de enfermas que fueron tratadas de modo exclusivo por mastectomía radical no demostró diferencias significativas en la supervivencia.

En la misma línea y varios años después, Mustakallio (202) publicó los resultados obtenidos sobre 127 casos de cáncer de mama, sin evidencia clínica de invasión axilar, tratados con excisión local amplia del tumor e irradiación postoperatoria. En 1.972, año en que la cifra de enfermas tratadas se había elevado a 702, los porcentajes de supervivencia obtenidos a los 5 y 10 años -no superados por la mastectomía radical- fueron 72 y 61%, respectivamente (203).

Publicaciones posteriores (94, 120, 195, 197, 218, 222, 240, 294,) han insistido sobre este hecho. El papel de la irradiación en el tratamiento del cáncer de mama localizado ha quedado, de esta forma, claramente definido y puede concretarse en los siguientes puntos (217):

Utilizada postoperatoriamente la irradiación reduce de manera importante y significativa el nivel de recidivas locales postmastectomía.

En efecto, de acuerdo con datos de Chu (65), en pacientes de cáncer de mama con axila positiva la incidencia de recidiva en región supraclavicular puede alcanzar un nivel del 23% cuando no se lleva a cabo la irradiación tras mastectomía radical. Esta cifra se

reducen al 10% con una dosis de radiación de 3.500 rads en 3½ semanas y al 6% cuando la dosis de radiación y el tiempo de administración de la misma son, respectivamente, 4.000-4.500 rads y 4-4½ semanas. Los resultados del Memorial Hospital (67) demuestran por ello, no sólo que la terapia postoperatoria es efectiva en la prevención de la recidiva local, sino que ponen de manifiesto también que la magnitud del control tumoral inducido es dependiente de la dosis.

Igualmente demostrativa resulta la experiencia de Fletcher y col. (90,91,275) según los cuales el nivel de recidiva locorregional en las áreas supraclavicular (20-26%), paraesternal (9%) y pared torácica (hasta 45% en casos de N+) de las enfermas sometidas a mastectomía radical sólo, decrece de manera significativa tras la irradiación (1,5, 5 y 10% respectivamente). Esta considerable reducción de los porcentajes de recidiva indica que la dosis de radiación utilizada (5.000 rads / 5 semanas o su equivalente (TDF = 80-85) cuando se utilizan fraccionamientos distintos de la dosis) esteriliza, de modo efectivo, los depósitos subclínicos de células tumorales que puedan haber quedado alojadas en los linfáticos periféricos o en la pared torácica. Los resultados de numerosos ensayos clínicos prospectivos realizados a lo largo de los úl-

timos veinte años (43,82,144,228) sustentan con firmeza este hecho que nadie pone hoy en discusión.

Una vez establecido que la asociación cirugía-irradiación proporciona un índice de control tumoral locorregional más elevado que el que ofrece la cirugía sola, cabría preguntarse si la radioterapia postoperatoria debe utilizarse sistemáticamente en todos los casos de cáncer de mama localizado sometidos a un tratamiento quirúrgico distinto de la simple tumorectomía o mastectomía parcial; o si, por el contrario, resulta aconsejable como sostienen algunos (100) la noción de "esperar y ver" e irradiar las recidivas locorregionales cuando su presencia clínica sea manifiesta. La respuesta a esta doble pregunta plantea a nuestro juicio dos nuevas interrogantes: a) si el control por radiación de las recidivas es efectivo en todos los casos; b) si los focos tumorales que definen una recidiva locorregional son en sí mismos una fuente de metástasis distales posteriores o, por el contrario, son una simple manifestación local del proceso metastásico generalizado que ocurre en ciertos grupos de tumores.

Con respecto a la primera cuestión las opiniones y las experiencias publicadas son variadas y así, mientras Tapley y col. (275) arguyen que el control de las recidivas es habitualmente infructuoso, Chu tiene

referidas cifra de control de aproximadamente 70% (66).

El análisis de la segunda resulta mucho más complicado. En términos generales, y como es bien conocido, los niveles de supervivencia a largo plazo de las enfermas de cáncer de mama, cualquiera que sea el índice de recidivas locales observado, no se modifican significativamente con el uso de la irradiación postoperatoria. Numerosos estudios retrospectivos y ensayos clínicos randomizados han dejado claro y sin discusión este hecho. Glicksman sostiene que semejante conclusión representa un fuerte argumento en contra de la idea de considerar a las áreas de recidiva locorre-gional como nidos de diseminación distal (10): Contraria a la anterior es, en cambio, la tesis sostenida por Tubiana y col. (287,288) para quienes la aparición o desarrollo de una recidiva local puede inducir un efecto adverso sobre la supervivencia si en el momento de llevar a cabo el tratamiento del primario no existen focos microscópicos distales de carcinoma; y si la recidiva inicia el proceso metastásico antes de ser detectada y tratada.

La virtualidad de la primera condición es inobjetable si se piensa que el tratamiento locorre-gional sólo consigue el control de más de la mitad de los cánceres de mama estadios I y II (82,143). Sobre la se,

gunda, la noción más importante a retener es que el proceso metastásico se inicia en un tumor cuando la masa de este alcanza un tamaño crítico (287). En tumores experimentales el rango de tamaño tumoral dentro del cual ocurre la diseminación es pequeño. En el cáncer humano el rango anterior es mucho más amplio (155). Así, en pacientes de cáncer mamario, la probabilidad de la diseminación metastásica correlaciona -aparte la masa tumoral- con otros factores: grado histológico y número de nodulos axilares afectos. Ello explica que en pacientes con tumor grado histológico III y más de tres nodulos linfáticos axilares afectos ocurra diseminación distal en el 50% de los casos cuando el diámetro tumoral es de aproximadamente 1 cm (287) y hace admisible la idea, también, de que, en situación subclínica, tanto el primario como cualquier otra área tumoral no tratada (focos microscópicos o subclínicos axilares, paraesternales, de pared torácica, etc.) puedan iniciar un proceso metastásico previamente inexistente.

Los resultados del ensayo nº 4 del National Surgical Adjuvant Breast Project (82), del estudio randomizado realizado en el Norwegian Radium Hospital de Oslo, publicados por Host y Brennhovd (130) y los datos procedentes de los análisis prospectivos llevados a cabo por Wallgren (304) en Estocolmo y Iubiana (242,

288) en Villejuif indican, a este respecto, que si la irradiación postoperatoria no se da inmediatamente después de la cirugía la insuficiente esterilización de acúmulos tumorales alojados en los linfáticos regionales o en la pared torácica puede incrementar no sólo el riesgo de recidiva local sino también de enfermedad generalizada. La experiencia de nuestro Departamento coincide con los hallazgos anteriores toda vez que las pacientes de cáncer de mama no sometidas a irradiación postoperatoria presentaron un porcentaje medio de recidivas locorregionales del 35% y una elevada proporción de ellas -58%- sufrió con posterioridad diseminación distal (159).

Estos hechos junto con el escaso índice de control obtenido en el tratamiento de las recidivas han decantado claramente nuestra posición a favor de la irradiación postoperatoria en el tratamiento de las enfermas afectas de cáncer invasivo de mama, estadios I-II, que presenten un elevado riesgo de existencia de enfermedad tumoral subclínica en los linfáticos regionales o en la pared torácica. Evidentemente, las pacientes con cáncer, estadio I, localizado en cuadrantes externos y con axila histológicamente negativa no precisan de radioterapia postoperatoria, especialmente si se suman a los datos anteriores dos hechos

suplementarios: fenotipo tumoral RE+ y/o grado histológico I de diferenciación (158,198).

La irradiación es igualmente efectiva que la cirugía en el control de la enfermedad axilar de las enfermas con cáncer localizado, estadio No clínico.

Entre 1.955 y 1.976 se trataron en el M.D. Anderson Hospital, mediante excisión local amplia del tumor primario y radioterapia postoperatoria, 162 enfermas de cáncer invasivo con primario de diámetro inferior a 5 cm y ausencia de signos graves de carácter local asociados. La irradiación se llevó a cabo sobre la mama, la axila y las áreas linfáticas supraclavicular y mamaria interna. En el curso de los tres años siguientes sólo se objetivó un caso (0,6%) de recidiva axilar (197). Teniendo en cuenta el elevado porcentaje de pacientes con afectación axilar existente en la situación No -40% de los casos según Fletcher- (89), este resultado es una prueba sin discusión de la efectividad de la irradiación en el control de la enfermedad axilar. Por otra parte, los índices de supervivencia a 10 años obtenidos en el mismo centro con enfermas sometidas a mastectomía radical sola (54%), mastectomía radical y radioterapia postoperatoria (RT) sobre los linfáticos periféricos (56%) o irradiación preoperatoria

ria seguida de mastectomía radical (57%), aunque semejantes, lo fueron en condiciones de afectación axilar absolutamente diferentes (193). En efecto, los porcentajes de invasión axilar cierta de los tres grupos de enfermas anteriores fueron 11,5%, 65% y 29,4% respectivamente. El hecho de que la supervivencia a los diez años fuese, prácticamente, la misma en los tres grupos -a pesar de las marcadas diferencias en el porcentaje de positividad axilar- indica que la irradiación fue plenamente eficaz en el control de la enfermedad axilar en un importante número de pacientes. Conclusiones similares se han obtenido de los ensayos clínicos de Cambridge (21) de Cardiff (93) y de los resultados publicados por otros autores (36,73,309).

Asociada a *mastectomía simple*, la *irradiación postoperatoria* proporciona resultados no inferiores, en lo que a nivel de supervivencia y recidiva local se refiere, a los de la *mastectomía radical* (en los cánceres invasivos sin evidencia clínica de afectación axilar).

En 1.951, Kaae y Johansen iniciaron en el Radium Center de Copenhague un estudio clínico randomizado con objeto de comparar los resultados obtenidos tras mastectomía radical con los que proporciona la mastectomía simple asociada a radioterapia postoperatoria

(RT). Se incluyeron en el ensayo 630 enfermas a quienes se dividió en dos grupos: a) las consideradas como estadios I (T_1-T_2, N_0); b) las enfermas operables de otros estadios ($T_1-T_2-T_3, N_1$). Los resultados se expresaron en términos de supervivencia a cinco años y aparición o no de recidivas locales en igual tiempo. Ninguna de estas dos variables mostró diferencias significativas (142,144).

Kaae y Johansen han publicado recientemente los resultados a quince años del ensayo de Copenhague (143) y demostrado igualmente que, a largo plazo, no existe tampoco diferencia alguna en la supervivencia entre las enfermas sometidas a mastectomía radical respecto de las tratadas con mastectomía simple y radioterapia postoperatoria. Este resultado invalida, por otra parte, la pretendida acción nociva de la irradiación sobre la supervivencia de las enfermas de cáncer de mama por un supuesto y nunca probado efecto depresor sobre los mecanismos de inmunocompetencia.

En 1.971, después de casi una década de planificación, investigadores de 34 instituciones médicas de los Estados Unidos y Canadá iniciaron el NSABP (National Surgical Adjuvant Breast Project) con el objeto de comparar diversas alternativas de tratamiento conservador con la mastectomía radical. Un elemento fundamental del estudio fue la presencia o no de linfá-

ticos axilares clínicamente afectos y sus fines específicos consistieron: 1) en pacientes con nódulos axilares clínicamente positivos determinar si la mastectomía radical y la mastectomía simple e irradiación postoperatoria son procedimientos equivalentes; 2) en enfermas con axila negativa, determinar si la mastectomía simple con irradiación postoperatoria o la mastectomía simple sola con excisión electiva de los linfáticos axilares son procedimientos tan efectivos como la mastectomía radical.

En 1.974, cuando el número de enfermas tratadas alcanzó la cifra de 1.700, el ensayo quedó, voluntariamente, interrumpido. Los resultados se publicaron en junio de 1.977 (82). No hubo diferencias significativas de supervivencia en ninguno de los grupos considerados y las pacientes que recibieron irradiación postoperatoria mostraron un menor índice de recidiva local. La frecuencia de recidiva axilar observada en el grupo de enfermas con axila negativa sometido a mastectomía simple e irradiación postoperatoria (1,8%), demuestra de modo concluyente que una buena técnica radioterápica y una segunda dosis (5.000 rads / 5 semanas fue lo habitual) controlan la enfermedad en el 98,2% de las enfermas con nódulos axilares no palpables.

Dos observaciones de particular interés se han derivado, por otra parte, de este importante estudio:

a) el 14,5% de las enfermas que fueron tratadas con mastectomía simple sin radioterapia postoperatoria presentaron enfermedad axilar clínica postmastectomía que obligó a realizar disección axilar; b) las dos terceras partes de las enfermas que fueron sometidas a disección axilar postmastectomía por recidiva presentaron con posterioridad diseminación distal. Ambas observaciones poseen una profunda significación biológica. En efecto, si aceptamos desde el principio que, al menos, un 40% de los cánceres de mama localizados con axila negativa tienen invasión histológica axilar cierta (89), el hecho de que al dejar intactos los linfáticos axilares no se modifique la supervivencia implica que el concepto quirúrgico de "disección en bloque" con extirpación "en continuidad" de la mama, los músculos pectorales y el contenido axilar, carece de especial significación. Esto equivale, indirectamente, a destacar el papel de la mastectomía radical modificada o de la mastectomía simple sobre el de la mastectomía radical sin más comparaciones. Por otro lado, el hecho de que la mayor parte de las enfermas que fueron sometidas a disección axilar por recidiva local tras la mastectomía simple presentaran posteriormente metástasis distales, reafirma el concepto de que los acúmulos de células tumorales viables de los linfáticos regionales representan una fuente potencial de diseminación y refuerza el papel esencial de la irradiación axilar.

Finalmente, el ensayo clínico Británico, uno de los estudios prospectivos más importantes que se han realizado, llevado a cabo sobre 2.234 pacientes afectas de cáncer de mama, estadios I y II, no ha puesto de manifiesto diferencias en la supervivencia a 7 años entre los grupos de irradiación postoperatoria y cirugía sola. Por otra parte, el número de recidivas locales en el grupo irradiado fue significativamente menor que el observado en el grupo control (12% y 37%, respectivamente) (43).

La asociación *excisión local amplia* del tumor primario y *radioterapia postoperatoria de la mama restante equivale*, en cuanto al control local de la enfermedad se refiere, *a la mastectomía simple* en los casos de carcinoma "in situ" o cáncer de mama mínimo. De igual modo la *cirugía conservadora* (excisión local amplia, mastectomía segmentaria o parcial, cuadrantectomía, etc.) *asociada a irradiación postoperatoria proporciona resultados equiparables*, en términos de supervivencia y recidiva local, *a los de la mastectomía radical* (en los cánceres invasivos sin evidencia clínica de afectación axilar y en general en los estadios I y II (T₁-T₂, N₀-N₁)).

Numerosos estudios, retrospectivos unos, randomizados otros, demuestran con claridad la vigencia actual de la afirmación anterior. Destacan entre ellos por su significación los siguientes:

Experiencia del Princess Margaret Hospital (PMH)

Entre 1.958 y 1.980 se han tratado en el PMH 800 pacientes afectas de cáncer de mama en situación axilar clínica No (estadios patológicos I y II). Desde el punto de vista quirúrgico, el tratamiento efectuado no fue más allá de la mastectomía parcial (resección en cuña unas veces, excisión biopsia o, resección parcial o segmentaria otras). Postoperatoriamente se excluyó de tratamiento radiológico a 177 enfermas (22%), 252 casos (32%) recibieron sólo radioterapia sobre el resto de la mama y las otras 371 pacientes fueron sometidas a irradiación locorregional (mama y territorios linfáticos axilar, supraclavicular y paraesternal) de acuerdo con indicaciones precisas. El tratamiento de las recidivas fue, sistemáticamente, quirúrgico (disección axilar o mastectomía parcial según los casos).

Los resultados del estudio son concluyentes (50,51): a) 79% de supervivencia a los 5 años; b) recidiva mamaria mínima en los grupos de irradiación. Puesto que el nivel de recidiva (mamaria o axilar) influyó, clara y significativamente, sobre la supervi-

vencia a largo plazo es evidente que la irradiación postoperatoria ejerce un papel determinante en el tratamiento. Conclusiones importantes del estudio de referencia son, por otra parte, las siguientes: 1) el nivel de recidiva axilar de las pacientes no irradiadas o de las que fueron sometidas sólo a irradiación mamaria o nodal (no axilar), aunque importante -16.6%- es muy inferior al esperado, dada la alta proporción de casos N+ histológico axilar asociados con la situación N₀ (40%); 2) en un intento de reducir la mortalidad por cáncer de mama (21% de éxitos a los 5 años), los autores recomiendan la disección axilar -como parte esencial separada del tratamiento descrito- con objeto de seleccionar pacientes para quimioterapia adyuvante. Esta idea -la disección axilar como medida fundamental de carácter pronóstico, sin excesivo valor terapéutico- refleja mejor que ninguna otra el papel, hoy devaluado, de la cirugía radical en el tratamiento del cáncer localizado de la mama.

Estudio del Joint Center for Radiation Therapy (JCRT).

En un trabajo retrospectivo llevado a cabo entre 1.968 y 1.978, Hellman y col. (116,117) sometieron a tratamiento conservador (excisión biopsia y radioterapia postoperatoria sobre la mama restante, la axila y las regiones supraclavicular y mamaria interna)

a 244 pacientes de cáncer mamario, estadios I-II (T₁-T₂, N₀-N₁, M₀). La distribución bimodal de los casos tratados en grupos de edad predominante situados en torno a los 50 y 70 años, respectivamente, demuestra que la intención del tratamiento fue clara: evitar la mastectomía radical en las enfermas más jóvenes y reducir la cirugía mayor en las de edad avanzada. La irradiación postoperatoria sobre la mama se llevó a cabo, según la técnica clásica de campos tangenciales opuestos, a la dosis de 4.600-5.000 rads / 900-1.000 rads / semana con sobreimpresión suplementaria (1.500-2.500 rads sobre el asiento del primario). La irradiación nodal se realizó utilizando un campo convencional a través del cual se administraron, a 5 cm de profundidad, 4.400-4.600 rads / 5x200 rads / semana, procediendo a sobreimpresión axilar posteriormente (500-1.500 rads, campo posterior).

Los resultados de este importante estudio apenas precisan ser enfatizados: 1) supervivencia a 5 años, 87%; 2) recidiva global locorregional, 5% (reducida a 0% en el subgrupo de pacientes tratados con dosis de radiación iguales o superiores a 6.000 rads).

Experiencia del M.D. Anderson Hospital (MDAH).

