TITULO DE LA TESIS:

"RECEPTORES DE ESTROGENO Y PROGESTERONA EN CANCER DE MAMA"

AUTOR: ANA LLUCH HERNANDEZ

DIRECTOR: Prof. Dr. D. Javier Garcia-Conde Bru

TRIBUNAL: Prof.Dr.D. Carlos Carbonell Antoli
Prof.Dr.D. Avelino Senrra
Prof.Dr.D. Jaime Merino
Prof.Dr.D. Miguel Tortajada
Prof.Dr.D. Vicente Alberola

FECHA DE LA LECTURA: 30 Julio de 1.985

CALIFICACION OBTENIDA:

"APTO -CUM LAUDEM"

"PREMIO EXTRAORDINARIO" Curso 1.984-1985.

FACULTAD DE MEDICINA DE VALENCIA

HOSPITAL CLINICO UNIVERSITARIO

SERVICIO DE HEMATOLOGIA Y ONCOLOGIA MEDICA

PROFESOR: J. GARCIA-CONDE BRU

RECEPTORES DE ESTROGENO Y PROGESTERONA EN CANCER DE MAMA

T E S I S

PRESENTADA POR ANA LLUCH HERNANDEZ

PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN MEDICINA

A Ñ O 1.985

UMI Number: U602915

All rights reserved

INFORMATION TO ALL USERS
The quality of this reproduction is dependent upon the quality of the copy submitted.

In the unlikely event that the author did not send a complete manuscript
and there are missing pages, these will be noted. Also, if material had to be removed,
a note will indicate the deletion.

UMI U602915
Published by ProQuest LLC 2014. Copyright in the Dissertation held by the Author.
Microform Edition © ProQuest LLC.
All rights reserved. This work is protected against
unauthorized copying under Title 17, United States Code.

ProQuest LLC
789 East Eisenhower Parkway
P.O. Box 1346
Ann Arbor, MI 48106-1346

D. JAVIER GARCIA-CONDE BRU, CATEDRATICO DE PATOLOGIA GENERAL Y PROPEDEUTICA CLINICA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD - DE VALENCIA,

C E R T I F I C A: Que, la presente Tesis Doctoral titulada: "Receptores de estrógeno y progesterona en cáncer de mama", ha sido realizada por el doctorando en el Servicio de Hematología y Oncología Médica, bajo mi dirección.

El Catedrático que suscribe tiene el honor de proponer al Claustro de la Facultad la aceptación de la Tesis referida.

Y para que conste se expide el presente certificado en VALENCIA A UNO DE JULIO DE MIL NOVECIENTOS OCHENTA Y CINCO.

A JOAN

A MIS COMPAÑEROS

Este trabajo es el resultado de la colaboración decidida y la ayuda desinteresada de muchas personas, a ellas expreso mi agradecimiento:

- Al Prof. J. García-Conde Brú.
- Al Prof. V. Alberola Candel.
- A mis compañeros del Servicio de Hematología y Oncología Médica.
- Al Prof. V. Belloch Zimmermann y al Prof. J.Moreno Frigols del Servicio de Radioterapia y Mecina Núclear.
- Al Prof. R. Santandreu y a sus colaboradores del Departamento de Microbiología de la Facultad de Farmacia.
- Al Dr. A. Iradi del Departamento de Bioquímica y Fisiología.
- Al Dr. V. Rubio del Instituto de Investigaciones Citológicas.
- Al Dr. M. Sendra y a la Dra. M. Rábena, profesores del Departamento de Bioestadística.
- A la Dra. M.L. Marcos del Servicio de Medicina Nuclear del Hospital Puerta de Hierro de Madrid.
- Al Dr. A. Martínez Agulló del Servicio de Cirugía Visceral.
- Al Dr. Aviñó del Servicio de Ginecología y Obstetricia.
- A la Dra. S. Serrano del Servicio de Endocrinología.
- A los Dres. García-Vilanova y Dr. E. Fuster del Hospital General de Valencia.

I N D I C E

Pag.

INTRODUCCION 1

1.- Bases históricas de los receptores hormonales esteroideos..... 1

2.- Bases físico-químicas del mecanismo de acción hormona-receptor..... 6

2.1.- Regulación de niveles esteroideos en la sangre 8

2.2.- Unión o difusión a través de la - membrana celular..... 14

2.3.- Unión a los receptores citoplásmicos 15

2.4.- Sitios aceptores 20

2.5.- Fenómenos transcripcionales inducidos 23

2.6.- Procesamiento del receptor..... 25

2.7.- Inactivación del receptor 26

3.- Relaciones hormona-receptor 26

4.- Receptores de progesterona..... 27

5.- Métodos de determinación de receptores esteroideos..... 28

5.1.- Método de Carbón-Dextrano 31

5.2.- Método de ultracentrifugación en - gradiente de sucrosa..... 32

Pag.

5.3.- Métodos alternativos 33

5.4.- Métodos histoquímicos 33

5.4.1.- Anticuerpo antihormona..... 34

5.4.2.- Conjugados de esteroideos con sustancias fluorescinadas.... 35

5.5.- Anticuerpos antirreceptor..... 36

6.- Control de calidad de los ensayos de receptores 37

7.- Utilidad clínica de la determinación de RE y RPg en el cáncer de mama 38

8.- Receptores hormonales: Relación con distintos parámetros 40

8.1. Distribución de RE y RPg 40

8.2. Menopausia y Edad..... 41

8.3. Sitio de metástasis 43

8.4. Tamaño del tumor y localización 43

8.5. Número de ganglios infiltrados..... 44

8.6. Grado histológico..... 44

8.7. Celularidad tumoral 45

8.8. Tipo histológico 45

8.9. Elastosis 46

8.10. Infiltración linfocitaria 46

8.11. Cinética celular 46

8.12. Respuesta a tratamiento citostático.. 47

9.- Variación del contenido en receptores en un mismo tumor..... 47

Pag:

10.- Receptores hormonales e índice de respuesta a la terapia hormonal..... 48

11.- Tratamientos hormonales. 51

11.1. Antiestrógenos 52

11.2. Progestágenos 55

11.3. Aminoglutetimida..... 56

11.4. Combinaciones hormonales..... 59

11.5. Quimioterapia+ hormonoterapia..... 61

11.6. Nuevas formas de administración de quimioterapia más hormonoterapia..... 64

11.7. Terapeútica adyuvante con hormonoterapia 66

11.8. Terapeútica adyuvante con hormonoterapia+ quimioterapia..... 68

12.- Receptores hormonales como factor pronóstico..... 70

PLANTEAMIENTO DE TRABAJO..... 72

MATERIAL Y METODOS..... 79

1.- Muestras tumorales..... 79

2.- Reactivos y material de laboratorio..... 85

3.- Soluciones y tampones..... 87

4.- Aparatos..... 88

5.- Métodos..... 90

5.1. Preparación tejido tumoral..... 92

5.2. Procedimiento para la obtención del citosol.. 93

5.3. Dosificación de proteína por el método de -- Lowry..... 99

Pag.

5.4. Determinación de actividad receptora..... 99

5.5. Cálcu-lo sitios de unión metodo de Scatchard..... 102

5.6. Método Monopuntual..... 109

5.7. Niveles de positividad y negatividad de RE y RPg..... 112

5.8. Método Estadístico..... 112

RESULTADOS..... 118

1.- Reproductibilidad del método..... 118

1.1. Variabilidad inträ-ensayo..... 119

1.2. Variabilidad inter-ensayo..... 121

1.3. Comparación de los resultados intra e interensayo..... 123

1.4. Variación según conservación del tejido pulverizado..... 123

2.- Ensayo Monopuntual..... 125

3.- Determinación de RE y de RPg en tumores de mama.. 129

3.1. Tumores localmente avanzados..... 132

3.2. Metástasis de carcinoma de mama..... 133

3.3. Tumores de mama estadios I,II y III... 134

4.- Concordancia entre niveles de RE y porcentaje de -- RPg positivos..... 138

5.- Distribución de RE y RPg según las características de las pacientes..... 143

Pag.

5.1. RE y RPg en relación con la menopausia... 145

5.1.1. Concordancia RE y RPg..... 145

5.1.2. Valores medios de RE y RPg..... 148

5.2. RE y RPg. en relación con la edad de las pacientes..... 148

5.2.1. Incidencia de RE y RPg. positivos.. 148

5.2.2. Valores medios de RE y RPg..... 151

5.3. RE y RPg. en relación con la fase del ciclo menstrual..... 156

6.- Relación de RE y RPg y ciertos factores pronósticos en cáncer de mama..... 158

6.1. RE y RPg. en relación con el tamaño tumoral..... 158

6.2. RE y RPg. en relación con el número de ganglios infiltrados..... 158

7.- Variación en cuánto a contenido de RE en diferentes partes de un mismo tumor..... 160

8.- RE y RPg. en relación a la progresión de enfermedad.. 165

DISCUSION..... 169

CONCLUSIONES..... 212

BIBLIOGRAFIA..... 216

PIES DE FIGURAS Y TABLAS.

Fig.- 1.- Mecanismo de acción de las hormonas esteroideas.

Fig.- 2.- Curvas de saturación.

Fig.- 3.- Gráfica de Scatchard.

Fig.- 4.- Comparación método Scatchard versus Monopuntual para R.E.

Fig.- 5.- Comparación método Scatchard versus Monopuntual para R.Pg.

Fig.- 6.- Porcentaje de RPg+, según níveles de RE.

Fig.- 7.- Distribución de RE+ y RPg+ según estado menopaúsico.

Fig.- 8.- Valores medios de RE y RPg según menopausia.

Fig.- 9.- Porcentaje de RE+ y RPg+ según edad de las pacientes.

Fig.-10.- Valores medios de RE y RPg según edad de las pacientes:

Fig.-11.- Porcentaje de tumores RE+y RPg+ en diferentes periodos del ciclo menstrual.

Tabla 1.- Variabilidad intraensayo en el contenido de RE y RPg.

Tabla 2.- Variabilidad intraensayo "versus" interensayo en el - contenido de RE y RPg.

Tabla 3.- Variación en el contenido de RE y RPg según la conser vación del tejido pulverizado.

Tabla 4.- Distribución de frecuencias de RE y RPg en metástasis.

Tabla 5.- Distribución de frecuencias de RE y RPg en tumores de mama localizados.

Tabla 6.- Distribución de níveles de RE y RPg.

Tabla 7.- Distribución de RE+ y RPg+ segun menopausia.

Tabla 8.- Distribución de frecuencias de RE y RPg según menopaúsia.

Tabla 9.I. II.- Distribución de RE y RPg según edad.

Tabla 10.- Distribución de RE y RPg según tamaño tumoral.

Tabla 11.- Distribución de RE y RPg según número de ganglios.

Tabla 12.- Variación de los valores de RE en cáncer de mama. Ensayos simultáneos.

Tabla 13.- Variaciones cuantitativas en el contenido de RE en las muestras con valores discordantes.

Tabla 14.- Distribución de RE y RPg según las recaidas.

Tabla 15.- Distribución de recaidas según el estado de RE y RPg.

I N T R O D U C C I O N

INTRODUCCION.

El cáncer de mama es, sin duda alguna, el que con mayor frecuencia padece la mujer en los países occidentales. La incidencia de esta neoplasia va aumentando en lugar de disminuir. Aproximadamente, una de cada trece mujeres contraerá esta enfermedad, que adoptará la forma diseminada metastásica en 60-70% de las pacientes, lo que indica la gravedad del proceso.