Las razones que motivaron inicialmente la puesta en práctica de un tratamiento conservador en los 275 casos de cáncer de mama T_{1s}, T₁, T₂, N₀, N₁, M₀ que cons-

tituyen la serie del MDAH (1.965 - 1.977) han sido descritas por Montague y col. (194,197) en la forma siguiente: a) edad avanzada; b) rechazo a la cirugía radical; c) contraindicación médica al tratamiento quirúrgico y d) tumor mamario periférico. En 1.974 se empezó a realizar la selección específica de pacientes para esta clase de tratamiento con arreglo a los siguientes criterios (196): 1) primario único de diámetro igual o inferior a 4 cm (o bien focos tumorales múltiples agrupados en un área de diámetro igual o inferior a esta dimensión); 2) estadio No, N₁ axilar clínico.

La comparación de los resultados a cinco años con un grupo contemporáneo de mastectomía radical perteneciente al propio centro ofreció igual nivel de supervivencia (84%) y un menor número de recidivas locales (4,9% frente a 8,4%).

Ensayos clínicos randomizados.

La coincidencia de criterios en torno al tratamiento conservador del cáncer de mama localizado y la similitud de los resultados obtenidos por numerosos autores en distintos centros se han visto reafirmados tras la publicación de las conclusiones de dos ensayos clínicos randomizados llevados a cabo en Europa en el curso de los últimos quince años. Así el ensayo clínico del Instituto Oncológico de Milán (IOM), realizado entre 1.970 y 1.980, se ha circunscrito a los cánceres

de mama estadio I (T₁,N₀). Utilizando como elementos de comparación la edad, el estado hormonal, la localización y diámetro del tumor primario, la frecuencia de invasión axilar cierta y previo el diagnóstico histológico de certeza en todos los casos, las enfermas se dividieron al azar en dos grupos, mastectomía radical (352 casos) y cuadrantectomía e irradiación postoperatoria (349 casos). La irradiación mamaria, que se realizó a través de campos tangenciales consistió en la administración de 5.000 rads / 5x200 rads / semana, estimados en el plano mamario medio y 1.000 rads en sobreimpresión (electrones de 7-11 MeV o RX ortovoltaje) sobre la cicatriz. Entre 1.970 y 1.975 los casos N+ axilar se subdividieron a su vez en dos grupos, uno de los cuales no recibió tratamiento complementario alguno mientras que el otro fue sometido a irradiación sobre regiones supraclavicular (SC) y mamaria interna (CMI). A partir de 1.976 se interrumpió la irradiación SC + CMI y se introdujo la disección axilar (lateral al pectoral mayor) con propósitos de pronóstico y selección de pacientes para quimioterapia adyuvante.

En términos de supervivencia a cinco años, intervalo libre de enfermedad y recidiva local los resultados fueron semejantes en ambos grupos. No obstante en el subgrupo de pacientes N+ axilar el tratamiento conservador tuvo un efecto significativamente superior (p < 0,05) (295,296).

En 1971, la Organización Mundial de la Salud propuso la realización de un ensayo cooperativo entre distintos autores que únicamente asumió el Instituto Gustave Roussy de París. Los objetivos de este ensayo en el que entraron 179 pacientes de cáncer de mama T₁, T₂, N₀, N₁, M₀ fueron dos: a) determinar en grupos comparables establecidos al azar, la superioridad o no de la mastectomía radical respecto del tratamiento conservador (excisión local amplia y radioterapia); b) conocer la influencia de la irradiación en los casos N₊ axilar. La irradiación mamaria se llevó a cabo a la dosis de 4.500 rads / 4x250 rads / semana con sobreimpresión (1.500 rads) sobre el lecho tumoral (fotones o electrones). Las regiones linfáticas axilar (sólo ápex), supraclavicular y mamaria interna se irradiaron también a 4.500 rads / 4x250 rads / semana a través de campos convencionales conformados.

Por lo que al primero de estos objetivos se refiere, mastectomía radical y tratamiento conservador resultan ser procedimientos equivalentes toda vez que, tanto la supervivencia a cinco años, como el número de recidivas locales en ambos grupos no mostraron diferencias significativas (253). Por otra parte, ya que en el subgrupo de enfermas N₊ axilar la irradiación nodal no se asoció con mayores índices de control local o distal y en el conjunto de casos irradiados el riesgo de complicación (plexopatía braquial, edema de brazo,

fractura costal, neumonitis sintomática, etc.), fue mayor, parece lógico cuestionar el papel de la irradiación axilar en los casos de cáncer de mama localizado, estadios I-II, especialmente si se lleva a cabo en todos ellos, con finalidad pronóstica, una disección axilar baja. La irradiación del resto de la mama y de las regiones linfáticas supraclavicular y mamaria interna (en los casos N+ axilar) constituyen, pues, los escalones terapéuticos consecutivos a la excisión biopsia en tales casos (241).

Como resumen de este ensayo baste decir que en el I.C.R. la combinación cirugía conservadora y radioterapia locorregional constituye hoy el tratamiento estandar del cáncer localizado de la mama. En las enfermas de mal pronóstico (N+ axilar/grado III; N+ axilar > 4/grado II) la manipulación hormonal (ovariectomía y tamoxifen) en los casos RE+ y la quimioterapia (QT) en los casos RE- completan el abanico de posibilidades terapéuticas (241).

En determinados subgrupos de pacientes *la irradiación postoperatoria eleva de manera significativa el porcentaje de supervivencia a largo plazo.*

Pruebas de evidencia del efecto curativo -y no simplemente de la acción preventiva en cuanto a la apa-

rición de recidiva local se refiere de la irradiación postoperatoria en pacientes de cáncer de mama localizado son, entre otras la experiencia del Memorial Hospital de Nueva York realizada entre 1.940 y 1.950 y que incluye 674 enfermas de cáncer mamario a las que se dividió en dos grupos (67): a) grupo de mastectomía radical o radical ampliada sólo; b) grupo de irradiación postoperatoria sobre CMI y SC tras mastectomía radical. La dosis de radiación utilizada fue variable (3.500-4.000 rads dados con radiación de ortovoltaje en 3-4 semanas) y aunque el estudio no fue randomizado se utilizó un procedimiento de selección de pacientes basado en la idea de irradiar aquellos casos con enfermedad más avanzada. De esta manera en el grupo de irradiación se alcanzó un nivel de positividad axilar del 83% mientras que en el grupo de cirugía el número de pacientes con linfáticos axilares afectados fue del 46%. El nivel de la invasión tumoral axilar fue igualmente distinto: 52% de las pacientes irradiadas mostraron presencia del tumor en el ápex de la axila frente a un 29% de invasión en las que fueron sólo operadas.

La supervivencia global a los cinco y diez años fue la misma en ambos grupos. No obstante cuando las pacientes se analizaron por grupos N+/N-, RT+/RT- se encontraron notables diferencias. Así, en presencia de afectación linfática axilar media o baja la irradiación

no modificó significativamente los niveles de supervivencia observados en el grupo de cirugía. Ahora bien, cuando la invasión tumoral alcanzó el ápex axilar las diferencias en supervivencia entre los grupos de irradiación y cirugía (39% y 22% respectivamente) alcanzaron significación estadística suficiente.

Probablemente fue éste, el primer estudio que puso de manifiesto el efecto beneficioso sobre la supervivencia de la irradiación postoperatoria en determinadas pacientes afectas de cáncer de mama localizado.

Más adelante, Berg y Robbins publicaron en 1.977 el estudio realizado sobre la totalidad de las enfermas de cáncer de mama localizado tratadas en 1.969 en el estado de Iowa. Fueron 1.051 casos cuyo índice de supervivencia media alcanzó la cifra del 71%. Resultado inesperado de este análisis fue el hecho de que las pacientes sometidas a mastectomía radical y radioterapia postoperatoria presentaron una tasa de supervivencia elevada (71%), estadísticamente diferente ($p < 0,05$) de la que ofrecieron los casos tratados sólo quirúrgicamente (58%). La diferencia en supervivencia fue especialmente notable si se toma en consideración el hecho de que hubo una cierta tendencia a enviar a irradiación a las enfermas con afectación linfática axilar más acusada (16).

El valor de la radioterapia postoperatoria, como medida adyuvante, tras mastectomía radical ha salido fortalecido con la publicación, por Host y Brennhovd (130), del ensayo de Oslo en 1.977. Formaron parte de este estudio 1.090 enfermas, estadios I y II, de cáncer de mama. La irradiación, teniendo en cuenta el acto quirúrgico desarrollado, se llevó a cabo sólo sobre las áreas linfáticas SC y CMI a la dosis de 5.000 rads / 4 semanas utilizando Co-60. En el estadio I el grupo de irradiación no mostró diferencias en la supervivencia o recidiva local. En el estadio II, los índices de recidiva local fueron muy inferiores en el grupo de irradiación (n = 95) con respecto al de mastectomía (n = 184). Igualmente resultaron inferiores el intervalo libre de síntomas y la supervivencia. El valor de este último parámetro 8 años después del tratamiento inicial (60% en el grupo de irradiación, 44% en el grupo de mastectomía) alcanzó un nivel de significación estadística suficiente ($p < 0,05$).

El ensayo clínico de Estocolmo fue concebido para comparar los resultados obtenidos en cáncer localizado de mama, con radioterapia preoperatoria, irradiación postoperatoria o cirugía sola. El procedimiento quirúrgico utilizado en los tres grupos de pacientes descritos fue mastectomía radical modificada y el número total de enfermas tratadas en el Radiumhemmet fue de

960. Cuando se utilizó preoperatoriamente, la irradiación se concentró sobre la mama y las áreas linfáticas axilar, supraclavicular y mamaria interna. En situación postoperatoria se irradiaron junto a la pared torácica los volúmenes linfáticos anteriores. La dosis de radiación utilizada fue uniforme: 4.500 rads / 5 semanas. Como fuentes de radiación se emplearon Co-60 o electrones acelerados de energía comprendida entre 7 y 11 MeV. Los resultados del ensayo (248,270,304) son concluyentes: a) el número de pacientes que presentó recidiva local fue significativamente inferior en los grupos de irradiación pre y postoperatoria que en el tratado sólo quirúrgicamente; b) la tasa de supervivencia observada a los 6 años en el grupo de cirugía (50%) fue clara y significativamente inferior a la que ofrecieron los grupos de irradiación (66%).

Los resultados obtenidos en Villejuif (Instituto Gustave Roussy) en el tratamiento del cáncer localizado de la mama son semejantes a los encontrados en Estocolmo y Oslo, y muestran (242,287,288) que la recidiva locorregional es muy baja en todos los subgrupos de pacientes tratadas con irradiación postoperatoria apareciendo, además, un significativo incremento de la supervivencia en el subgrupo de pacientes portadoras de un tumor de cuadrantes internos o de región central con axila histológicamente positiva. En pacientes con tu-

moreas localizados en cuadrantes externos y axila positiva el trabajo del grupo Villejuif ha mostrado inequívocamente que la disección de los linfáticos mamarios internos no reduce la incidencia de metástasis ni eleva el nivel de supervivencia. En cambio en los tumores localizados en los cuadrantes internos o región central el procedimiento quirúrgico descrito hace disminuir la frecuencia de metástasis distales significativamente. Tubiana y Sarrazin (242,287) han demostrado, además, que la irradiación postoperatoria es tan efectiva como la cirugía en el control de la enfermedad tumoral presente en tales linfáticos.

Los resultados anteriores son relativamente fáciles de interpretar. Según Tubiana (287) en pacientes de cáncer de mama sin extensión metastásica en el momento en que se lleva a cabo el tratamiento del tumor primario los focos tumorales residuales que puedan existir en los linfáticos periféricos, inician el proceso de diseminación distal cuando su volumen o masa alcanza un valor crítico (habitualmente inferior a 1 cm). Los nidos axilares son de fácil detección y tratamiento dado que la disección axilar es de realización sistemática en el estadio II y cuando ésta no se lleva a cabo (enfermas T₁ - No sometidas a tratamiento conservador, como hemos visto anteriormente) la irradiación axilar asegura el control. Es difícil concebir,

por ello, que las áreas de afectación axilar sirvan como elementos de diseminación. Por el contrario los acúmulos tumorales subclínicos de carcinoma alojados en los linfáticos de la cadena mamaria interna (y probablemente en los nódulos del ápex de la axila y fosa supraclavicular media) son de difícil detección y si no se tratan convenientemente no hay manera de evitar que se conviertan en centros activos de diseminación. De ahí el impacto positivo que sobre la supervivencia de las enfermas con cáncer localizado ejerce la irradiación de dichas áreas en condiciones de dosis, tiempo, fraccionamiento e indicación terapéutica precisas.

1.3 RESUMEN.

Los datos anteriores dejan claro, en consecuencia, que en el cáncer localizado de mama -supuesto el origen monoclonal de los tumores malignos (78), en virtud del cual la curación es sinónimo de reducción a cero de la masa tumoral clonogénica inicial-, la terapéutica locorregional (cirugía y radioterapia) resulta ser eficaz en el control de, prácticamente, el 100% de la masa tumoral inicial presente tanto en la mama como en las áreas linfáticas regionales (axila, región supraclavicular y cadena mamaria interna, fundamentalmente). Parece evidente, por ello, que el fracaso en el control

de la enfermedad es debido a la existencia de tumor distal desde el momento en que se lleva a cabo el primer acto terapéutico.

1.4 EL CÁNCER DE MAMA COMO ENFERMEDAD SISTEMICA.

En cáncer de mama, por lo tanto, el incremento de los niveles de curación, por encima de los índices actuales, exige el desarrollo de una metodología de trabajo consistente en: a) descubrir o sospechar la existencia de focos microscópicos distales de carcinoma; b) determinar o calcular de forma aproximada la masa tumoral residual; c) formular un esquema terapéutico adecuado que permita reducir -teóricamente al menos- a cero el número de clonógenos celulares integrantes de la citada masa.

El tamaño del tumor primario, la presencia de micro o macrometástasis en los linfáticos axilares, el grado de invasión vascular, el índice de marcaje con timidina, la existencia de necrosis tumoral y el fenotipo tumoral RE/RPg, constituyen, en la actualidad, los factores esenciales en los que descansa la predicción de enfermedad oculta distal en pacientes afectas de cáncer de mama (4,10,18,188). Entre ellos destaca como

parámetro discriminativo la invasión linfática axilar. Pasada la época anatomista en la que prevaleció la idea de "extensión en continuidad" (tejido mamario → linfáticos axilares → enfermedad distal.), actualmente se considera a este tipo de neoplasia como una enfermedad sistémica desde su comienzo, siendo los linfáticos axilares, indicadores o centinelas del estado de diseminación (80,82). De ello pueden extraerse algunos datos cuantitativos sobre el número de "locus" metastásicos distales presumiblemente existentes en una determinada situación.

Para el análisis de este problema, Speer y col. (264) -basándose en los datos de Bloom (21), Henderson y Canellos (121) sobre la historia natural del cáncer de mama no tratado, el trabajo de Heuser (123) referente al ritmo de crecimiento de pequeños acúmulos tumorales del cáncer de mama, y los resultados del ensayo del NSABF (87) sobre recidivas tumorales tras excisión quirúrgica- han propuesto una ecuación simplificada que relaciona la probabilidad de reaparición del tumor con el número de linfáticos axilares histológicamente afectados.

En términos matemáticos dicha ecuación adopta la siguiente forma:

$$S = C_1 + C_2N$$

donde:

S = nº medio de locus metastásicos.

N = nº de nódulos axilares positivos en el momento del diagnóstico.

C_1 y C_2 = constantes asumidas a partir de datos clínicos significativos extraídos del ensayo NSABP (87) ($C_1 = 0,24$; $C_2 = 0,35$).

Asignando a N , de manera empírica, los valores 0 (casos N-), 1 (casos con 1-3 nódulos axilares positivos) y 2 (casos con 4 o más ganglios axilares afectados), es posible comprobar la hipótesis de Speer y conocer sus posibilidades.

De esta forma para $N = 0$, $S = 0,24$, cifra teórica indicativa del porcentaje de pacientes sin afectación axilar que tras un tratamiento locorregional oportuno, desarrollarían metástasis distales. Esta cifra teórica del 24% coincide con la fracción de pacientes N- de la serie de Fisher (80) que hacen recidiva tras el tratamiento local y concuerda con los datos obtenidos en nuestro medio (estadio II cuyo nivel de supervivencia libre de síntomas a los 5 años se eleva al 75%) (284). Del mismo modo para $N = 1$, S resultaría ser igual a 0,59, es decir, en situación N+ (1-3 nódulos axilares afectados) la probabilidad de enfermedad distal alcanzaría al 59% de los casos, resultado teórico que

concuera con los hallazgos de Bonadonna y Valagussa en series extensas de pacientes, cuyos porcentajes de supervivencia se sitúan entre el 52 y el 66% de los casos a los 5 y 10 años respectivamente (25), y con nuestros propios datos: 40% de los casos N+ (1-3 ganglios), en pacientes en estadio II, sobreviven sin enfermedad a los 5 años tras tratamiento, o lo que es igual, el 60% recidivan en este tiempo (284).

La correlación existente entre los datos teóricos derivados de la hipótesis de Speer y los hallazgos clínicos es evidente. El modelo descrito, que según sus autores predice el número de "locus" metastásicos (no el número absoluto de células residuales tras el tratamiento quirúrgico), proporciona, por ello, una idea del número de lugares teóricos del depósito tumoral susceptibles de transformación en metástasis distales tras el tratamiento del primario.

Las previsiones teóricas del modelo no concuerdan, en cambio, con los datos de orden clínico en lo referente a la temporalidad de los mismos. Así, en casos N+ (1-3), por ej., el nivel de recidiva teórico se ajusta con el real unas veces a los 5 años y otras a los diez años del inicio del tratamiento del primario (25,27,87). Parecen, por tanto, necesarios nuevos estudios y mayor cantidad de información antes de esta-

blecer conclusiones definitivas en torno a este interesante problema. En cualquier caso, las razones que justifican los fracasos terapéuticos en cáncer de mama operable son dos: a) la existencia de masa tumoral residual al tratamiento y b) la heterogeneidad celular en lo que a la respuesta a la quimioterapia u hormonoterapia sistémica se refiere.