Para abordar esta fase avanzada de la enfermedad se dispone básicamente de dos tipos de terapeútica: la quimioterapia, mediante productos citotóxicos y la terapeútica hormonal.

1.- BASES HISTORICAS DE LOS RECEPTORES HORMONALES ESTEROIDEOS.

La manipulación empírica del sistema endocrino precede en más de 100 años a una comprensión racional de los mecanismos de acción hormonal.

Ya en 1835 COOPER (1) encuentra variaciones cíclicas en el tamaño del cáncer de mama coincidiendo con las fases del ciclo menstrual.

La introducción de pautas endocrinas en el tratamiento del cáncer de mama se remonta a finales del siglo pasado a raíz de la observación de BEATSON (2) quien comprobó que en -- algunas ocasiones tras la ovariectomía se producía una clara regresión del tumor. Aunque esta experiencia tuvo lugar antes de la individualización química de las hormonas sexuales el investigador ya sospechó que dicho procedimiento quirúrgico alteraba - el medio hormonal en el cuál se desarrollaba el tumor.

En 1957 ELLIS (3) comprueba que la administración - de estrógenos a pacientes jóvenes podía provocar un aumento del tamaño tumoral y que, por el contrario, esta administración se seguía de una disminución del crecimiento en las pacientes postmenopaúsicas.

El aislamiento de las hormonas estrogénicas cristalinas de los ovarios de cerdas supuso un avance significativo. En la era moderna de la terapia endocrina se extiende el concepto - de que las hormonas pueden influir en el crecimiento del cáncer. HUGGINS (4) muestra que la orquidectomía o la administración de estrógenos causa la regresión del cáncer prostático del perro. Este mismo autor, posteriormente comprueba que la adrenalectomía - es efectiva después de la recaída tras la ooforectomía en pacientes con cáncer de mama metastásico (5). En 1967 este mismo autor (6) refiere en una publicación que: "el cáncer no es necesariamente autónomo, ni es obligada su perpetuación de manera intrínseca. Su crecimiento puede ser sostenido y propagado por la fun- --

ción hormonal en el huésped".

LUFT Y OLIVERCRONA (7) fueron los primeros que observaron que la hipofisectomía inducía remisiones similares a las obtenidas por la ooforectomía y adrenalectomía en metástasis por carcinoma de mama. Estos resultados fueron confirmados por otros autores posteriormente (8).

A la luz de estos conocimientos se clasificaron los cánceres de mama en hormonodependientes y hormonoindependientes, pero no se disponía de una determinación o prueba de laboratorio para predecir cuál sería la sensibilidad de los mismos al tratamiento -- hormonal.

El tratamiento endocrino farmacológico o ablativo era efectivo sólo en un tercio de todas las pacientes con cáncer de mama - avanzado. Si a la imposibilidad de preveer la respuesta se añade el pequeño pero valorable potencial de morbilidad y mortalidad de la ovariectomía o hipofisectomía, se comprende que rápidamente se pusieran en marcha una amplia gama de investigaciones encaminadas a identificar cuáles eran las causas que determinan la disparidad de respuestas.

GLASCOCK y HOEKSTRA (9) marcaron hexoestrol con tritio, y usando esta hormona en cabras observaron que era concentrada y retenida por órganos diana tales como el útero y vagina.

FOLCA (10) fué el primero en evidenciar la captación estrogénica por el tejido de cáncer de mama. Demostró que cuando - se inyectaba hexoestrol marcado en pacientes que habían sido some

tidas a adrenalectomía ablativa por cáncer de mama, aquellas pacientes que respondían favorablemente a esta terapeútica mostraban una correlación con una alta captación de estrógenos radioactivos por el tumor.

JENSEN y JACOBSON (11) hicieron una importante contribución cuando utilizando estradiol marcado con tritio, con una alta actividad específica, pudieron demostrar diferentes acúmulos y retención del mismo en el útero y en otros tejidos diana.

MOBBS (12) encontró que los tumores mamarios de rata - endocrino-dependientes, inducidos por dimetilbenzatraceno (DMBA), retenían estradiol marcado al contrario que otros túmores autónomos que no lo retenían.

JENSEN Y DE SOMBRE (13) y TERENIUS (14) independientemente demostraron que la unión específica de estrógenos radioactivos en las muestras de cáncer de mama "in vitro" se producía en aquellos tumores que tenían una respuesta clínica favorable. Estos experimentos indicaban que había dos clases de canceres de mama, aquellos que muestran un acúmulo significativo de estradiol marcado "in vitro" y aquellos que no muestran captación hormonal.

TOLFT y GLORSKI (15) establecen la utilidad del método analítico en la caracterización e identificación de las sustancias - citoplásmicas responsables de la retención estrogénica, los llamados "receptores estrogénicos" (RE) en el citosol de útero de rata. Un - año después JENSEN (13) mediante análisis de gradiente de sucrosa muestra que aquellos tumores de pacientes que responden a una te

rapeútica hormonal contienen RE en el citoplasma, mientras que - aquellos que no responden a la terapeútica no tienen receptores.

Todos estos experimentos permitieron desarrollar un mé-- todo para distinguir tumores hormonodependientes de tumores autónomos sin un ensayo previo de terapia hormonal.

La observación de JENSEN (16) y de GORSKI (17) condujo a la descripción del mecanismo de acción en dos pasos: 1º, la -- hormona induce la transferencia del receptor desde el citoplasma al núcleo, observación que también demostró STUMPF (18) con autorradiografía, y 2º, la unión inicial del esteroide al receptor citosólico dá lugar a una cascada de transformaciones metabólicas cuya naturaleza está aún hoy por aclarar.