1.4.1. Estimación de la masa tumoral residual.

Hasta 1.960 se atribuyeron, erróneamente, los fallos del control tumoral tras la cirugía del primario a la diseminación hematogena secundaria a la manipulación tumoral quirúrgica (79). A partir de esta fecha, y tras la demostración del escaso efecto de la quimioterapia sobre las células tumorales malignas "circulantes", se especuló sobre la idea de que las recidivas o metástasis distales fuesen debidas, no a implantes tumorales de células neoplásicas desprendidas quirúrgicamente, sino a acúmulos tumorales preexistentes generados incluso antes de que el tumor primario alcanzase el umbral mínimo de detección clínica (1×10^9 células \approx 1 gr de masa tumoral \approx 1 ml de volumen).

En 1.973 Skipper y Schabel (259) utilizando el concepto de "fracción de crecimiento tumoral", definida

como el cociente entre las células proliferativas y las no proliferativas de un modelo tumoral, plantearon la hipótesis de que aún siendo exponencial el crecimiento de los pequeños acúmulos o micrometástasis de carcinoma mamario en los ganglios linfáticos subsidiarios o en cualquier otro tejido receptivo (crecimiento diferente del de los tumores experimentales que se ajusta a un modelo gompertziano), el periodo de tiempo existente entre el tratamiento del primario y la aparición de la recidiva o metástasis distal puede considerarse como indicativo de la masa tumoral residual tras la cirugía, siempre y cuando se considere constante el tiempo de duplicación del tumor y la fracción de pérdida celular (256,259)

Sobre la base del trabajo de Skipper y teniendo en cuenta los supuestos teóricos explicados anteriormente, (modelo exponencial de crecimiento tumoral) (287), Torres y col. (285) han demostrado que en pacientes tratadas de cáncer mamario el periodo comprendido entre el primer acto terapéutico y la aparición de la primera recidiva, constituye un parámetro de cinética tumoral cuya utilización, asociada a la hipótesis de que durante dicho periodo el crecimiento de los depósitos metastásicos subclínicos de carcinoma obedece a una ley exponencial, permite:

a) Calcular los tiempos medios teóricos de recidiva tumoral para cada estadio clínico de la enfermedad; así, según experiencia del mismo grupo de trabajo, el tiempo medio de recidiva será de 4,6 años para el estadio I; 2,6 años para el estadio II; de 1,9 años para el estadio III y de 1,2 años para el IV.

b) Determinar, de forma teórica, la masa tumoral media residual al tratamiento inicial realizado, cualquiera que sea su localización. (local, regional o distal) respecto del primario. La estimación realizada condujo al resultado $1,2 \times 10^6$ células para el estadio I, $8,1 \times 10^6$ para el estadio II, $3,6 \times 10^7$ células para el estadio III y $1,6 \times 10^6$ para el IV (284).

c) Estimar, por último, en términos de probabilidad, las tasas de recidiva tumoral según los estadios que han resultado ser, en nuestra experiencia, 35,38,48 y 72% para los estadios I, II, III y IV del cáncer de mama. La probabilidad de recidiva tumoral para el estadio IV puede incrementarse, incluso, hasta aproximadamente el 90% si se considera el subgrupo de pacientes que no responden al tratamiento (284).

1.4.2. Heterogeneidad celular tumoral.

Durante la pasada década el origen monoclonal del cáncer ha sido demostrado por diversos métodos y se

creo que todas las células cancerosas de un tumor derivan de una célula madre única anormal (78). Sin embargo es un hecho bien conocido que la población germinal tumoral (stem cell) muestra una marcada heterogeneidad en su respuesta a la quimioterapia (260).

Skipper (303) ha aportado al conocimiento de la biología de las células neoplásicas ciertos conceptos que hoy día conservan toda su vigencia. Los postulados fundamentales de la teoría de Skipper pueden ser resumidos de la forma siguiente:

1.- La inyección de una sola célula clonogénica maligna a un animal de experimentación puede llevar finalmente a la muerte del huésped.

2.- Cuanto mayor es el número de células inoculadas al animal menor es su supervivencia.

3.- El intervalo de tiempo existente entre la inyección de células neoplásicas a un ratón y la muerte del animal puede predecirse conociendo el número de células inyectadas y el tiempo de duplicación de la población celular.

4.- El aumento de la supervivencia, tras quimioterapia, de ratones leucémicos (L1210), es debido sobre

todo al efecto citocida del tratamiento sobre la población celular tumoral.

5.- Los fármacos anticancerosos destruyen las células tumorales de manera análoga a la que predice el modelo matemático definido por las reacciones cinéticas de primer orden. Es decir una determinada dosis de fármaco destruye una fracción constante de células con independencia del número absoluto de elementos de la población tumoral.

La conclusión inmediata que se deriva de los anteriores principios es que la probabilidad de erradicar un cáncer es tanto mayor cuanto menor es el tamaño del tumor (48). Esta es una noción firmemente establecida en oncología clínica, que limita la probabilidad de curación de los tumores humanos. A ella, y también como factor limitante de probabilidad debe añadirse el concepto de heterogeneidad de las "stem cells".

Utilizando la teoría de Luria y Delbruck (176) sobre la mutación celular somática, Goldie y Coldman (103) han desarrollado un modelo matemático que permite explicar las mutaciones de sensibilidad de células neoplásicas a estados de resistencia fenotípica a las drogas utilizadas en quimioterapia. Este modelo asume que: a) las células que son resistentes a la quimio-

rapia surgen como consecuencia de mutaciones al azar; b) las células resistentes tienen el mismo patrón cinético de crecimiento que las células sensibles; c) todas las células del tumor son capaces de proliferar indefinidamente. Este último supuesto está en contradicción con datos cinéticos que demuestran que sólo una pequeña proporción de las células del tumor, las denominadas "stem cells" (280), poseen la propiedad de autorrenovación indefinida (37,38,237,265).

El esquema de Buick (38) permite aclarar con facilidad el concepto anterior (Figura 1.1). La stem cell puede ocupar dos estados que condicionan su actividad: el estado proliferativo y el estado de reposo (112). En este último se incluyen todas aquellas células cuya división puede ser estimulada "in vivo" como consecuencia de cambios hormonales o en respuesta a una despoblación celular motivada por medios físicos (cirugía y/o irradiación) o químicos (fármacos citotóxicos). Alguno de los descendientes de la célula germinal mantiene la capacidad ilimitada de división (autorrenovación del compartimento germinal) mientras que otras, quizás la mayoría, pierden esta capacidad y pasan al compartimento de proliferación y diferenciación hasta alcanzar el compartimento de células funcionales maduras que no se dividen y cuya vida es limitada.

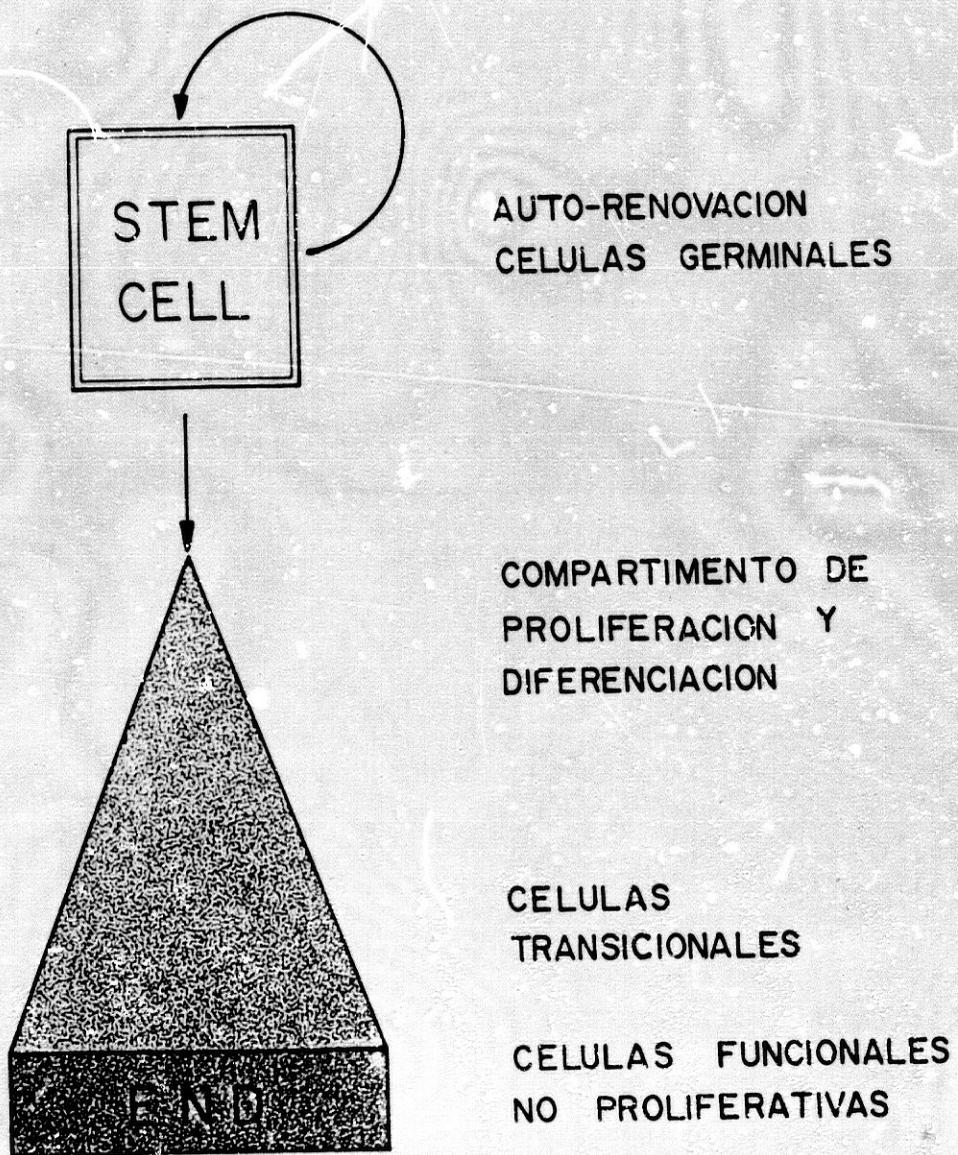
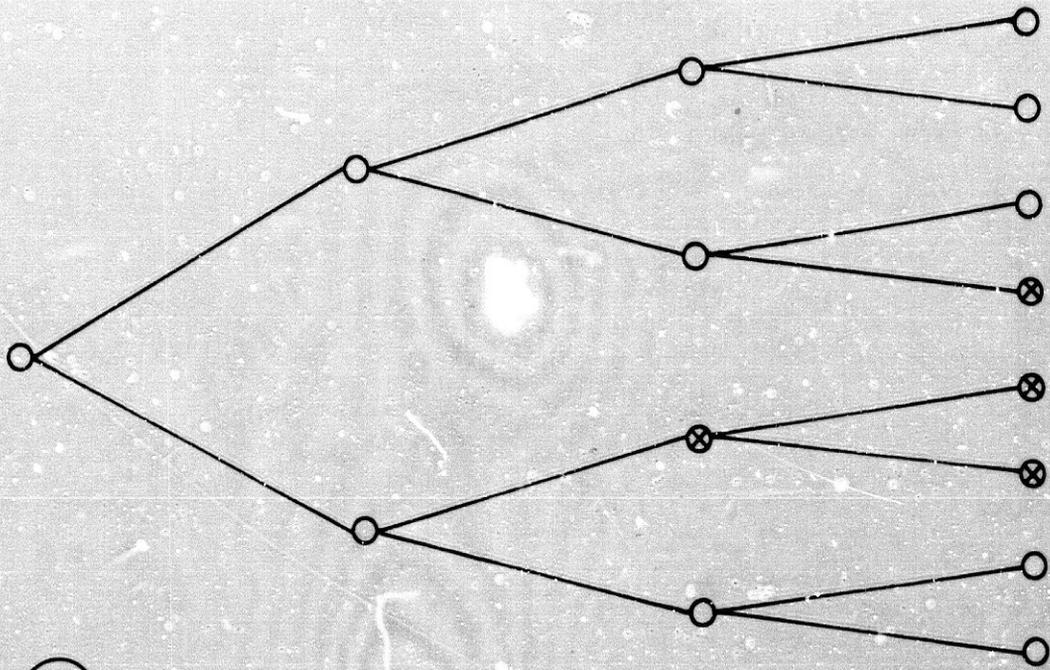


FIG.- I.I.

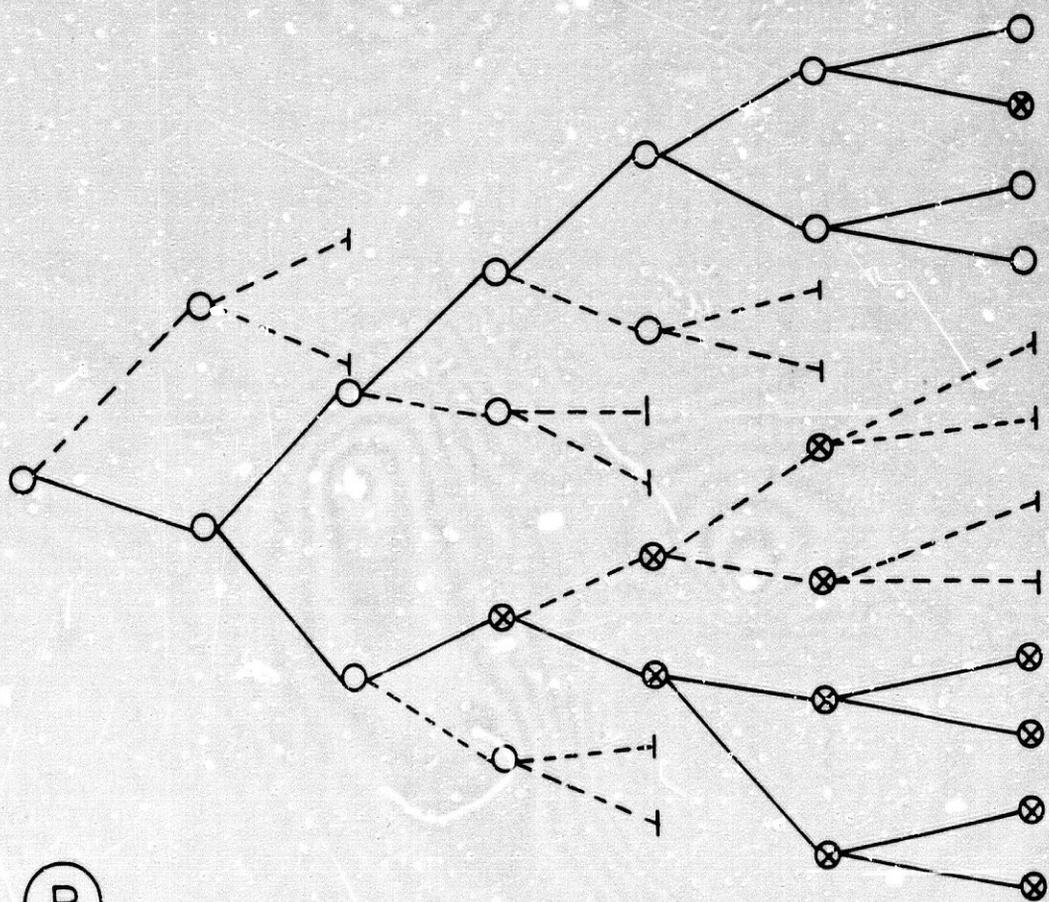
Estos hechos han conducido a Goldie y Coldman (104) a modificar su modelo original dando entrada a un sistema en el que el tiempo de duplicación del tumor (TD) excede considerablemente al valor del tiempo de ciclo de la stem cell y en el que la eficiencia de clonning (113, 114) es menor del 100%.

De cualquier forma la teoría primitiva de Goldie puede ser considerada como un caso particular, cualitativamente correcto, que surge del modelo general (104) cuando la velocidad de muerte de las células germinales del tumor es nula. Por otra parte, ambas interpretaciones metodológicas predicen que la heterogeneidad celular en un tumor de lento crecimiento puede ser muy extensa y que surge espontáneamente. El esquema de la Figura 1.2, tomado de Goldie (104) explica la mutación espontánea a estados de resistencia farmacológica en dos situaciones: A) cuando todas las células del tumor conservan la propiedad de autorrenovación; B) cuando parte de las células, en su proceso de división mitótica, dan lugar a células transicionales o funcionales de limitada o nula capacidad proliferativa.

Existe (260), y el modelo descrito lo predice, una relación directa entre la masa celular tumoral y la probabilidad de presencia de células resistentes a uno o varios fármacos.



(A)



(B)

FIG-1.2.

La estructuración compartimental de las células tumorales, incluyendo este principio, se ofrece en la Figura 1.3. En ella hemos supuesto que la mutación a estados de resistencia a dos o más fármacos surge tras un primer cambio al estado R₁ de resistencia farmacológica. Esta diversificación está causada por la inestabilidad genética de las células tumorales (42). Cada stem cell, sensible o mutada, origina un clon tumoral en el que además de la autorrenovación celular tiene lugar el proceso de diferenciación que conduce al compartimento de células diferenciadas, funcionales o maduras, que no se dividen. La resistencia a la quimioterapia puede originarse tras el tratamiento citotóxico o en el curso del mismo, fenómeno al que se denomina resistencia adquirida y que se cree derivado de efectos epigenéticos o genéticos mediados por las drogas (48).