TOFT y GORSKI (15), así como ERDOS (19) encuentran que el receptor estrogénico 8S, que habitualmente es detectado mediante extracción de baja fuerza iónica, podría ser disociado en comple-- jos 4S al incrementar la fuerza iónica, con un aumento de concentración salina.

JENSEN (20) encuentra que el receptor citosólico podría ser transformado en una forma 5S, característica del receptor nuclear, por un mecanismo termo-dependiente. ATGER y BAULIEU (21) demuestran que el receptor "transformado" muestra un incremento - de afinidad por polianiones, incluyendo el DNA, en un proceso de activación térmica.

Hasta ese momento se disponía de escasa información sobre los receptores de progesterona a causa de problemas técnicos en los ensayos de receptores.

MILGRON (22) en 1972 fué el primero que demostró la - presencia de receptores de progesterona (RPg) en úteros de cerda. Posteriormente, RAYNAUD y PHILIBERT (23-24) emplearon una pro-- gestina sintética para el estudio de los receptores, la cúal fué - significativamente más estable que el compuesto madre.

HORWITZ y McGUIRE (25) demostraron la presencia de -- RPg en tejido de cáncer de mama y que la síntesis de este recep tor era un marcador de la actividad de los estrógenos.

Estos descubrimientos han sido confirmados y ampliados en posteriores investigaciones.

2.- BASES FISICO-QUIMICAS DEL MECANISMO DE ACCION HORMONA-RECEPTOR.

Numerosas investigaciones realizadas en los últimos años han permitido reunir datos suficientes como para afirmar que los - esteroides ejercen su acción sobre los tejidos efectores, uniéndose previamente a receptores "específicos intracelulares" de naturaleza proteíca (macromoléculas). La unión de los esteroides a estos re-- ceptores tisulares es de naturaleza físico-química, semejante a la establecida entre estos compuestos y las proteínas transportadoras plasmáticas, pero con papel biológico distinto, puesto que la fun- ción de la macromolécula receptora puede ser alterada por la --- unión temporal de la hormona.

El verdadero papel que representan los receptores celula- res para esteroides no está aún definitivamente aclarado pero es -

evidente que desempeñan una importante función en el mecanismo intrínseco de la acción hormonal, además de su actividad como - "transportadores" intracelulares.

La unión inicial del esteroide al receptor citosólico dá lugar a una cascada de eventos metabólicos, no totalmente aclarados hasta el momento actual. La interacción entre el esteroide y el receptor implica un proceso que comprende la unión del esteroide con la macromolécula citoplasmática de 8 unidades Svedberg, la migración de este complejo hasta el núcleo y la formación de un nuevo complejo con una macromolécula intranuclear -- (traslocación) distinta de la anterior, por lo menos en su constante de sedimentación diferencial en la ultracentrifuga (5 S). La transferencia al núcleo del complejo receptor citoplásmico-esteroide es termodependiente y requiere una temperatura de 25º a 37º C.

La unión del esteroide al receptor citoplásmico permite - al primero llegar al núcleo para estimular allí -una vez unido al receptor nuclear- la síntesis de ácido ribonucléico (RNA).

Por tanto la verdadera "hormona" con actividad biológica no es ni el esteroide ni el receptor citoplasmático, sino el complejo "receptor-activado" con el esteroide correspondiente.

Los receptores celulares son altamente específicos y de - limitada capacidad de unión para un esteroide determinado; son - incapaces de ligar a otro que carezca de acción sobre ese tejido efector. Por tanto, los receptores intracelulares son los responsables de la retención preferencial de una hormona en el tejido efec-

tor sensible a dicha hormona. Se admite que la magnitud de la respuesta hormonal es proporcional a la concentración del complejo receptor esteroide siendo máxima cuando todos los sitios de unión de la macromolécula están ocupados por la hormona.

En la figura 1 se describen en esquema los distintos mecanismos por los que una hormona esteroidea ejerce su actividad biológica en la célula diana.

Este modelo fué el primero dado a conocer por Jensen hace una década

2.1.- Regulación de níveles esteroideos en la sangre.-

Se ha observado que la mayoría -si no todas- de las acciones de las diversas clases de hormonas esteroideas resultan de interacciones relativamente similares de la hormona con receptores en la mama u otros tejidos diana.

Aunque estructuralemnete relacionados y semejantes en el mecanismo básico del receptor hormonal, las diferentes clases de hormonas causan efectos y respuestas muy hetereogéneas.

Las ligeras diferencias estructurales entre las diversas clases de hormonas esteroideas son discriminadas a nível molecular por las proteínas receptoras.

Las hormonas esteroideas son mensajeros orgánicos de peso molecular relativamente bajo (aproximadamente 300) que a

MECANISMO DE ACCION DE HORMONAS ESTEROIDEAS

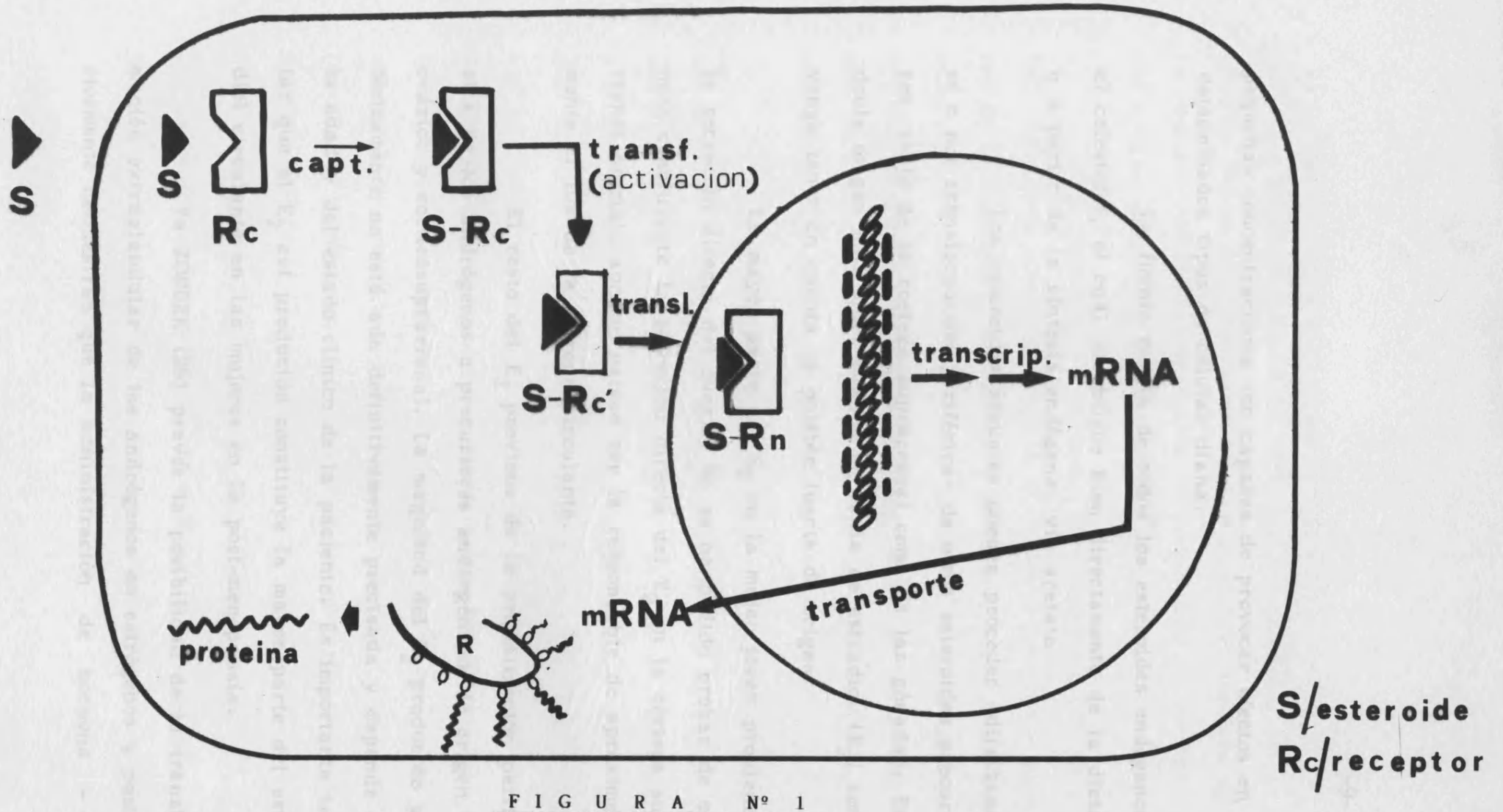


FIGURA Nº 1

pequeñas concentraciones son capaces de provocar efectos en - determinados tipos de células diana.

La fuente remota de todos los esteroides endógenos es el colesterol, el cuál se obtiene bien directamente de la dieta, - o a partir de la síntesis endógena, vía acetato.

Los esteroides sexuales pueden proceder -directamente o por transformación periférica- de otros esteroides precursores, tanto de la corteza suprarrenal como de las gónadas. Este doble origen hace que, cuando se habla de estradiol (E_2) convenga tener en cuenta la posible fuente de origen.

La mayor parte del E_2 en la mujer joven proviene de la secreción directa del ovario. No se ha podido probar de manera concluyente la secreción directa del E_2 en la corteza suprarrenal normal, aunque parece ser la responsable de aproximadamente el 10% de la estrona circulante.

El resto del E_2 proviene de la aromatización periférica de los andrógenos o precursores androgénicos de origen ovárico y corticosuprarrenal. La magnitud del E_2 producido periféricamente no está aún definitivamente precisada y depende de la edad y del estado clínico de la paciente. Es importante señalar que el E_2 así producido constituye la mayor parte del estradiol circulante en las mujeres en la post-menopausia.

Ya ZONDEK (26) prevée la posibilidad de la transformación extraglandular de los andrógenos en estrógenos y posteriormente demuestran que la administración de hormona - - -

masculina aumenta la excreción urinaria de sustancias estrogénicas. Veinte años más tarde WEST y cols. (27) explican este fenómeno por la transformación de testosterona en estrógenos a nivel periférico, gracias al enzima aromatasa.

Con posterioridad numerosos investigadores (28-30), han demostrado que después de la inyección a hombres y mujeres de testosterona, 4-androsteno y dehidroepiandrosterona marcados con radioisotopos, es posible aislar en la orina estrógenos radioactivos, confirmando la aromatización de los andrógenos. En estos trabajos no se identifican los tejidos responsables donde se produce esta conversión.

La producción de estrógenos en la mujer se modifica con la edad, y después del climaterio disminuyen significativamente la tasa de depuración metabólica, la tasa de producción y la concentración de E_1 y E_2 circulantes, así como la excreción urinaria de los mismos (31). JUDD y cols. (32) concluyen que los ovarios de la mujer menopaúsica segregan mayor cantidad de testosterona y menor cantidad de androstendiona que en la premenopausia. GOIDIN y cols. (33) estudiando seis mujeres menopaúsicas, concluyen que el principal estrógeno formado es la estrona, proveniente de la aromatización extraglandular de la androstendiona.

HEMSELL y cols. (34) también demuestran que la magnitud de la conversión periférica de andrógenos en estrógenos, aumenta progresivamente con la edad en hombres y mujeres, llegan-

do a superar en dos a cuatro veces la conversión observada en los adultos jóvenes.

Se desconocen los mecanismos que regulan la conversión extraglandular de andrógenos en estrógenos, aunque se ha señalado un aumento de esta conversión en ciertos estados clínicos como la obesidad (34) y el hipertiroidismo (35).