A nivel celular los mecanismos que explican por qué ciertas células son sensibles y otras resistentes a la quimioterapia han sido revisados por Hall (109). En este sentido se cree que: 1) las modificaciones en el transporte transmembrana de los agentes farmacológicos; 2) la actividad metabólica celular incrementada (fosforilación de análogos de bases púricas y pirimidínicas, deaminación, decarboxilación, fosforólisis, hidrólisis, reducción, oxidación o esterilización de las drogas a formas inactivas);

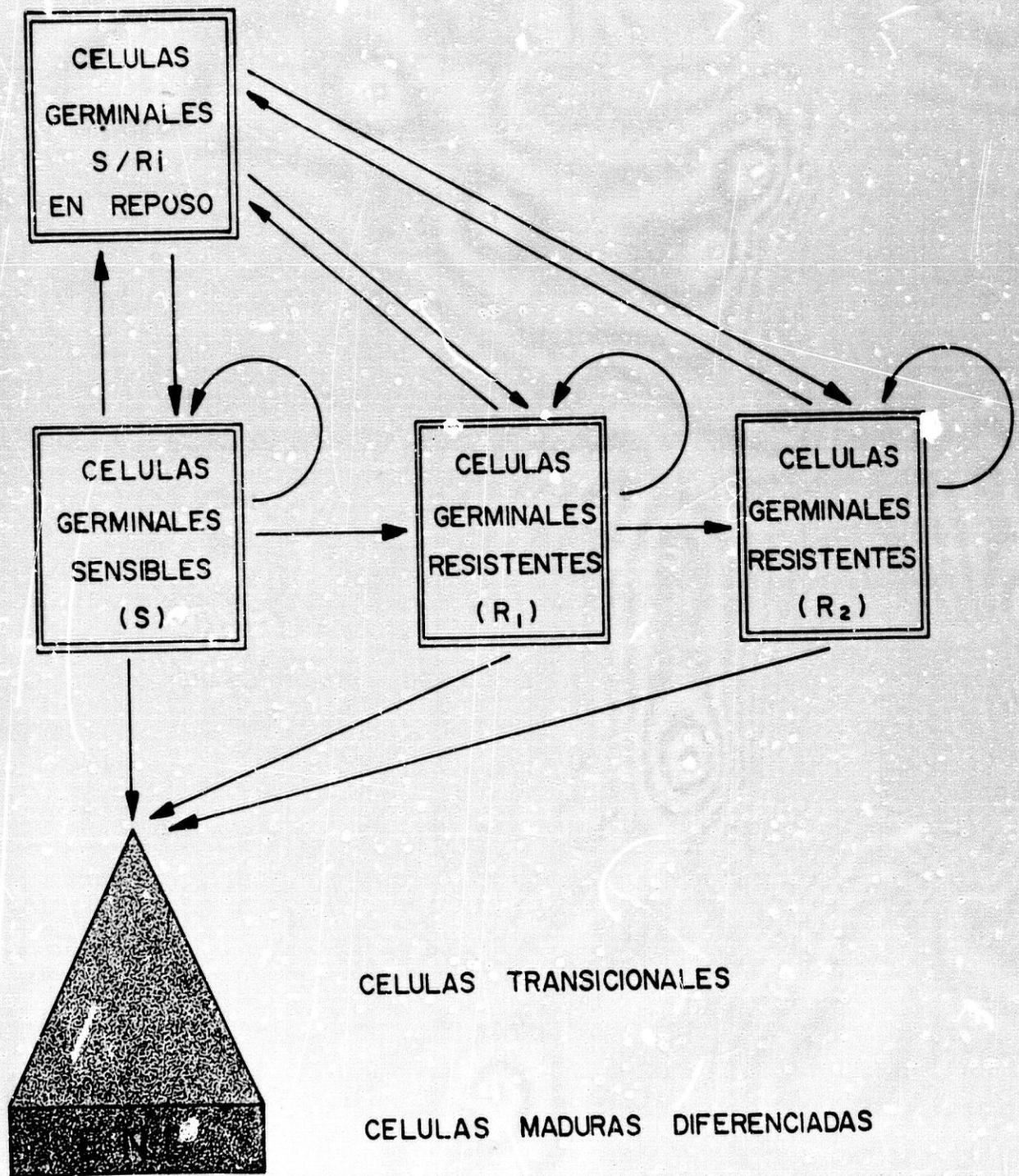


FIG.-1.3.

3) la puesta en marcha de rutas biosintéticas alternativas para la incorporación de precursores al DNA; 4) la reparación celular del daño subletal inducido por la droga; 5) las modificaciones en la distribución subcelular de receptores a drogas (membrana, citoplasma o núcleo) son fenómenos bioquímicos cuya aparición, innata o adquirida, en el seno del tumor, justifican la existencia de clones resistentes. Por otra parte, procesos dependientes del huésped como: i) la inducción de actividad enzimática catabólica para los fármacos en tejidos distintos al tumor; ii) las reacciones inmunológicas frente a drogas de capacidad antigénica, pueden contribuir a explicar biológicamente los estados de resistencia adquiridos.

De cualquier forma, la diversidad fenotípica del tumor tiene una indudable base genética (149,236) habiéndose descrito la amplificación de determinados genes como causa de la resistencia de células tumorales al tratamiento citotóxico (246). Así, la amplificación genética se traduce por la sobreproducción de una proteína que, para el methotrexate, es la enzima tetrahidrofolato-reductasa.

Las células resistentes constituyen en sí mismas una subpoblación heterogénea con múltiples cambios cromosómicos (97,246). Esto hace que los fenómenos de

transporte transmembrana así como la acumulación intracelular de droga resulten modificados (97,286). Por otro lado, la selección de variantes celulares resistentes a drogas específicas tales como los alcaloides de la Vinca, colchicina, antraciclina, actinomicina D, o bleomicina (146) se acompaña, a menudo, por la expresión de un fenotipo complejo que muestra resistencia cruzada a otras drogas no relacionadas. Esta característica se define bajo el concepto de fenotipo resistente múltiple avanzado por el modelo de Goldie (104). Las células en estado de resistencia múltiple presentan cambios en la membrana plasmática e incorporan intracelularmente menos cantidad de droga que las células sensibles. Las modificaciones de la membrana celular parecen estar en relación con la expresión incrementada de un antígeno de naturaleza glicoprotéica de 170.000 dalton de peso molecular (146).

Sobre bases matemáticas, y en contradicción con los trabajos de Goldie y Coldman (103,104), Hokanson y col. (124), estudiando la respuesta "in vivo" del mieloma relacionan los estados de resistencia celular a la quimioterapia con la cinética de proliferación tumoral. Así el fenotipo resistente se asociaría con largos tiempos intermitóticos y, de acuerdo con su teoría, la misma droga, o combinación de drogas, administradas en esquemas de dosis/secuencia/tiempo diferentes, podría

ser desde "curativa" hasta "minimamente eficaz" en función de las propiedades cinéticas del tumor.

Parece existir acuerdo general en lo que a la relación de la masa celular total y probabilidad de existencia de células resistentes se refiere (103). En valores absolutos cabría esperar que antes del inicio del tratamiento químico de un tumor cualquiera el número de células sensibles fuese superior al número de células resistentes a una de las drogas utilizadas y este a su vez, mayor que el de células resistentes a dos o más fármacos, si esta subpoblación existe. También debe esperarse una relación directa entre la masa del tumor y la proporción relativa entre células proliferativas y células quiescentes (260). Las células quiescentes son altamente resistentes a los antimetabolitos y a los inhibidores de la mitosis pero no son refractarias ni a los agentes alquilantes ni a los intercalantes. Por otra parte, después de una respuesta positiva del tumor, la selección quimioterapéutica de las células en reposo no puede, como hace Valeriote (293), invocarse para justificar la recidiva o progresión tumoral que se objetiva, a veces, en el curso de un tratamiento continuado con el mismo fármaco. Sin embargo, la selección y el exceso de crecimiento de las células resistentes durante el tratamiento, puede justificar gran número de

los casos de recidiva tumoral tras cierto intervalo de remisión o control de la enfermedad (257).

En este sentido es importante destacar que los resultados de varios estudios cuantitativos sobre quimioterapia demuestran que no existe, en la práctica, probabilidad de curación cuando el tumor alcanza un determinado volumen (258). Por otra parte las remisiones parciales se explican, en virtud de la teoría de la mutación somática, como la reducción a dimensiones no medibles de la población celular sensible, acompañada del incremento hasta niveles de detección clínica de la masa de células quimiorresistentes (260). Las remisiones completas (desaparición de los elementos celulares quimiosensibles en el plano clínico) pueden seguirse, tras cierto intervalo libre de enfermedad, de la recidiva. Si el tumor recidivado ofrece un patrón de sensibilidad análogo al del tumor primitivo la conclusión que se deriva es que el tratamiento fue incapaz de reducir a cero la población de células neoplásicas clonogénicas. Sin embargo, la situación más frecuente es la definida por aquellas recidivas tumorales que muestran resistencia a una o más de una de las drogas utilizadas en el tratamiento del tumor primitivo (245), fenómeno que está de acuerdo con el modelo de Goldie y Coldman (104).

1.5. TERAPIA SISTEMICA ADYUVANTE EN CANCER DE MAMA.

1.5.1. Quimioterapia.

El concepto de cáncer de mama como enfermedad sistémica desde el comienzo se apoya en el hecho de que el 70-80% de las pacientes fallecen a causa de la diseminación de su enfermedad (32,201). Conocida, por otra parte, la eficacia de la quimioterapia en el tratamiento paliativo de las metástasis del carcinoma, parece lógico pensar que la utilización de esta modalidad terapéutica en las enfermas diagnosticadas de cáncer clínicamente localizado, pueda prevenir el desarrollo ulterior de las metástasis distales, esterilizando los depósitos tumorales o, cuando menos, retardando la aparición clínica de las mismas.

Nuestros conocimientos actuales permiten afirmar que la cinética de crecimiento celular de las micrometástasis se aproxima al modelo descrito por una ecuación exponencial creciente (287) y que la destrucción celular quimioinducida, se ajusta a una ecuación cinética de primer orden (257). De acuerdo con esto, una droga que sea capaz de destruir el 99,9% de las células tumorales con capacidad de autorrenovación, con-

trolará -"esterilizará"- agregados celulares que posean, como máximo, 100 células clonogénicas; sin embargo, el tratamiento de metástasis que contengan p.ej. 10^3 células, con el mismo régimen y la misma dosis de quimioterapia, reducirá la masa tumoral en un factor de 10^{-3} con lo que el efecto citolítico se traducirá en la práctica, por un incremento del periodo de enfermedad oculta o, lo que es lo mismo, por una prolongación del intervalo libre de enfermedad.

La publicación del ensayo del **NSABP** (81) y del **Instituto Nazionale dei Tumori** de Milán (22) suponen el comienzo real de la utilización, con criterios científicos, de la quimioterapia adyuvante. En efecto:

Desde el trabajo inicial de Fisher (81) se conoce que el beneficio de la monoquimioterapia con L-PAM queda restringido a un subgrupo concreto de pacientes. En efecto, la administración de L-PAM (0,15 mg/kg/día durante 5 días consecutivos, 6 semanas de intervalo, 2 años de tratamiento) a pacientes tratadas quirúrgicamente (mastectomía radical o radical modificada) y con invasión locorregional del tumor (adenopatías axilares afectas) tuvo como consecuencia el incremento del intervalo libre de enfermedad en el conjunto de pacientes premenopáusicas. El interrogante fundamental que surge de ese estudio, correctamente formulado por sus propios autores, es el siguiente: ¿los re-

sultados de mayor intervalo libre de enfermedad son permanentes, lo que equivaldría a la curación con quimioterapia de una cierta fracción de pacientes afectas de enfermedad tumoral subclínica o, por el contrario, son solo transitorios y tras el seguimiento de los grupos control (tratado con placebo) y problema (tratado con L-PAM) asistimos a la convergencia de resultados?

La demostración de la superioridad en cuanto a eficacia se refiere, de la poliquimioterapia sobre la monoquimioterapia en el tratamiento del cáncer de mama avanzado (33,44,47,160) condujo al grupo del I.N.T. (27), al estudio del efecto terapéutico de la administración prolongada de ciclofosfamida, methotrexate y 5-fluorurucilo (CMF), en el periodo libre de enfermedad de mujeres tratadas quirúrgicamente de cáncer de mama y consideradas en riesgo de enfermedad progresiva. Los resultados inicialmente comunicados por Bonadonna y col. (22) demostraron la disminución, estadísticamente significativa, de los índices de enfermedad recurrente en el grupo de pacientes tratadas.

El beneficio de la poliquimioterapia, evaluado a los 27 meses del inicio de tratamiento, se extiende a todos los subgrupos de pacientes, con independencia de la edad, el estado menstrual o el grado de invasión tumoral de los linfáticos axilares. Una publicación posterior realizada por los mismos autores (27), ha puesto

de manifiesto que las diferencias en favor del grupo tratado con CMF se siguen manteniendo, aunque matizadas, tras seis años de seguimiento. En efecto, la supervivencia global en el grupo tratado fue del 73,9% frente al 64,5% en el grupo control. Estas diferencias que carecen de significación estadística ($p = 0,12$) obligaron a la estructuración de las enfermas tratadas en subgrupos definidos por el estado menstrual. Proce- diendo así, los índices de supervivencia en el conjunto de mujeres premenopáusicas han resultado claramente superiores para el subgrupo tratado que para el corres- pondiente control ($p = 0,002$). En mujeres postmenopáu- sicas, por el contrario, el beneficio del tratamiento con CMF parece nulo ($p = 0,57$) (10).

1.5.1.1. Eficacia de la quimioterapia adyuvante en relación con ciertos factores determinantes del pronóstico.

Tal como se ha indicado anteriormente los be- neficios de la quimioterapia adyuvante parecen limita- dos a determinados subgrupos de enfermas. Comoquiera que la terapia citotóxica no está exenta de efectos se- cundarios nocivos para las paciente y sus implicaciones socioeconómicas son considerables, resulta de primor- dial importancia definir con precisión las caracterís- ticas que deben reunir las enfermas para que la rela-

ción costo/beneficio del tratamiento alcance un valor óptimo. En este sentido los criterios de selección de enfermas se apoyan en los siguientes elementos:

- 1) El número de linfáticos axilares afectos por el tumor.

La probabilidad de diseminación tumoral depende del tamaño del primario y del grado de afectación de los linfáticos axilares y parece que ambas magnitudes son independientes (10).

Son numerosos los ensayos clínicos dirigidos a investigar la eficacia de la terapéutica adyuvante en relación al número de nódulos linfáticos axilares afectos por el tumor (27,30,86,157,231,232,249). Los resultados obtenidos, contradictorios en ocasiones, parecen demostrar que el mayor beneficio de la quimioterapia adyuvante se consigue en el subgrupo de enfermas premenopáusicas en las que la invasión tumoral linfática es moderada (subgrupo N+, 1 a 3 adenopatías tumorales). Cuando aumenta el número de adenopatías afectas (subgrupo N+, 4 o más adenopatías tumorales) los resultados de supervivencia global y libre de enfermedad en pacientes premenopáusicas sometidas a tratamiento demuestran nuevamente que el beneficio se limita fundamentalmente a ese subgrupo. Sin embargo, el hecho de que tras el cese de la terapéutica los índices de reci-

diva encontrados, tanto para enfermas sometidas a tratamiento adyuvante como para enfermas tratadas con placebo, sean prácticamente iguales (86) sugiere que el incremento de los índices de supervivencia se deba más a un retraso en la recurrencia que a una verdadera erradicación de la enfermedad (166). No es posible, a pesar de ello, generalizar los resultados del ensayo del NSABP (86) y extender sus conclusiones a investigaciones clínicas que hacen uso de pautas de tratamiento más agresivas y parece que las pacientes tratadas con poliquimioterapia van, en general, mejor que las tratadas con un único fármaco y éstas mejor que las no tratadas (250).

Más sorprendente resulta aún la escasa eficacia de la quimioterapia adyuvante en el conjunto de enfermas sin afectación axilar. Se ha estudiado, en ausencia de afectación aparente de los ganglios linfáticos, la utilidad de otros elementos como indicadores de alto riesgo de recidiva tumoral, entre ellos el tamaño del tumor, el índice de marcaje con timidina, la localización del tumor en los cuadrantes internos de la mama, el grado de diferenciación histológico, la edad de la enferma, la ausencia de receptores para estrógenos y progesterona y, si bien la información disponible acerca de los resultados del tratamiento continuado en cáncer de mama estadio I, no es aun suficiente, se puede

establecer que el tratamiento sistémico no debe ser una rutina para todas las enfermedades cuyo estadiaje patológico corresponda al subgrupo N- (157,200,251).

Skipper (257) utilizando el concepto de masa tumoral residual y considerando el modelo de Goldie y Coldman, recomienda que, supuesto bajo, medio o alto, el contenido en células clonogénicas tumorales que quedan en el cuerpo del paciente tras el tratamiento ablativo del tumor, el número de drogas a utilizar en quimioterapia debe ser adecuado a esos contenidos y a la probabilidad de que existan células resistentes al agente químico empleado. Así, para $N = 0$, la masa tumoral residual media se estima en 10^4 células y puede ser suficiente la utilización de una única droga para conseguir la curación del tumor; sin embargo cuando $N = 1-3$, se supone mayor ($\approx 10^6$ células) la cantidad de tumor residual y con ello aumenta la probabilidad de que existan células mutadas resistentes al fármaco. Esta circunstancia justifica el empleo de, al menos, dos fármacos para efectuar el tratamiento sistémico. Por último, cuando el número de linfáticos afectados por el tumor es 4 o más de 4, el tumor residual alcanza 10^9 elementos y existe cierta probabilidad de encontrar poblaciones celulares resistentes a dos drogas. En este caso se considera que el tratamiento adecuado debe hacer uso de una combinación de tres o más fármacos que

no posean resistencias cruzadas, para intentar la curación de cierto número de enfermas.

Todo lo anterior hace razonable el aceptar que los regimenes de quimioterapia adyuvante administrados a pacientes con diverso grado de afectación ganglionar pueden, en cierta fracción de enfermas, ser curativos. Afortunadamente hoy día (166) se están desarrollando amplios estudios randomizados para investigar y analizar más profundamente este problema.

ii) El estado menstrual.

Si bien los ensayos iniciales (22,81) demostraron que solo las mujeres jóvenes se beneficiaban del tratamiento sistémico complementario, hoy día se sabe que es posible mejorar también los índices de supervivencia y supervivencia libre de enfermedad en el grupo de mujeres postmenopáusicas sometido a poliquimioterapia (24,61,101,251). Quizás el aspecto más debatido en estos trabajos sea la utilización, como punto de referencia, de series históricas de pacientes no sometidas a ningún tratamiento tras cirugía. La comparación de los datos de supervivencia y de intervalo libre de síntomas puede resultar falseada al no existir una distribución randomizada de las pacientes entre los dos grupos sometidos a análisis comparativo (61,198).

La incorporación de la adriamicina a las pautas de tratamiento adyuvante (138) ha demostrado ser eficaz en todos los subgrupos definidos tanto por el estado menstrual como por el número de linfáticos afectados.

1.5.2. Tratamiento endocrino adyuvante.

El importante papel que la terapéutica endocrina juega en el cáncer de mama avanzado (46,102,148), la existencia objetiva de remisiones tumorales y el elevado índice de respuestas observadas han conducido a la búsqueda de criterios útiles para la definición de categorías de pacientes de cáncer de mama con enfermedad residual subclínica probable que pudieran beneficiarse de la manipulación hormonal.

En 1.968 se inició en Manchester por Cole y col. (56) el primer ensayo clínico encaminado a determinar el valor de la castración profiláctica, como medida adjunta a la cirugía, para el control de enfermas afectas de cáncer operable de mama. Este ensayo, en el que entraron sólo pacientes premenopáusicas -con o sin invasión de los linfáticos axilares-, demostró la eficacia de la combinación terapéutica al incrementarse notoriamente, en el grupo de pacientes así tratadas,

el intervalo libre de enfermedad, pero no pudo ponerse de manifiesto que la supervivencia a largo plazo (5-10 años) de las pacientes castradas fuese superior a la de las no castradas.

Desde entonces diferentes estudios realizados al respecto han mostrado resultados contradictorios. Así, Nissen-Meyer y col. (206), en el curso de un ensayo clínico prospectivo de irradiación ovárica profiláctica, estimaron haber conseguido ambos objetivos, mientras que Ravdin y col. (225) no encontraron diferencias significativas en la supervivencia a 3-5 años. Importante es, sin embargo, el hecho señalado por Nissen-Meyer (206) y otros (186) de que la administración de prednisona a pacientes castradas eleva significativamente el nivel de supervivencia de las pacientes de cáncer de mama respecto al observado en grupos de enfermas sometidas a cirugía o a cirugía y castración. (Probablemente la prednisona produce este efecto por vía de supresión de los estrógenos de origen adrenal) (186).

Es importante destacar que la combinación cirugía, irradiación ovárica (castración) y prednisona, en pacientes premenopáusicas con linfáticos axilares histológicamente positivos resulta tan efectiva como la combinación cirugía y quimioterapia (CMF) (83). La im-

portancia de esta observación reside en el destacado papel que la terapia hormonal adyuvante puede jugar, como medida complementaria o alternativa a la quimioterapia, en el tratamiento del cáncer de mama operado.

Desde el punto de vista de la morbilidad, la terapéutica hormonal es, evidentemente, menos agresiva que la quimioterapia y su coste económico es por otra parte muy inferior. La similitud de resultados ofrecidos por ambos esquemas terapéuticos otorga, probablemente, a la utilización de la hormonoterapia como procedimiento adyuvante de las medidas locales (cirugía y radioterapia) un papel predominante.

1.5.2.1. Selección de pacientes para el tratamiento hormonal.

La respuesta clínica a los variados tipos de manipulación hormonal anteriormente descritos, dista mucho de ser general. En efecto, sólo una cierta fracción de pacientes de cáncer de mama -variable en función de la acción hormonal instaurada- presenta una mejoría evidente de su proceso neoplásico. Por ello, la identificación previa de los subgrupos de enfermas con respuesta positiva de tratamiento hormonal reviste considerable importancia.

1.5.2.2. La determinación de receptores hormonales.

El mecanismo de la acción hormonal en cáncer de mama y el empirismo subyacente tanto en la selección de pacientes (39) como en la elección de la terapia endocrina, comenzaron a desaparecer en la década 1.960-1.970 con la introducción clínica de los métodos de detección y medida de receptores hormonales. Una de las etapas iniciales para el desarrollo de tales métodos fue la síntesis de derivados radiactivos de moléculas estrogénicas con elevada actividad específica. En 1.961 Folca y col. (92), encontraron, en efecto, correlación entre el acúmulo de hexestrol-³H en tumores mamarios y la respuesta al tratamiento hormonal ablativo, de forma que si el tumor, antes de la cirugía, era capaz de concentrar la molécula marcada, inyectada intravenosamente, la eficacia del tratamiento hormonal resultaba ser muy elevada. Por el contrario, en ausencia de acúmulo de hexestrol-³H la posibilidad de respuesta positiva apareció como nula.

Jensen y col. (134) iniciaron una nueva aproximación al conocimiento de los mecanismos de acción hormonal demostrando, en animales de experimentación, el enlace preferencial de la molécula de estradiol tritiado sobre útero y vagina. Este acúmulo de la hormona no se producía en tejidos "no blanco" de la acción es-

trogénica. En 1.966 Toft y Gorski (281) aislaron y caracterizaron parcialmente, del tejido uterino de la ratona, una sustancia de elevado peso molecular y de coeficiente de sedimentación del orden de 9,5 S, cuyas propiedades físico-químicas y de reactividad con enzimas proteolíticas resultaron indicativas de la naturaleza protéica de la macromolécula, dotada por otra parte, de la propiedad de enlazar específicamente el 17- β -estradiol- 3 H a concentraciones fisiológicas. Como el enlace hormona-proteína se inhibía en presencia de dietilstilbestrol, inhibición que resultaba ser sólo parcial cuando se utilizaba como competidor el 17- α -estradiol, la macromolécula receptora parecía, entonces, ser capaz de distinguir entre los estereoisómeros del estradiol (281).

Extensas investigaciones realizadas por Jensen y col. (135) han demostrado que, tanto "in vivo" como "in vitro", los tejidos blancos de la acción estrogénica poseen un componente único denominado "receptor". El enlace reversible entre la hormona y el receptor, sin que exista transformación química de la molécula esteroidea, parece ser la primera etapa del proceso uterotrópico. La interacción del estradiol con los tejidos "blanco" incluye dos fenómenos distintos: **Captación y Retención**. El último proceso puede ser saturado "in vivo" si la hormona administrada excede los

niveles fisiológicos (135). Jensen (137) postula que la captación del estradiol por la célula "blanco" se realiza por la macromolécula receptora de coeficiente de sedimentación 9,5 S, una vez que el 17- β -E₂ penetra en la célula por difusión pasiva. Este complejo R-E transfiere la hormona al núcleo mediante un proceso, dependiente de la temperatura, que consume receptor 9,5 S. La formación del complejo R-E nuclear de coeficiente de sedimentación 5 S puede ser el resultado de la ruptura de la molécula 9,5 S. Posiblemente la proteína extranuclear sea sólo un "transportador" del E₂ y la célula responda a la acción hormonal por un mecanismo independiente de la molécula citoplasmática.

En 1.967 Jensen y col. (136) encontraron receptores citoplasmáticos de estrógenos en el tejido tumoral de pacientes afectas de cáncer de mama. Desde entonces se ha venido especulando incesantemente con la hormonodependencia de tales cánceres.

Los últimos años han presenciado un desarrollo vertiginoso de los métodos de medida de receptores así como la aparición de innumerables publicaciones (183,185) referentes unas veces a la utilización de los RE en la predicción de la respuesta tumoral a una determinada manipulación hormonal y otras al diseño de estrategias terapéuticas diversas encaminadas al con-

trol de la enfermedad neoplásica maligna de la mama. Consecuencias de tales estudios han sido, la noción de respuesta improbable a cualquier tipo de terapia endocrina en ausencia de receptores, la predicción de respuesta favorable en un determinado porcentaje de casos receptor positivo (55-60% aproximadamente) y la aparición consiguiente de un método racional de selección de pacientes para tratamiento hormonal.

En cáncer de mama la importancia de la detección y cuantificación de los receptores estrogénicos radica en los siguientes hechos (178):

a) La presencia o ausencia de receptores citoplasmáticos de estrógenos (RE) en el homogeneizado de un tumor es esencial para diferenciar la hormonodependencia u hormono independencia del tumor en cuestión.

b) El fenotipo RE+ o RE- del tumor analizado ha resultado ser de valor predictivo en la respuesta ulterior a la manipulación hormonal a que han sido sometidas las pacientes afectas.

c) En alguna medida el fenotipo del receptor y sobre todo su nivel de concentración intratumoral es, o puede ser, reflejo de diferencias de comportamiento de los distintos clones celulares que lo componen. El re-

conocimiento de este hecho ha tenido importantes consecuencias terapéuticas y ha permitido, por un lado, estratificar a las pacientes afectas de cáncer de mama avanzado en subgrupos diferentes de acuerdo con la naturaleza del arma terapéutica empleada (ovariectomía, antiestrógenos, quimioterapia, quimio más hormonoterapia, etc.) y por otro, conferir con eficacia inesperada a la hormonoterapia el papel de tratamiento adyuvante en cáncer de mama localizado (187).

1.5.2.3. Receptores de estrógenos y pronóstico en cáncer de mama.

La primera evidencia del papel como elemento de pronóstico que poseen los receptores estrogénicos en cáncer de mama es reciente. Fue publicada por Knight y col. en 1.977 (154). En ella quedó demostrado que independientemente del estado axilar, la edad, el tamaño del primario y la localización de éste en la mama, las pacientes con tumores RE+ recidivan menos que las pacientes con fenotipo tumoral RE- y muestran, por otra parte, mejores índices de supervivencia global. Posteriormente Maynard (180) y Bishop (17), hicieron notar que el fenotipo RE carecía de valor discriminante en el pronóstico de las enfermas con tumores en estadio I, pero resultaba de valor fundamental en presencia de in-

vasión linfática axilar. En efecto, los niveles de supervivencia libre de enfermedad en pacientes postmenopáusicas tratadas sólo quirúrgicamente resultaron ser del 89% frente al 61% (2 años) y 49% frente a 15% (3 años). Estudios posteriores han confirmado los hallazgos descritos. Rich y col. (227) por un lado, Gapinski y Donegan por otro (98), Samaan y col. (239) luego y Kinne (153) en cuarto lugar, han puesto de manifiesto el peor pronóstico, un mayor nivel de recidiva y una más baja supervivencia en pacientes RE- en estadio II con cuatro o más nódulos axilares positivos.

Maynard y col. (180) fueron, por otra parte, los primeros en describir la existencia de una estrecha relación entre el fenotipo del receptor y el grado de diferenciación tisular. Su estudio, posteriormente confirmado (150,227), puso de manifiesto la frecuente asociación existente entre el fenotipo RE- y el grado histológico III de diferenciación tumoral (tumor escasamente diferenciado). Actualmente, y en virtud de correlaciones de orden histológico establecidas con el fenotipo tumoral RE+/RE- por Antoniades y Spector (8), Fisher (85) y Lesser (161), entre otros, ha quedado claro que los tumores RE+ suelen presentar un buen, o moderado, grado de diferenciación tumoral (I-II), alto grado nuclear (II-III), ploidia normal, bajo ritmo de crecimiento (tiempo de duplicación largo) y respuesta

del huésped mínima (traducción de un potencial invasor del tumor escaso), datos todos ellos, de buen pronóstico.

Por el contrario, los tumores RE- suelen presentar escasa diferenciación tumoral, bajo grado nuclear, aneuploidia, cortos tiempos de duplicación y marcada respuesta defensiva del huésped (en términos de infiltrado inflamatorio peritumoral). Los datos de observación resultantes de las experiencias realizadas en nuestro laboratorio (76) coinciden con lo anteriormente expuesto. En efecto, ha sido posible demostrar que el mejor grado de diferenciación tumoral, la ausencia de una reacción defensiva del huésped (indicio de crecimiento celular lento y por tanto de escasa agresividad tumoral), la presencia de elastosis tumoral, que junto con la presencia de elementos tumorales constituyen elementos característicos de diferenciación tumoral y el escaso desarrollo de necrosis tumoral (frecuente en tumores agresivos de rápida cinética) se asocian sistemáticamente con el fenotipo RE+.

De todo ello, es fácil deducir a la luz de los datos actuales, que la caracterización tumoral definida por la presencia o ausencia de receptores hormonales se presenta como un elemento de primordial importancia en

el establecimiento del pronóstico y la estrategia terapéutica de las enfermas afectas de cáncer de mama.

1.5.2.4. Teoría actual de la acción estrogénica.

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 (147). 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 (224,300) 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 (307) e inmunocitoquímicos (152,220,221) recientes sugieren que la mayor parte del receptor estrogénico 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 (106). Si bien no se conoce cual es el aceptor del receptor activado, se cree que determinadas secuencias específicas del DNA (49,57,139,216), las ribonucleoproteínas (165), ciertas proteínas básicas no histonas (223), la matriz nuclear (13,14) y los complejos entre el DNA y las proteínas acidicas no histonas (265) 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 1.4. De acuerdo con este modelo (261), 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) (54). En el núcleo interacciona con el receptor "no ocupado" y como resultado de esa interacción se forma un complejo [RE-E₂] activado (¿dimérico? (77)). Al menos dos formas distintas del complejo activado se enlazan en la cromatina. Una de ellas puede ser extraída con solución salina de ClK 0,4 M, mientras que la otra es resistente a este proceso de extracción y puede estar asociada con el DNA activo de la matriz nuclear (106).

ESQUEMA DE LA ACCION ESTROGENICA EN LA CELULA BLANCO

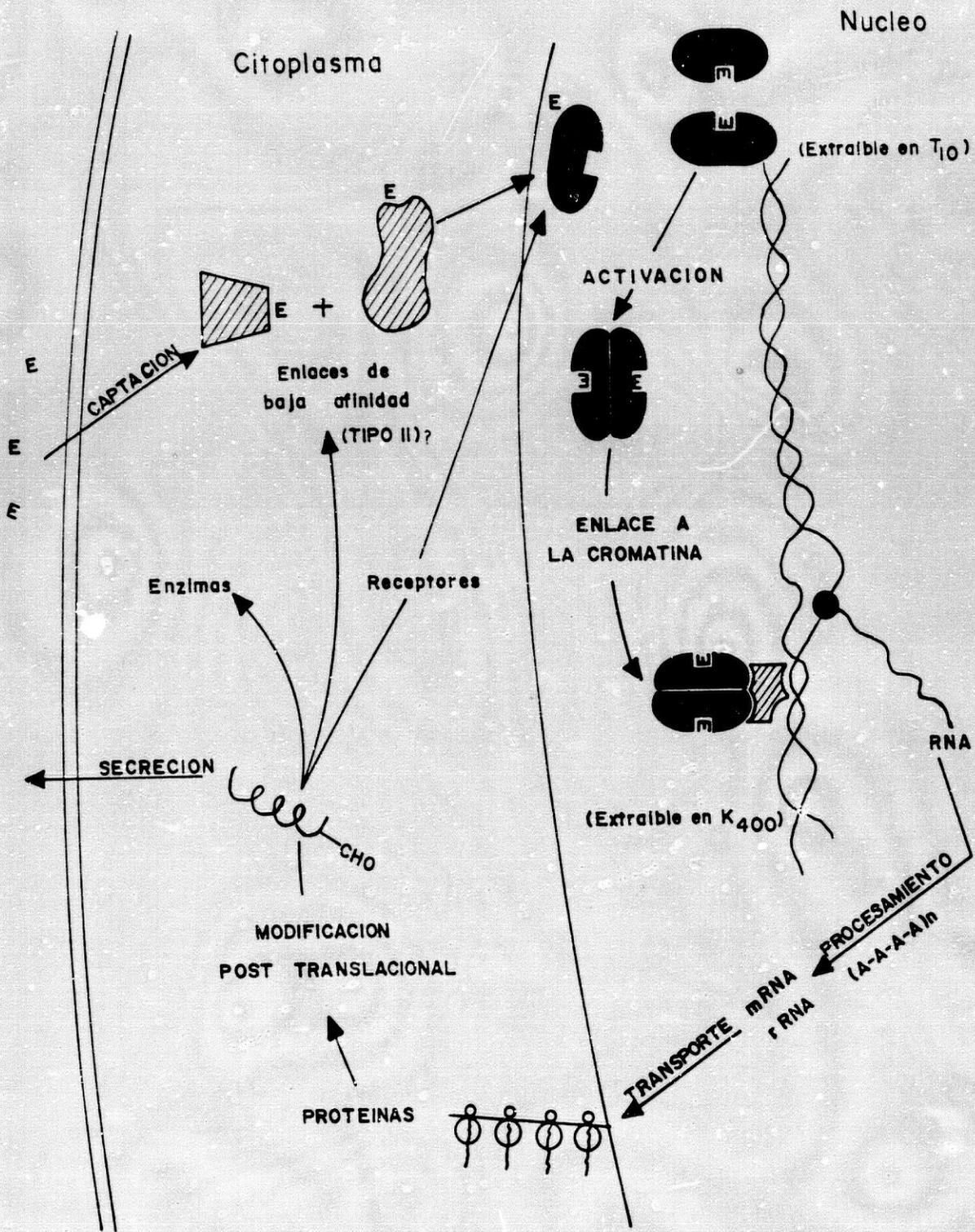


FIG.-1.4.

1.5.2.5. Síntesis y degradación del receptor.

Como consecuencia de la acción del $17\text{-}\beta\text{-E}_2$ 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 (262):

a) La teoría de la acción directa positiva, de acuerdo con la cual el $17\text{-}\beta\text{-E}_2$, por sí mismo, estimularía 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 iniciaría el proceso proliferativo o, tal vez, de un factor facilitante (activador del plasminógeno), que haría posible la invasión de los espacios adyacentes, a nuevas células.

c) La teoría indirecta negativa que supone que el $17\text{-}\beta\text{-E}_2$: 1) bloquearía la síntesis y/o la liberación de un factor inhibidor específico secretado por las células sensibles a la acción estrogénica; 2) neutralizaría 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, 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 $^2\text{H}_2$, $^{15}\text{N}_7$, $^{13}\text{C}_6$, han permitido estudiar, sobre células MCF-7, la velocidad de síntesis y el turnover del receptor de estrógenos (72,247). Se ha podido averiguar, así, que la proteína se sintetiza muy rápidamente ($0,3-0,5 \text{ pmol/mg} \times \text{DNA} \times \text{h}$) (72) y que su vida media biológica es corta (≈ 4 horas tanto para la fracción extractable del receptor, "receptor citosólico", como para el receptor nuclear) (72). 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 (72).

1.5.2.6. 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, (184,235,255) la historia terapéutica de la paciente y la celularidad del tumor (305).

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: a) la exposición de las células a sustancias de acción hormonal tales como la prolactina (252), insulina (41) y estrógenos (127); b) el laboratorio de origen de las células (129); c) la fase de crecimiento en que se encuentre el cultivo (34,64). Los resultados obtenidos han demostrado la existencia de una relación inversa entre la actividad proliferativa y la concentración del receptor (133) y han puesto de manifiesto, por otra parte, que en células sincronizadas el contenido en RE depende de la fase del ciclo celular en la que se encuentre, predominantemente, el cultivo (133).

OBJETIVOS

1.6. OBJETIVOS.

Los objetivos esenciales que hemos pretendido cubrir mediante el presente trabajo de investigación pueden ser resumidos en la forma siguiente:

1.- OBJETIVOS CLINICOS.

1.1.- Determinación de los índices de positividad y negatividad de receptores de estrógenos y progesterona en cáncer de mama humano.

1.2.- Análisis de la evolución de un conjunto suficiente de enfermas de cáncer de mama operable y fijación del valor pronóstico de ciertos factores (tamaño del tumor, estado axilar, fenotipo del receptor y grado histológico de diferenciación).

1.3.- Estudio de las relaciones de asociación o independencia del fenotipo RE con la edad (estado menstrual), el tamaño tumoral, el estado axilar, el grado de diferenciación histológica y el fenotipo del receptor de progesterona.