Aunque no se conoce con exactitud el ó los tejidos donde se produce la transformación periférica de andrógenos en estrógenos, se sabe, al menos, que ésta puede tener lugar en el hígado e hipotalamo fetales humanos; en cultivos de fibroblastos humanos; en el sistema neuroendocrino central, hígado, riñón y tejido óseo de la rata. También se ha demostrado que el tejido adiposo humano "in vitro" convierte andrógenos en estrógenos. Recientemente NIMROD y RYAN (36) confirman que esta transformación tiene lugar tanto en el tejido adiposo abdominal o axilar como en el de la mama normal o tumoral y que a pesar de que la actividad aromatizante de la célula grasa es baja (de 0 a 200 pg/g de tejido en 90 minutos de incubación), el tejido adiposo corporal total puede ser el responsable de la producción de varios microgramos de estrógenos diarios.

Por último, también se ha demostrado que el propio carcinoma mamario humano es capaz de convertir testosterona en estradiol. LI y cols. (37) estudian nueve tumores y prueban que 8 de ellos, que corresponden a mujeres premenopaúsicas y postmenopaúsicas, son capaces de transformar testosterona en estradiol.

Desconocemos la significación de la presencia de la - enzima aromatizante en los tumores mamarios, pero es posible que tenga alguna influencia en el curso de la enfermedad, teniendo en cuenta que los estrógenos producidos localmente ejercen efectos fisiológicos directos dentro de las células en las - que han sido formados.

Los porcentajes de conversión periférica de andróge-- nos en estrógenos son bajos, pero la importancia fisiológica de esta transformación debe ser evaluada teniendo en cuenta que los principales andrógenos circulantes (dehidroepiandrostendiona, androstendiona, y testosterona) se producen en tasas de - miligramos y los estrógenos en cambio lo hacen en microgramos.

Las hormonas esteroideas circulan por la corriente sanguínea unidas predominantemente a proteínas plasmáticas, tales como la albúmina, globulinas específicas de unión a esteroides - y alfa-fetoproteína, cada una de las cuales tiene una afinidad y capacidad características (38).

Estas macromoléculas ligadoras, se presentan frecuentemente en altas concentraciones, y varían en afinidad desde muy débil a muy fuerte (Kd 10^{-3} a Kd 10^{-10} M) (39). Ellas pueden - restringir la cantidad de hormona libre disponible para unirse - al receptor, y como consecuencia, juegan un papel importante en la dinámica hormona-receptor.

Las concentraciones de hormona unida más hormona libre en la sangre varían desde cifras muy altas, de aproximada-

mente 10^{-7} M, para el cortisol a más bajas, aproximadamente - de 3 x 10^{-11} M para el estradiol (38).

Los estrógenos y andrógenos son transportados en su mayor parte por la globulina ligadora de testosterona-estradiol, mientras que el cortisol y progesterona circulan unidos princi-- palmente a la globulina ligadora de corticoides, llamada transcortina.

La competición de cortisol y progesterona por la globulina ligadora de corticoesteroides puede influir la unión fracionada de cada uno de estos esteroides (40).

Parte de las hormonas esteroideas circulan unidas a la albúmina, y aunque la fracción de unión es escasa, debido a la baja afinidad, la gran cantidad de albúmina plasmática y - las escasas variaciones de la misma hacen que ésta desempeñe - un efecto nivelador sobre la fracción esteroidea no unida.

Una de las funciones de las proteínas ligadoras de esteroides es el transporte de la hormona específica en estado de unión, actuando como un reservorio desde el cual la hormona activa puede ser movilizada rápidamente por disociación -- cerca de la célula diana.

Las proteínas ligadoras de esteroides también conservan y protegen a los mismos contra el ataque enzimático, evitan la adsorción a las paredes de los vasos sanguíneos y la protegen contra la excreción renal y metabolización hepática (40).

Los estrógenos y progesterona no requieren una conversión metabólica para realizar su actividad biológica, pero el metabolismo puede estar implicado en la interconversión de las diversas formas de estrógeno y en la eliminación de la hormona de los tejidos diana (41).

2.2.- Unión o difusión a través de la membrana celular.

La mayoría de investigadores están de acuerdo en que la entrada de los esteroides en el interior de las células desde el espacio extracelular se produce por mecanismo de difusión.

GURPIDE y WELCH (41) estudiaron la dinámica de captación y encontraron que los tejidos diana y no diana acumulaban esteroides con igual facilidad, en una cantidad proporcional a la concentración del esteroide, sugiriendo un mecanismo de difusión simple. Sin embargo, la posibilidad de que en la membrana plasmática de las células diana existan sitios específicos de reconocimiento no ha sido excluída.

ZANKER y cols. (42) proponen que las membranas plasmáticas de las células de cáncer de mama contienen receptores de afinidad y capacidad relativamente altas ($Kd = 6,3 \times 10^{-10}$) que aparentemente trabajan en colaboración con los receptores de alta afinidad y baja capacidad descritos en el citosol. Ellos postulan que estos receptores de membrana podrían realizar una función moduladora.

2.3.- Unión a los receptores citoplásmicos.

La hormona, una vez en el citoplasma, sólo actúa en aquellos tejidos diana cuyas células poseen un sistema de re-- ceptores con un alto grado de especificidad estructural para la unión específica, y una elevada afinidad, frecuentemente del or den de 10^{-10}.

Las proteínas receptoras se encuentran en distintas -- concentraciones según los tejidos, y por lo tanto, posibilitan -- una gran variedad de sitios de unión (500 a 20.000) para la -- hormona efectora (43).