1.4.- Definición de las relaciones existentes entre aquellos factores que, siendo o no independientes unos de otros, condicionan el pronóstico de la enfermedad tumoral mamaria.

1.5.- Establecimiento de los índices de probabilidad de supervivencia global y supervivencia libre de enfermedad en función de los elementos anteriormente enunciados.

2.- OBJETIVOS EXPERIMENTALES.

2.1.- Estudio de la cinética de proliferación de células MCF-7 en condiciones experimentales de cultivo diferentes y análisis de la acción de hormonas estrogénicas, antiestrógenos y factores de crecimiento no estrogénicos sobre la actividad proliferativa de las mismas.

2.2.- Determinación de los niveles de receptores de estrógenos y progesterona en condiciones de rápida y lenta cinética de crecimiento del cultivo.

2.3.- Estudio de la relación existente, si la hubiere, entre concentración de receptores de estrógenos y

de progesterona y la fase del ciclo mitótico de las células MCF-7.

2.4.- Análisis de la influencia ejercida por el Epidermal Growth Factor (EGF) sobre la síntesis de receptores de estrógenos y de progesterona en cultivos de células hormonodependientes MCF-7.

2.5.- Investigación en células hormonoindependientes (EVSA-T) de los efectos derivados de la deprivación del suplemento de suero de feto de ternera y valoración, en distintas situaciones experimentales, de los cambios observables en la concentración intracelular de receptores hormonales.

MATERIAL Y METODOS

II. MATERIAL Y METODOS.

2.1. INSTRUMENTACION.

2.1.1. Congeladores.

Para el almacenamiento de muestras hemos utilizado un arcón congelador, marca Selecta modelo 455, capaz de alcanzar la temperatura de -80°C . La temperatura de operación durante todo el tiempo que ha durado este trabajo ha sido de -70°C .

2.1.2. 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 Lopez S.A., cuya temperatura está regulada a $4 \pm 1^\circ\text{C}$.

2.1.3. Pulverizador.

La fragmentación del espécimen tumoral mamario, ultracongelado en nitrógeno líquido, se ha realizado en un pulverizador que actúa por percusión y permite la transformación en polvo de la muestra tisular.

2.1.4. Homogeneizador.

Para la obtención de la fracción citosólica hemos utilizado un homogeneizador Braun cuya velocidad de rotación se puede regular entre 150 y 1.500 r.p.m.

2.1.5. Ultracentrífuga.

Para la obtención de la fracción soluble del citoplasma hemos utilizado una ultracentrífuga Beckman, modelo L8-70, suministrada por Beckman Instruments Inc., Palo Alto, California, U.S.A., dotada con un microprocesador para controlar y prefijar las condiciones en que las experiencias se llevan a cabo.

Las condiciones de ultracentrifugación para la obtención del citosol fueron en todos los casos:

- Vacío.
- Velocidad = 33.000 r.p.m.
- Valor G = 100.000 (r_{max}).
- Temperatura = 4°C.
- Tiempo = 1 hora.

2.1.6. Centrífuga refrigerada.

Hemos utilizado una centrífuga convencional, marca Beckman, modelo TJ-6, dotada con una unidad adicional de refrigeración que permite centrifugar muestras a baja temperatura.

La centrifuga posee un rotor con soportes intercambiables que permiten la centrifugación simultánea de un número de muestras variable (4-120 muestras).

2.1.7. Centrifuga.

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

2.1.8. Contador de centelleo líquido.

Hemos utilizado un espectrómetro de centelleo líquido, marca Beckman, modelo LS2800, de Beckman Instruments Inc., Irvine, California, U.S.A., con capacidad para 336 a 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 radiactivo en fotones luz, al quedar dicha radiación atenuada, o frenada, en ciertos materiales. Cuando el material centelleador es

un compuesto orgánico (tolueno, benceno o dioxano, por ejemplo) que actúa como disolvente de compuestos orgánicos especiales (solutos), el proceso se denomina centelleo líquido y a la disolución centelleadora "líquido de centelleo" o "fósforo". El material radiactivo, solubilizado en ese líquido, puede ser analizado en condiciones de máxima eficiencia.

Una solución para "centelleo líquido" consta, entonces, de tres componentes básicos: El disolvente, el soluto y la muestra. El proceso de centelleo resulta afectado por la naturaleza y la cantidad de cada uno de esos componentes. El átomo radiactivo, 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 y si la elección de este compuesto es adecuada, la transferencia: energía de excitación del disolvente → energía de excitación del soluto puede ser cuantitativa. 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 usualmente constituye el 1% P/V respecto al disolvente y en algunos casos un segundo soluto se adiciona 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 sobre el fotomultiplicador incide un número suficiente de fotones 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 genericamente "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 conteo.

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 Cesio-137 como fuente radiactiva externa.

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

2.1.9. Espectrofotómetro.

Hemos empleado un espectrofotómetro ultravioleta/visible Beckman, modelo 34C de Beckman Instruments Inc., Irvine, U.S.A., 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 visible del espectro) 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.

2.1.10. Balanza de precisión.

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

2.1.11. 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.

2.1.12. Estufa para cultivos celulares.

Hemos utilizado un incubador ASSAB T-304, termostaticado y 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 CO₂ 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 CO₂, inyectado en el incubador, a través de dos cubetas llenas de agua destilada. La exactitud del sensor térmico se sitúa en tor-

no a $\pm 0,05^{\circ}\text{C}$ y las variaciones de temperatura en el interior de la estufa no superan los $\pm 0,3^{\circ}\text{C}$. Para la regulación de la presión parcial de CO_2 se utiliza 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 que superen el intervalo de $\pm 0,1\%$.

2.1.13. Cámara de flujo laminar.

Hemos utilizado una cabina de flujo laminar, suministrada por Flow Laboratories, para prevenir y evitar la contaminación biológica de los cultivos celulares. La circulación de aire en dirección vertical, con velocidad máxima de $0,46 \text{ m/seg.}$, se consigue mediante un ventilador.

El aire se filtra antes de entrar en la cabina 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.

2.1.14. Microscopio invertido.

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

2.1.15. Unidad de filtración.

Hemos utilizado sistemas de filtración asepticos Millipore XX11 047 10 previamente esterilizados en autoclave. Dicho sistema 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 μ de poro y 47 mm. de diámetro, tipo Millipore GSWP 04700.

2.2. REACTIVOS.

2.2.1. Hormonas radiactivas.

Como hormona radiactiva estrogénica hemos utilizado el 2-4-6-7-³H-17- β -estradiol, suministrado por

la casa Amersham International PLC, Inglaterra, con actividad específica entre 85 y 110 Ci/mMol y de concentración radiactiva 1 mCi/ml. La pureza radioquímica del trazador siempre se estimó superior al 97%. Para minimizar la descomposición las soluciones stock se almacenaron a temperatura de -20°C. En estas condiciones, la casa suministradora especifica una descomposición inferior al 1% por mes de almacenamiento. Ningún ensayo se realizó utilizando un vial que hubiese estado almacenado un tiempo superior a tres meses.

Para determinar la cuantía de receptores de progesterona el producto radiactivo utilizado ha sido la 17- α -metil-³H-promegestona, suministrado por New England Nuclear, Boston, Mass., U.S.A., con actividad específica entre 77 y 101 Ci/mMol y concentración radiactiva de 1 mCi/ml. El almacenamiento de las soluciones madre siempre se realizó a -20°C de temperatura y en ausencia de luz, condiciones en las que la velocidad de descomposición se ha estimado en 1,5% por mes. No se utilizó en ningún ensayo una solución radiactiva que hubiese estado almacenada un periodo de tiempo superior a tres meses.

2.2.2. Hormonas no radiactivas.

Los productos hormonales utilizados como competidores en los ensayos de receptores de estrógenos y progesterona han sido:

- 17- β -estradiol (Sigma E-8875)
- Dietilestilbestrol (Sigma D-4628)
- 17- α -metil-promegestona (R-5020) (Russell-Ucla).
- 17-etil-21-hidroxi-19-norpregn-4-ene-3,20-dione (ORG-2058) (Organon Co.).
- Progesterona (Sigma P-0130).
- Como sustancia de acción antiestrogénica y para sincronización de la línea celular MCF-7 hemos empleado el hidroxitamoxifeno (OH-TAM), suministrado por ICI-Pharma (ICI-79280).

2.2.3. Soluciones tampón.

Para la homogeneización tisular, la obtención del citosol y la preparación de las curvas estándar de estradiol y promegestona se ha empleado como disolución tampón la constituida por:

- Tris-hidroximetil-amino-metano: 10 mM.
(Merck).

- Acido etilen-diamin-tetracético: 1,5 mM
(Merck).

- Monotioglicerol: 10 mM (Sigma).

El pH se reguló a 7,4 utilizando acido clor-
hídrico 0,1 N.

2.2.4. Carbón dextrano.

Como adsorbente de la fracción libre de la
hormona radiactiva se ha empleado una suspensión de
carbón activo (Sigma) en la proporción del 0,5%,
recubierto con dextrano T-70 (0,05%) (Pharmacie Fine
Chemical) en solución tampón.

2.2.5. Líquido de centelleo.

En la medida de la radiactividad de la hormona
incorporada, específica o inespecíficamente, al mate-
rial biológico empleado hemos utilizado como mezcla
centelleadora Normascint-22, suministrada por los labo-
ratorios Scharlau, España. Esta mezcla está constitui-
da por: PPO (4 g/l), POPOP (0,5 g/l), Tritón X-100
(100 ml) y Tolueno hasta completar 1 litro. Cuando la
cantidad de agua incorporada al vial superó la capaci-
dad de disolución de la mezcla, se adicionó etanol ab-

solute en la proporción del 10% V/V. De igual modo, este centelleador líquido se ha usado en la medida de la radiactividad incorporada al DNA celular, en las experiencias de crecimiento.

2.2.6. Medios de cultivo celular.

Como medio de cultivo celular se ha utilizado Medio Esencial Mínimo con sales de Earle (MEM) (Gibco Bio-cult, Ltd. Scotland) suplementado con 10% de suero de feto de ternera (FCS) y antibióticos (Penicilina 100 U/ml, Estreptomina 100 µg/ml y Gentamicina 40 µg/ml). El suero de feto de ternera se inactiva antes de su uso, mediante tratamiento térmico a 56°C durante 30 minutos. El pH se regula a 7.56 utilizando bicarbonato sódico 4,2 µg/ml (Merck) y Hapes 20mM (Sigma). Los medios, una vez preparados, son reesterilizados mediante su paso a través de unidades de filtración Millipore con filtros de 0,22 µ de tamaño de poro.

2.2.7. Enzimas.

Para la realización de los subcultivos celulares y para la cuantificación de los elementos celulares presentes en el cultivo hemos 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 añade a los discos o cajas de cultivo y se deja actuar durante menos de 5 minutos a 37°C. La suspensión resultante, transferida a un tubo, se centrifuga a 1.000 g., durante 10 minutos a 4°C.

2.2.8. Precursores marcados.

En las experiencias que tienen por objeto valorar la capacidad de incorporación celular de compuestos que forman parte del DNA hemos utilizado como precursor timidina marcada con tritio (metil-³H-timidina, ³HTdR, Amershan).

2.2.9. Factores de crecimiento.

Hemos utilizado en este trabajo Epidermal Growth Factor (EGF), suministrado por la firma comercial Sigma como liofilizado estéril. A partir de él se preparó, por disolución en HANK'S una solución stock de 10 µg/ml y se guardaron partes alicuotas de 1 ml de esta disolución a -20°C hasta el momento de su uso.

2.3. MATERIAL BIOLÓGICO.

2.3.1. Muestras de carcinoma mamario humano.

Para la determinación clínica del ensayo de receptores de estrógenos y progesterona hemos dispuesto de tejido mamario tumoral maligno, obtenido en el acto operatorio por escisión de una zona adyacente a la utilizada para el diagnóstico histológico.

Antes de su procesado, las muestras se limpian de tejido graso y necrótico, y se lavan en solución tampón para evitar la presencia de contaminantes sanguíneos. Con posterioridad se congelan en nitrógeno líquido y se almacenan a -70°C . El periodo de tiempo comprendido entre la escisión quirúrgica y la congelación no superó en ningún caso los treinta minutos, durante los cuales los especímenes tumorales se conservaron en baño de hielo fundente.

2.3.2. Serie clínica: Características.

El presente trabajo estudia una población de 109 enfermas afectas de carcinoma mamario sobre cuyas piezas tumorales (tumor primario o metastásico) se ha

efectuado la determinación de receptores de estrógenos. Además, en el 70% de los casos se ha cuantificado también la capacidad de enlace del citosol frente a la progesterona.

Las características generales de la serie clínica y su distribución según: *edad, estado menstrual, tipo histológico, estadio clínico de la enfermedad, presencia o ausencia de afectación tumoral de los linfáticos axilares y tratamiento* al que han sido sometidas las pacientes figuran en las Tablas II-1 a II-6.

2.3.3. Modelo biológico de cáncer de **mama**.

La investigación en oncología se apoya sobre tres tipos de sistemas cuya complejidad decrece en el siguiente orden: a) Cáncer humano; b) Tumores trasplantados al animal inmunocompetente; c) Líneas celulares tumorales establecidas. Los esferóides tumorales, agrupación de células de estructura tridimensional que pueden ser obtenidas a partir de cultivos de células neoplásicas, constituyen un modelo de reciente incorporación para el estudio del cáncer (2) de complejidad intermedia entre los tumores "in vivo" y los cultivos "in vitro".

TABLA II-1

DISTRIBUCION DE LOS CASOS ESTUDIADOS
SEGUN LOS INTERVALOS DE EDAD

Intervalos (años)	nº casos
< 20	-
21 a 30	2
31 a 40	12
41 a 50	31
51 a 60	20
61 a 70	25
71 a 80	19
> 80	-

EDAD MEDIA DEL GRUPO = 56 años

RANGO = (27 a 80 años)

TABLA II-2

CLASIFICACION DE LAS PACIENTES ESTUDIADAS
ATENDIENDO A SU ESTADO MENSTRUAL EN EL
MOMENTO DEL DIAGNOSTICO

Estado menstrual	nº casos
Premenopausicas	36
Postmenopáusicas	73

TABLA II-3

DIAGNOSTICO HISTOLOGICO EN LA
SERIE ESTUDIADA

Tipo histológico	nº casos
C. ductal infiltrante	54
C. sólido	34
C. lobulillar	5
C. mucinoso	4
Comedocarcinoma	2
Adenocarcinoma	3
Otros tipos	7

DISTRIBUCION DE LOS CASOS ESTUDIADOS
SEGUN EL ESTADIO DE LA ENFERMEDAD

Estadio clinico nº casos

Estadio I	10
Estadio II	44
Estadio III	23
Estadio IV	32

TABLA II-5

GRADO DE AFECTACION AXILAR EN LA
SERIE CLINICA ESTUDIADA

Afectación ganglionar axilar	nº casos
Ausente	30
Presente en 1 a 3 ganglios	21
Presente en 4 o mas gánglios	35
No determinada	23

TOTAL CASOS ESTUDIADOS = 86

TABLA II-6

DISTRIBUCION DE LOS CASOS ESTUDIADOS
DE ACUERDO CON EL TRATAMIENTO REALIZADO

Tipo de tratamiento	nº casos
• CIRUGIA	
Tumorectomía-biopsia	7
Mastectomía simple	49
Mastectomía radical modificada	53
TOTAL CASOS TRATADOS	109 (100%)
• RADIOTERAPIA	
Mama completa	60
Mama en "L"	6
TOTAL CASOS TRATADOS	66 (61%)
• QUIMIOTERAPIA	
Régimen CMF	36
Régimen FAC	8
TOTAL CASOS TRATADOS	44 (40%)
• HORMONOTERAPIA	
Castración radiológica	7
Tamoxifeno	37
TOTAL CASOS TRATADOS	44 (40%)

La justificación teórica del modelo más simple para el estudio de aspectos parciales de las neoplasias humanas descansa sobre la teoría de que una sola célula alterada da origen al tumor clínico (213). Por otra parte, la neoplasia puede ser considerada como un crecimiento celular que responde positiva o negativamente a concentraciones fisiológicas o farmacológicas de ciertas hormonas y drogas. La posibilidad de disponer de una población celular homogénea y controlar de manera precisa la composición de los medios nutrientes utilizados para el cultivo celular, ha permitido el desarrollo y la aplicación de modelos tumorales sencillos para el estudio puntual de alguno de los aspectos fundamentales en investigación oncológica. De modo esquemático Freshney (96) ha resumido las principales áreas de aplicación de los cultivos celulares en la investigación biológica (Figura 2.1).

2.3.3.1. Cultivos celulares.

Las células de mamífero cultivadas durante largos periodos 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" distinta composición de nutrientes en el medio de cultivo para mantener su crecimiento y para conservar sus funciones especializadas (71).

AREAS DE INTERES EN CULTIVOS CELULARES

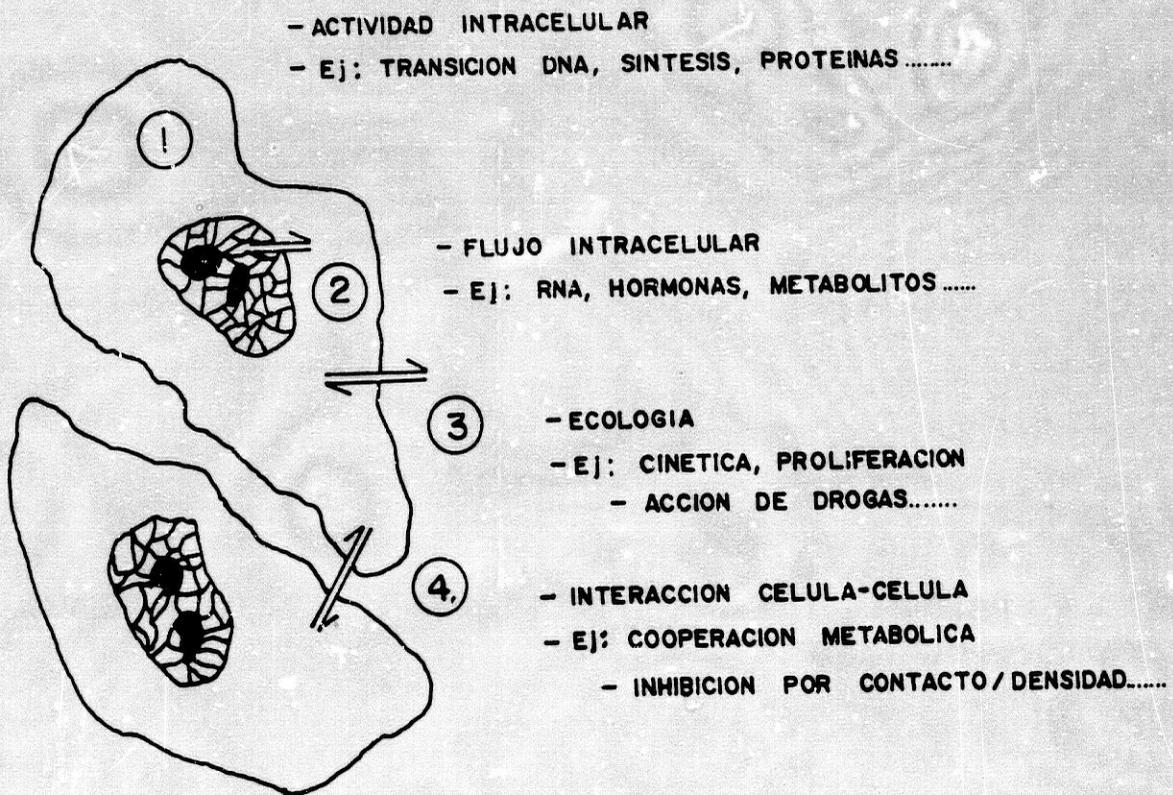


FIG.- 2.1.