Tras su entrada en la célula diana, la hormona puede unirse o bien a su receptor citoplasmico específico, o bien a o- tros sitios de unión de baja afinidad, como son las uniones a - distintas proteínas, y a veces, una determinada hormona puede interactuar con más de un receptor de alta afinidad. BAULIEU (44) demostró que el estradiol interactúa con receptores de an-- drógenos con una Kd de aproximadamente 3 nM, mientras que se une al receptor de estrógenos con una Kd de 0,1 nM.

Varias hormonas pueden unirse a una clase de recep-- tor, y las concentraciones de receptor pueden variar ampliamen- te según diferentes condiciones, tales como cambios en el ciclo - menstrual.

La unión específica o saturable puede ser calculada -- sustrayendo la unión no específica o no saturable de la unión -

total o sitios tanto específicos como no específicos (Fig. 1). Cuando se añade a la célula un exceso de ligando competitivo no marcado junto con la hormona marcada, el esteroide no marcado ocupa esencialmente toda la capacidad límite (sitios verdaderos del receptor) pero no altera la unión del esteroide marcado a los sitios no específicos de baja afinidad.

Los valores calculados a partir de estos experimentos de unión pueden usarse para calcular el número total de sitios de unión y la Kd o constante de disociación.

La Kd mide la afinidad del receptor por el esteroide y es aproximadamente la concentración de esteroide libre en la que se saturan la mitad de los receptores. Es la recíproca de la constante de asociación y puede ser obtenida a partir de una gráfica de Sactchard (45) o desde cualquier otro método de análisis de datos.

La forma fisiológica que adopta el receptor después - que los estrógenos entran en la célula diana es actualmente incierta. Factores tales como la fuerza iónica, temperatura, presencia de molibdato, o enzimas inhibidores, como por ejemplo, la leupeptina, pueden hacer que el receptor se halle en una - cierta forma, o que se interconvierta entre varias formas moleculares, de las que cualquiera o ninguna podría ser el verdadero receptor endógeno (46). Los diversos tipos de receptor pueden ser separados por muchas técnicas, incluyendo la centrifugación a través de gradientes de sucrosa. La proporción de -- proteína sedimentada por unidad de campo de gravitación es --

expresada en unidades Svedberg (S) (1 S = 10^{-13} segundos).

SHERMAN y cols. (47) usando tampones que contienen molibdato en condiciones que minimizan la proteolisis, han descrito, tras la fase inicial de entrada de la hormona, una configuración de receptor de 10-11 S, de mayor tamaño que la descrita previamente de 8 S. Estos autores han detectado amplias variaciones en los niveles de enzimas proteolíticos en los citosoles tumorales, incluyendo el activador del plasminógeno, que podría contribuir a la escisión del receptor directa o indirectamente a través de la acción de cimógenos.

WITTLIFF y SAULOV (48) han propuesto que la presencia de un mayor complejo receptor se asocia con un pronóstico clínico más favorable. La aparente correlación de predominio de receptores de menor tamaño, de velocidad de sedimentación más baja, con un peor pronóstico clínico, puede responder a un aumento de las proteasas, tales como el activador del plasminógeno, o a su actividad en los tumores altamente invasivos. Sin embargo, las formas mayores del receptor (8-11 S) pueden ser agregados de unidades de receptores o de varias proteínas diferentes (47).

NOTIDES y cols. (49) han publicado uno de los análisis más completos de receptores citoplásmicos. Usando la técnica de gradiente de sucrosa y la cromatografía con Dietilaminoetanol (DEAE-celulosa) para receptores de estrógeno parcialmente purificados de útero de ternera, concluyeron que el receptor no activa

do es un mónomero con un peso molecular de 7-8 x 10^4 y un -- coeficiente de sedimentación de 4 S. Después de reaccionar con el estrógeno, el complejo RE sufre un cambio conformacional --- "transformación" dependiente de la temperatura, que se asocia con la "activación" del receptor y una mayor afinidad por las uniones nucleares. Estos autores creen que el receptor activado es un dímero que tiene un peso molecular de 13-14 x 10^4 y un coeficiente de sedimentación de 5 S.

THAMPAN y CLARK (50) han descrito la presencia de - una proteína en el citosol de útero de rata, la cual forma un - complejo con la forma 4S del receptor para producir la forma - 5S activada.

La cinética de disociación de la hormona respecto del receptor proporciona un modelo sensible para la medida de la - activación del receptor. La velocidad de disociación de una hormona de su complejo receptor activado es un indicador de la efectividad con que esta hormona en particular mantiene al receptor en el estado activado.

La disociación del estradiol de su receptor ocurre en - dos fases (49). La primera fase exponencial rápida, se debe a la baja afinidad del estradiol por el receptor no activado, mientras que la segunda, mucho más lenta, traduce una mayor afinidad por el estado activado del receptor. La unión del estradiol, por tanto, cambia el equilibrio desde un estado de menor afini-- dad a otro activado de alta afinidad.

El progresivo aumento de la afinidad con la activación sugiere que el receptor de estrógeno puede tener interacciones altamente cooperativas bajo condiciones de equilibrio de unión. Los tiempos medios de los estados del receptor activado, estudiados por WEICHMAN y NOTIDES (51) "in vitro" a 25º C, fueron de 170 minutos para el estradiol, 40 minutos para el estriol, y 3 minutos para la estrona. Los estudios "in vivo", también realizados por ellos, mostraron que el tiempo de retención nuclear para el complejo receptor-estradiol activado era de 12 a 24 horas, mientras que el tiempo de retención del complejo receptor-estriol activado era solamente de 6 horas.

Varios investigadores han sugerido que las múltiples formas de RE detectados en cáncer de mama humanos pueden deberse a la degradación de receptores nativos. SHERMAN y cols. (52) han mostrado que los RE degradados por proteasas endógenas a "merorreceptores" de peso molecular más bajo, contienen sitios de unión citoplásmicos para las hormonas, pero carecen de sitios de unión nucleares. PUCA y cols (53) descubrieron en el útero de ternera un factor de "transformación del receptor" parcialmente purificado que era responsable de la degradación del receptor de estrógenos a un tamaño menor.