La elección de un medio de cultivo y de los suplementos necesarios para la replicación celular viene determinada por las características de la célula que se desea estudiar (111).

Para clasificar las células y orientar al investigador acerca de sus requerimientos nutricionales pueden utilizarse los siguientes criterios:

- a) Cariotipo.
- b) Parámetros de la cinética de proliferación.
- 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 requisitos mínimos para el crecimiento "in vitro" de las células pueden ser de dos tipos:

- 1) Condiciones físico-químicas del medio ambiente: Se incluye aquí la temperatura (crecimiento

óptimo a 37°C), la concentración de hidrogeniones en el medio (pH óptimo: 7,4), la osmolaridad (260 a 320 mOsm/Kg) y el potencial de óxido-reducción.

2) Composición del medio de cultivo. El medio nutriente para el crecimiento celular debe incluir en disolución todos los constituyentes necesarios para que la célula supere las fases del ciclo mitótico: aminoácidos esenciales, nucleósidos, vitaminas, sales minerales y oligoelementos. Además son necesarias ciertas moléculas orgánicas capaces de suministrar energía, fundamentalmente glucosa y otros componentes que las células encuentran en los fluidos biológicos. Para suministrárselos, a la disolución anterior se adiciona en proporción variable (5-25%) suero de feto de ternera (FCS) que aporta albúmina, globulina, otras proteínas, y polipeptidos de naturaleza hormonal, hormonas no protéicas, metabolitos y factores de crecimiento (96).

Hoy día resulta fácil afortunadamente la elección del medio de cultivo apropiado puesto que muchos están disponibles en el comercio. Al mismo tiempo la fabricación de cajas y discos de plástico especial (poliestireno) tratado con polimeros como la poli-D-lisina o el colágeno, facilitan la aplicación práctica de las técnicas de cultivo celular.

Para evitar la contaminación bacteriana y de levaduras y hongos es habitual el empleo de medios de cultivo suplementados con antibióticos. De entre ellos, los más usados son la penicilina y la estreptomina para suprimir los crecimientos bacterianos y la gentamicina para prevenir el desarrollo de mycoplasmas en el medio de cultivo (310).

2.3.3.2. Línea celular MCF-7.

La línea celular MCF-7 fue iniciada por Soule y col. en 1.973 (263) a partir de un derrame pleural maligno de una mujer postmenopáusicas con infiltración metastásica de carcinoma ductal infiltrante de mama.

Su gran difusión como modelo experimental de cáncer de mama puede ser atribuido a que se trata de la primera línea celular documentada que posee receptor estrogénico positivo (35) y responde a cambios metabólicos y estructurales mediados por la acción de los estrógenos (28,168,297).

La línea celular MCF-7 posee, además, receptores específicos para otros agentes hormonales tales como: andrógenos, progestágenos, glucocorticoides, vitamina D₃, hormonas tiroideas, prolactina, insulina y calci-

tonina, así como factores estimuladores del crecimiento celular (74,129).

El patrón de crecimiento de las células MCF-7 en cultivo en monocapa se ajusta a una curva sigmoideal típica con tres fases claramente definidas: fase "lag" o de retraso, fase de crecimiento exponencial y fase de "plateau" o meseta. Efectivamente, es fácil comprobar que, tras la siembra del cultivo (Figura 2.2), cuando los elementos celulares son escasos y la densidad de siembra (número de células/superficie) es baja, el índice de replicación celular aparece bajo también, hecho que se traduce en tiempos de duplicación tremendamente largos (\approx 24 días) (301). 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 (272).

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 proporción de elementos celulares en el ciclo divisorio respecto al número total de componentes de la población, influye junto con otros factores de tipo metabólico y de autorregulación en la velocidad de multiplicación del cultivo.

CRECIMIENTO DE LA LINEA CELULAR MCF-7

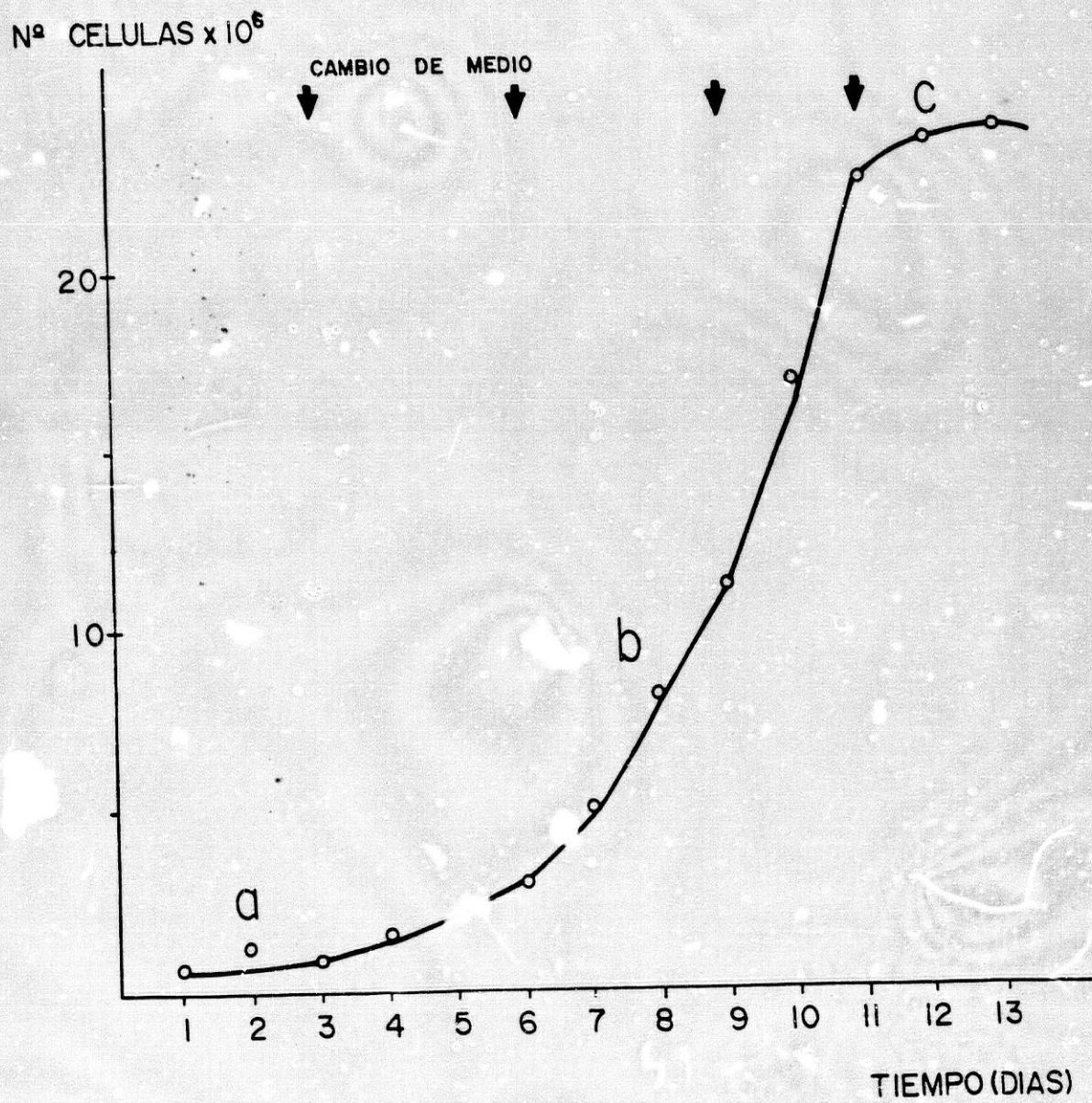


FIG.- 2.2

Por otra parte, si bien la baja densidad inicial es un factor negativo, se sabe que para las células MCF-7, aún en esas condiciones, existe un fenómeno de secreción activa de determinados péptidos que actúan estimulando el crecimiento general de la población. Su relación con la hormonorreceptividad está aún por esclarecer (298).

Tras la fase "lag" y pasado 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, por otro lado, sirve para realizar el cálculo del tiempo de duplicación (TD) de esta línea celular. Así, el TD encontrado en nuestro laboratorio para la línea celular MCF-7 es de $40,0 \pm 5,7$ horas (301), tiempo que está en concordancia con el apuntado por otros autores (12,74,306). Sobre este parámetro se admite una relativa variabilidad determinada por las condiciones del cultivo.

Aunque se realicen cambios regulares del 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 hace que el medio ambiente se llene de detritus y sustancias potencialmente tóxicas para el resto de las células. Todo ello conlleva una modificación en el ritmo de crecimiento por disminución del número de elementos celulares en la fase activa del ciclo y por tanto un aplanamiento de la curva de crecimiento (fase de meseta).

2.3.3.3. Línea Celular EVSA-T.

La segunda línea celular utilizada en este trabajo denominada EVSA-T, 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 (168). Sus características e índices de respuesta a diferentes sustancias capaces de modificar su crecimiento han sido estudiadas exhaustivamente (74,129). La diferencia primordial con la línea celular MCF-7 radica en la ausencia, en esta segunda línea, de receptores estrogénicos y de progesterona, y

por tanto la no respuesta a la acción de las hormonas estrogénicas ni a las progestágenas (129).

El patrón de crecimiento de las células EVSA-T, al igual que las MCF-7, en cultivo en monocapa se adapta a una curva sigmoideal típica (Figura 2.3) con una clara definición de las fases: lag, exponencial y de meseta. Para la línea celular EVSA-T es muy variable la duración de la fase lag. Sobre la zona correspondiente a la fase de crecimiento exponencial es posible deducir el parámetro del tiempo de duplicación, que, en nuestro laboratorio ha resultado ser algo inferior que el encontrado para la MCF-7, ofreciendo un valor medio de 30 ± 3.0 horas, dato que resulta concorde con los obtenidos, en otros centros (69). Por último, la cinética del crecimiento define una fase de plateau, de horizontalización de la curva sigmoideal ocasionada por el estado preconfluyente de las células y el acúmulo de detritus.

CRECIMIENTO DE LA LINEA CELULAR EVSA-T

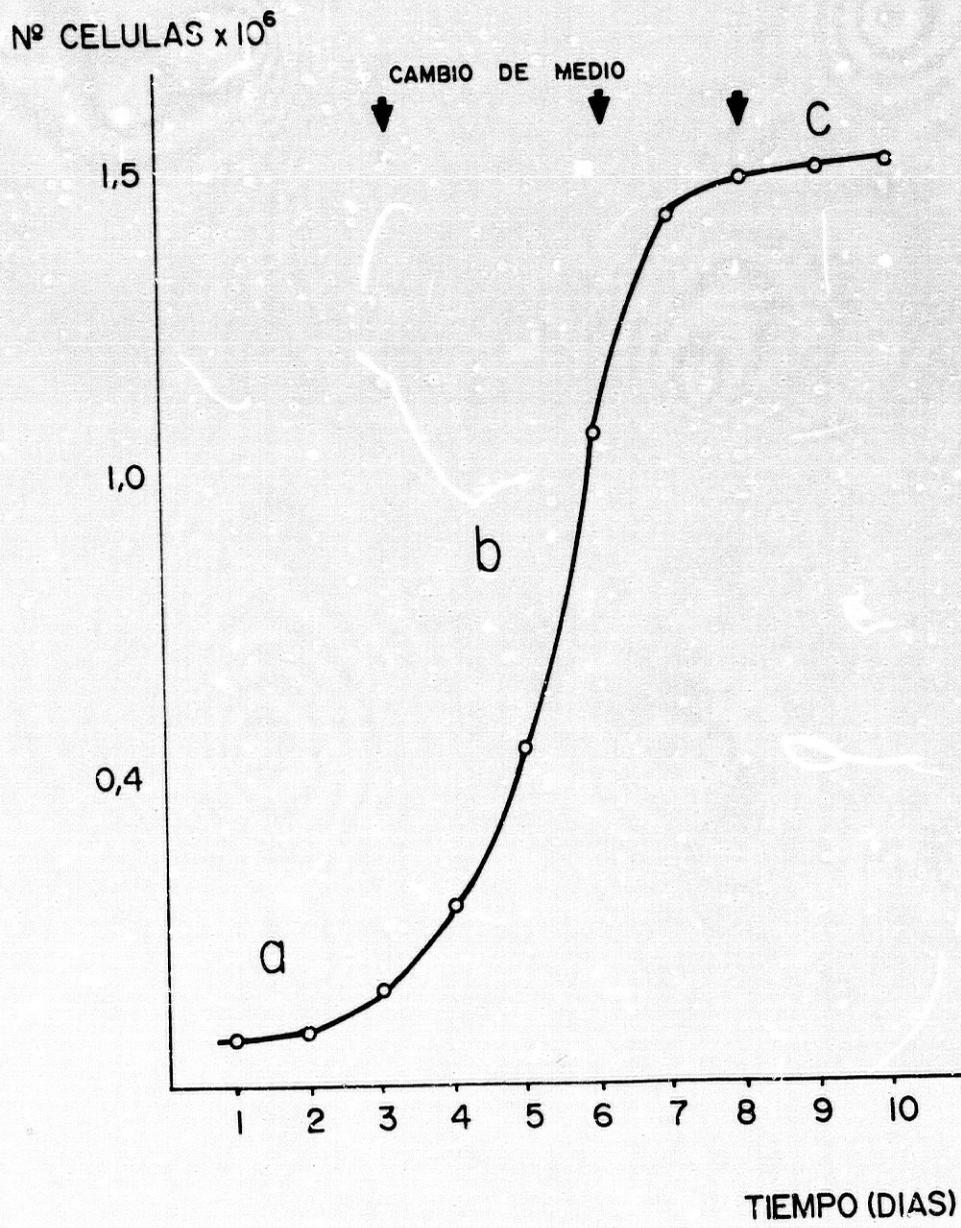


FIG.- 2.3.

2.3.4. Otro material.

2.3.4.1. Frascos y discos de cultivo.

Hemos utilizado, para el almacenamiento de las células en cultivo, frascos Costar 3050 y 3075 de 25 y 75 cm² 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 Cobalto-60.

Así mismo, se han utilizado placas tipo Petri, de 35 x 10 mm, con un área de crecimiento de 9 cm² tratadas de igual forma que los frascos de cultivo, marca Costar 3035, para la determinación de receptores a estrógenos y progesterona en las líneas celulares MCF-7 y EVSA-T.

2.3.4.2. Pipetas.

Hemos empleado pipetas estériles, taponadas con algodón hidrófobo, de volumen contrastado y capacidad variable de 2, 5, y 10 cc. Son de tipo Costar empaquetadas individualmente y estériles: 4105 (10 ml); 4051

(5 ml) y 4021 (2 ml). Hemos utilizado también pipetas tipo Pasteur, de vidrio, Lab. Clínicos PPV/9 y PPV/6.

2.3.4.3. Filtros.

Para esterilización de pequeños volúmenes se han utilizado filtros de un solo uso tipo Millipore HAWr 02500 con membrana porosa de 0,22 μ .

2.3.4.4. Otro material fungible.

Cuando las experiencias lo han requerido hemos utilizado:

- Tubos de polipropileno con tapón de rosca, y fondo cónico, de 13 ml de volumen, estériles.
- Micropipetas Lab Clínicos de 50 y 100 μ l.
- Viales para contadores de centelleo.
- Erlenmeyer, probetas, matraces, vasos de precipitado, embudos, etc.

2.4. METODOS.

2.4.1. Estimación de la probabilidad de supervivencia en pacientes afectas de cáncer de mama.

Para obtener una aproximación a la probabilidad de supervivencia global y de intervalo libre de enfermedad en cáncer de mama, hemos utilizado los datos extraídos del estudio de las 109 enfermas que constituyen nuestra serie. El tratamiento de datos, siguiendo las observaciones de Kaplan y de Remington (145,226), incluye la obtención de una tabla de prosecución en la que las pacientes son seguidas durante periodos de tiempo variables, puesto que ingresan en la serie en distintos instantes del tiempo de duración del ensayo clínico y la longitud de su vida (o su intervalo libre de enfermedad) es también diferente. Para construir la tabla de prosecución de vida se necesita:

- 1) Un punto de referencia exacto que, en este estudio, lo constituye la fecha en la que se efectúa el tratamiento inicial.

- 2) La duración del tiempo de seguimiento de cada enferma.

Cada una de las columnas de la tabla tienen los siguientes significados:

- a) INTERVALO: Tiempo en meses a partir del punto de referencia.
- b) J: Número de orden del intervalo.
- c) n_j : Número de enfermas observadas (vivas o libres de enfermedad) por lo menos X meses después del punto de referencia. ("X" debe estar incluido en el intervalo correspondiente).
- d) n'_j : Número de enfermas que superan el periodo de observación que corresponde a cada intervalo.
- e) δ : Número de pacientes que mueren (o recidivan) en cada intervalo.

$$\delta = n_j - n'_j$$

- f) P_i : Proporción de mujeres que sobreviven (o están libres de enfermedad) al cabo de cierto tiempo de observación. Para sobrevivir X meses, la paciente ha de superar todos los intervalos anteriores a aquel que contiene a "X". Para calcular P_i han de multiplicarse los datos de probabilidad individual que corresponden a cada intervalo anterior al considerado como límite. Este último también se incluye en

el producto. P_i es pues, una probabilidad compuesta.

- g) **ERROR TIPICO:** El error típico de cada probabilidad P_i se calcula de acuerdo con la expresión de Greenwood (107):

$$E = P_i \left[\sum (\delta_i/n_j)(1/(n_j-\delta_i)) \right]^{1/2}$$

En donde la sumatoria se extiende desde $X = 0$ hasta $X = n$ siendo n el límite superior del intervalo que se considera.

2.4.2. Ensayo de receptores de estrógenos y progesterona en cáncer de mama.

En la realización del ensayo de receptores en cáncer de mama se distinguen los procedimientos que a continuación se especifican.

2.4.2.1. Obtención del citosol.

Los especímenes tumorales mamarios, congelados en nitrógeno líquido y almacenados a -70°C hasta el momento del ensayo, se pulverizan a baja temperatura mediante un sistema de percusión construido en acero

inoxidable. Sobre el polvo obtenido se adiciona un volumen de tampón Tris-ClH tres o cuatro veces superior al peso de la muestra. La suspensión resultante se homogeneiza en Potter Vidrio-teflón, 10 pulsos de 5 segundos cada uno, a 300 r.p.m., en baño de hielo fundente.

Para separar las membranas, las organelas y los núcleos de la fracción soluble citosólica, la muestra se somete a ultracentrifugación (100.000 g, a 4°C y durante 1 hora). El sobrenadante obtenido tras este proceso constituye el citosol.

2.4.2.2. Cuantificación de proteínas.

Para el análisis de la concentración de proteínas en el citosol hemos empleado el procedimiento de Bradford (29) que está basado en el cambio de color de un colorante (Azul Coomassie Brillante) en respuesta a diferentes concentraciones de proteína. En presencia de proteínas el colorante, en solución ácida, desplaza su máximo de absorbancia desde 465 nm a 595 nm, debido al enlace que se establece entre éste y las moléculas protéicas.

Los reactivos necesarios para la realización del ensayo han sido suministrados por Bio-Rad y son los siguientes:

a) Disolución concentrada de colorante. Contiene cantidad suficiente para la realización de 450 ensayos y el Azul Comassie Brillante se encuentra disuelto en una mezcla de ácido fosfórico y metanol.

b) Estandar de proteínas: vial conteniendo albúmina bovina liofilizada. El procedimiento analítico incluye la dilución del colorante (1 volumen de colorante en 4 volúmenes de agua destilada); la reconstitución del estandar, de concentración protéica conocida, en 20 ml de agua destilada para obtener una concentración final de 1,4 mg/ml (de ella, y por diluciones sucesivas se obtienen los puntos de la curva de calibración (200-1.400 ng/ml)); y la mezcla de 0,1 ml de cada uno de los estandares y de los problemas, por duplicado en tubos de vidrio, con 5 ml de colorante diluido. Después de agitar suavemente para obtener una mezcla homogénea se deja incubar durante un periodo de tiempo comprendido entre 5 minutos y 1 hora y se lee la densidad óptica (D.O.) de las muestras frente al blanco (concentración protéica = 0) a 595 nm. La representación de la recta patrón (D.O frente a concentración de proteínas) y la interpolación en la misma de los datos de D.O. obtenidos para los problemas permite deducir la concentración de proteínas en estos últimos.

2.4.2.3. Análisis de saturación.

A partir de soluciones madre de 17- β -estradiol y 17- α -metil-promeGESTONA, de actividades específicas aproximadas en torno a 100 Ci/mMol se construyen, por dilución en tampón Tris-ClH, sendas curvas patrón de concentración conocida, con 6 (curva de estradiol) y 5 puntos (curva de progesterona) respectivamente.

Las concentraciones utilizadas en el ensayo se muestran en las Tablas II-7 y II-8.

La medida de la radiactividad existente en una parte alícuota de cada una de las diluciones de la curva permite conocer el dato de la actividad total existente en cada uno de los puntos del ensayo.

La cantidad de radiactividad enlazada al receptor se evalúa tras incubar una fracción constante de citosol (0,1 ml) con 0,1 ml de cada uno de los puntos de concentración conocida. Para conocer la cantidad enlazada específicamente al receptor, el ensayo incluye una serie paralela en la que la reacción hormona-receptor se lleva a cabo en presencia de competidor (dietilestilbestrol, 17- β -estradiol, progesterona o 17- α -metil-promeGESTONA), todos ellos no radiactivos, en concentración al menos 400 veces superior a la que alcanza la hormona radiactiva.

TABLA II-7

CANCER DE MAMA
RECEPTORES DE ESTROGENOS.
ANALISIS DE SATURACION.

Concentraciones finales de hormona radiactiva
y de competidor frío en exceso.

³ H-17-β-estradiol	Diethylstilbestrol o 17-β-estradiol
5,5 × 10 ⁻⁹ M/l	2,2 × 10 ⁻⁶ M/l
3,3 × 10 ⁻⁹ M/l	1,3 × 10 ⁻⁶ M/l
2,2 × 10 ⁻⁹ M/l	8,8 × 10 ⁻⁷ M/l
1,1 × 10 ⁻⁹ M/l	4,4 × 10 ⁻⁷ M/l
5,5 × 10 ⁻¹⁰ M/l	2,2 × 10 ⁻⁷ M/l
2,7 × 10 ⁻¹⁰ M/l	1,1 × 10 ⁻⁷ M/l

TABLA I-8

CANCER DE MAMA
RECEPTORES DE PROGESTERONA,
ANALISIS DE SATURACION.

Concentraciones finales de hormona radiactiva
y de competidor frio en exceso.

17- α -metil- ³ H-progesterona	Progesterona
$5,7 \times 10^{-9}$ M/l	$2,3 \times 10^{-6}$ M/l
$3,4 \times 10^{-9}$ M/l	$1,4 \times 10^{-6}$ M/l
$2,3 \times 10^{-9}$ M/l	$9,2 \times 10^{-7}$ M/l
$1,1 \times 10^{-9}$ M/l	$4,4 \times 10^{-7}$ M/l
$5,7 \times 10^{-10}$ M/l	$2,3 \times 10^{-7}$ M/l

La cuantificación de la cantidad total de hormona enlazada y la medida de la hormona ligada inespecíficamente permiten deducir por sustracción la magnitud del enlace específico.

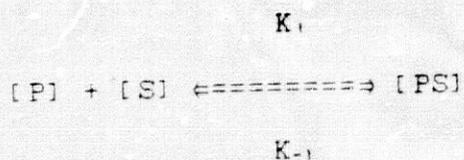
La reacción se realiza a temperatura controlada (generalmente 4°C) durante un tiempo también prefijado (≈ 10 horas). La separación entre las fracciones libre y ligada al receptor se consigue por adsorción de la hormona no enlazada utilizando carbón activo recubierto con dextrano (300 μ l DCC por tubo). Por último, 300 μ l del sobrenadante obtenido por centrifugación se mezcla con 4 ml de mezcla centelleadora y el vial se somete a conteo en el espectrómetro de centelleo líquido. Todos los ensayos se realizaron al menos por duplicado. Los resultados del ensayo se expresan en fentomoles de proteína receptora por miligramo de proteína citosólica.

2.4.2.4. Transformación matemática de Scatchard.

A nivel celular, los mecanismos de control genético, hormonal o alostérico de los enzimas reguladores tienen en común una propiedad básica: la interacción entre un ligando y su receptor específico que desencadena un cierto acontecimiento bioquímico.

Gran número de nociones básicas en investigación biomédica han surgido, precisamente, del estudio del proceso de enlace entre ligandos (usualmente moléculas pequeñas) y macromoléculas de interés biológico. Esta generalmente aceptado que los cambios conformacionales inducidos por las interacciones ligando-receptor son transmitidos específicamente a la macromolécula o a la subunidad molecular responsable de la función bioquímica. Muchas macromoléculas (proteínas, por ejemplo) son oligómeras y están constituidas por dos o más cadenas polipeptídicas separadas (protómeros). El modo característico mediante el cual las cadenas individuales polipeptídicas encajan unas con otras en la conformación nativa de una proteína constituye su estructura cuaternaria. El término protómero se refiere a la cadena polipeptídica individual; el término subunidad se emplea frecuentemente para definir una porción funcional de la proteína.

En el equilibrio el proceso de enlace entre el ligando [S] y la proteína receptora [P] puede ser representado del modo siguiente:



(1)

La velocidad de formación del complejo [PS] viene dada, en este proceso, por:

$$V_1 = K_1 [P] [S] \quad (2)$$

donde K_1 es la constante de velocidad de formación de complejo.

Por otra parte la velocidad de disociación puede expresarse como:

$$V_2 = K_{-1} [PS] \quad (3)$$

donde K_{-1} es la constante de velocidad de disociación del complejo [PS].

En el equilibrio $V_1 = V_2$, de donde:

$$K_1 [P] [S] = K_{-1} [PS]$$

$$K = K_1 / K_{-1} = [PS] / [P] [S] \quad (4)$$

siendo K la constante de equilibrio del proceso.

Si llamamos γ a la fracción de proteína saturada por el ligando S respecto al número total de sitios de enlace para S , $1-\gamma$ será la fracción de lugares no

ocupados. De acuerdo con la definición anterior, γ será:

$$\gamma = \frac{[PS]}{([PS] + [P])} \quad (5)$$

y combinando esta expresión con la ecuación del equilibrio (4), resulta:

$$\gamma ([PS] + [P]) = [PS]$$

$$[PS] = \gamma [P] / (1 - \gamma)$$

$$K [P] [S] = \gamma [P] / (1 - \gamma) \quad (6)$$

simplificando y despejando γ , obtenemos:

$$\gamma = K [S] / (1 + K [S]) \quad (7)$$

Esta última ecuación corresponde a la expresión matemática de una hipérbola rectangular, siendo por tanto la representación gráfica de la fracción saturada de proteína frente a la concentración de ligando una hipérbola (Figura 2.4). La ecuación (7) es análoga a la de Michaelis-Menten y define las relaciones cuantitativas que existen entre la fracción saturada de la macromolécula y la concentración del ligando.

REPRESENTACION GRAFICA DE LA ECUACION HIPERBOLICA

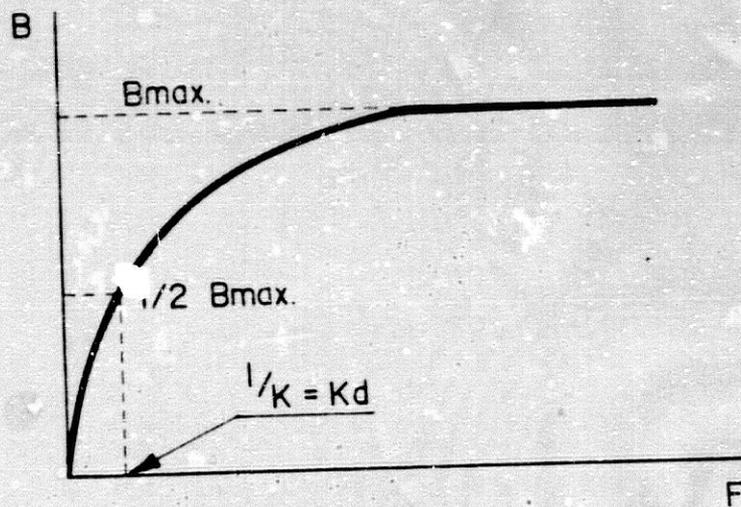


FIG.- 2.4.

Es posible, a partir de ella, deducir una relación numérica importante cuando la fracción de saturación corresponde exactamente al 50% de la capacidad de enlace total de la macromolécula. Para esta situación especial se tiene:

$$1/2 = K [S] / (1 + K [S]) ; 1 + K [S] = 2K [S]$$

$$K [S] = 1 ; K = 1 / [S] \quad (\text{para } Y = \frac{1}{2} Y_{\dots})$$

(8)

y por tanto podemos llegar a la conclusión de que la constante de equilibrio del complejo proteína-ligando es igual a la inversa de aquella concentración de ligando para la cual la fracción de saturación de la proteína es la mitad de su valor máximo.

Resulta más fácil para la comprensión de los cambios algebraicos que siguen, cambiar la notación de las ecuaciones anteriores en base a la utilización de los conceptos de ligando enlazado (B) y ligando libre (F), o sea:

$$B = [PS] ; B_{\dots} = [P] + [S] ; F = [S]$$

Son varias las transformaciones algebraicas de la ecuación hiperbólica, tipo Michaelis-Menten, que permi-

ten extraer con mayor facilidad la información procedente de los datos experimentales:

1) **Ecuación de Lineweaver-Burk** (164), también llamada representación de doble recíproca (Figura 2.5), ya que enfrenta en ordenadas los valores recíprocos de la cantidad enlazada ($1/B$) y en abscisas el recíproco de ligando libre ($1/F$). La intersección de la línea recta resultante con el eje de ordenadas es el valor inverso de la cantidad máxima de ligando enlazada ($1/B_{max}$), mientras que la intersección con el eje de abscisas ofrece el valor absoluto de la constante de asociación del complejo.

2) **Ecuación de Hill** (68): La representación gráfica del $\log [B/B_{max} / (1-B/B_{max})]$, en ordenadas, frente al logaritmo de la concentración de ligando ($\log F$), en abscisas, es una línea recta que corresponde a la ecuación de Hill

3) **Representación de Scatchard** (244) (Figura 2.6). Se ha aplicado en todos los ensayos clínicos que integran el presente trabajo. Puede ser deducida a partir de la ecuación:

$$y / (1-y) = K S$$

(9)

TRANSFORMACION DE LINEWEAVER-BURK O DOBLE RECIPROCA

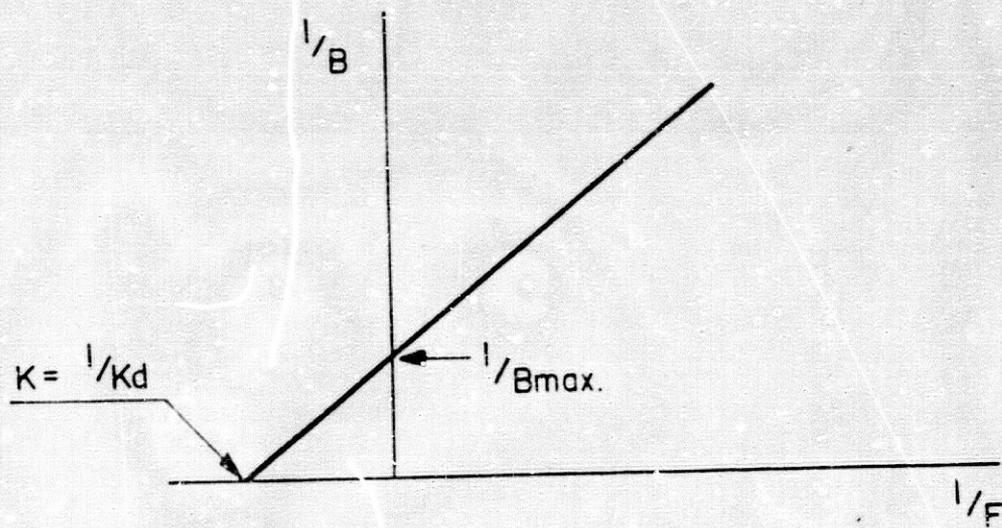


FIG.- 2.5.

TRANSFORMACION DE SCATCHARD

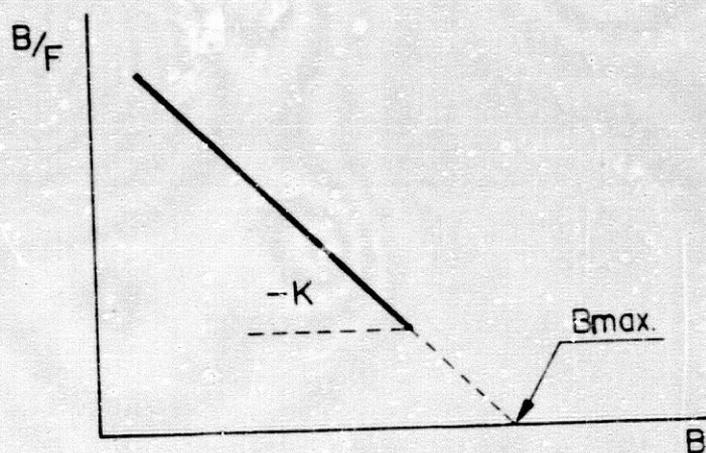


FIG.- 2.6.

operando:

$$\gamma / S = K (1-\gamma) \quad (10)$$

La representación gráfica de la fracción de sitios de enlace ocupados (γ) dividida por la concentración de ligando libre ($[S]$), frente al valor de la fracción (γ), da una línea recta cuya pendiente es igual a $-K$, mientras que la ordenada en el origen es el valor de la constante de equilibrio (Figura 2.6).

Utilizando la notación de ligando libre (F) y ligando enlazado (B) podemos escribir:

$$\gamma = B / B_{\text{max}}$$

$$B / B_{\text{max}} = KF (1 - B/B_{\text{max}})$$

$$B / F = KB_{\text{max}} - B K$$

La representación de B / F frente a B se denomina representación de Scatchard y constituye uno de los métodos gráficos más comúnmente utilizada en el análisis de los datos experimentales de enlace macromolécula-ligando.

2.4.3. Cuantificación de DNA.

Un procedimiento indirecto para cuantificar el número de células presentes en el cultivo, consiste en determinar, por métodos bioquímicos (técnica de Burton

(40)) la cantidad de ácido desoxirribonucleico (DNA) extraído de las células. Para ello, el tapiz celular se despegó mediante tratamiento con una solución de tripsina-EDTA y un volumen de la suspensión resultante se trata con igual cantidad de ácido perclórico 1 N para lizar las células.

El DNA celular es insoluble a baja temperatura (4°C) en ácido perclórico 0,5 N. Así, tras una hora a 4°C, se somete la muestra a centrifugación (10 minutos, 3.000 r.p.m.) y se recoge el precipitado, del cual se extrae el DNA solubilizándolo en ácido perclórico 0,5 N por medio de calentamiento a 70°C durante 20 minutos en agitación. Aliquotas de esta disolución se incuban, finalmente, con el reactivo de Burton durante 20 horas a 30°C.

La reacción entre el DNA hidrolizado y la difenilamina en medio ácido produce una coloración azul característica cuantificable en un espectrofómetro a $\lambda = 600$ nm. La densidad óptica se compara con una curva patrón construida utilizando soluciones de concentración conocida en DNA de origen bovino, (tipo de vaca, Sigma) que son sometidas al mismo tratamiento que las muestras.