TILZER y cols. (54) consiguen la degradación de RE con altas concentraciones de cloruro potásico y bajas concentraciones de cloruro cálcico. Dicho autor tamebién encuentra que la leupeptina, el inhibidor de la proteasa, proporciona protección frente a la proteolisis solamente a altas concentraciones,

mientras que el molibdato sódico actua mejor a bajas concen-- traciones.

Estos experimentos sugieren que los receptores de estrógenos son unas proteínas relativamente frágiles que pueden ser parcialemnte degradadas si no se protegen.

2.4.- Sitios aceptores.

Despues de entrar en el núcleo celular el complejo - receptor-estrógeno 5S, se une a posibles sitios "aceptores" en la cromatina (55), donde el complejo hormona receptor activado modifica la expresión de genes específicos en un locus diferente de los cromosomas llamado sitio "efector".

KALLOS y cols. (56) usando células tumorales de mama en cuyo DNA se había sustituído bromuracilo, mostraron que la unión al receptor aumentaba cuando las células eran expuestas a radiaciones de longuitud de onda cerca a la luz ultravioleta (312 nm). Estas inducían la formación de enlaces covalentes cruzados entre el receptor y el DNA, fenómeno que sugiere - que el DNA juega un papel importante en la unión nuclear.

Recientemente dos grupos de investigadores han sugerido la unión preferencial de los receptores hormonales esteroideos a secuencias específicas del DNA.

PAYVAR y cols. (57) demostraron que receptores de glucocorticoides activados, parcialemnte purificados, se unían selec

tivamente "in vitro" a un fragmento clonado de virus de tumores mamarios murinos. El porcentaje de transcripción a partir del fragmento clonado de DNA se incrementaba considerablemente de manera receptor dependiente.

MULVIHILL y cols. (58) demostraron "in vitro" que - secuencias específicas de DNA (provenientes de genes que responden a hormonas) las cuales codifican a las proteinas de - clara de huevo, eran reconocidas por los receptores de progesterona del oviducto. Estos trabajos son importantes, porque sugieren que los receptores esteroideos pueden modular la transcripción a través del reconocimiento de secuencias específicas de DNA situadas dentro o cerca de los genes regulados por hormonas.

Se ha sugerido que los lugares aceptores de los cromosomas son un complejo específico de DNA y proteínas no histonas, a los que el complejo estrógeno-receptor reconoce y se une con alta afinidad (59).

Tambien se cree que existen lugares secundarios presentes en gran número en la cromatina donde el complejo ER - puede unirse con más baja afinidad. Estos sitios de baja afinidad pueden servir para aumentar al máximo la oportunidad de que se produzca la unión de los complejos a sitios aceptores principales.

SPELSBERG y cols. (60) después de numerosos y so-- fisticados experimentos usando el sistema del oviducto de pollo

demostraron que un grupo de proteínas ácidas no histonas llamadas AP3, parecían ser las más efectivas en conferir la capacidad de unión a la cromatina. Sin embargo, otros autores (56) sugirieron que las histonas estabilizaban la unión del receptor de estrógeno al DNA, mediante la provisión de determinantes específicos adicionales en el cromosoma. También propusieron que las interacciones histona-receptor podrían ser en parte responsables de la porción del receptor nuclear que es resistente a la extracción mediante sal. La mayoría de experimentos de otros autores, sin embargo, sugieren que las histonas no son moléculas aceptoras específicas relacionadas con las uniones nucleares.

BAILLY y cols. (62) usando el sistema de receptor glucocorticoideo en hígado de rata descubrieron un inhibidor de bajo peso molecular, presente en el citosol que impedía la unión nuclear. No se sabe si este inhibidor esta presente en los tejidos no diana o si se encuentra en otros sistemas de receptores hormonales esteroideos. Además de los sitios primarios de unión que se asocian con los complejos RE activados que son traslocados al núcleo, llamados sitios tipo I, también aparecen otros llamados tipo II (63).

Estos lugares tipo II aumentan en número después de la estimulación con estradiol, y parecen constituir una respuesta nuclear específica inducida hormonalmente. Los lugares tipo II, que no son traslocados desde el citoplasma, se hallan presentes en cantidades mayores que los de tipo I y se mantienen

elevados durante un mayor período de tiempo (63). No está claro si la presencia de estos lugares tipo II representa la síntesis o activación de un nuevo tipo de moléculas ligadoras, o una alteración algo menos específica en la estructura de la cromatina. El papel exacto de estos sitios de unión tipo II en los tumores mamarios todavía no se conoce.

2.5.- Fenómenos transcripcionales inducidos.

Se piensa que la unión del receptor a los sitios aceptores aumenta la velocidad de transcripción de genes específicos, posiblemente al alterar su afinidad de interacción con el RNA polimerasa. En algunos sistemas, después de la estimulación estrógenica, aparecen rápidos aumentos en la transcripción y la mitosis se acelera (64).

Los fenómenos de síntesis que se producen pueden quedar restringidos o constituir el soporte necesario para la actividad metabólica aumentada de la célula en crecimiento. La administración de estradiol a los pollos causa un rápido aumento en la concentración del RNA mensajero de la ovoalbúmina (65) e induce el crecimiento y la diferenciación del oviducto. Además de la ovoalbúmina el estrógeno también estímula la síntesis de otras proteínas de la clara de huevo, tales como la conalbúmina, ovomucoide y lisozima (66).

NOTIDES y GORSKI (67) usando electroforesis en gel de almidón demostraron la presencia de una "proteína inducida" es

pecífica (IP) en el citosol de útero de rata que aparecía después de la estimulación estrógenica. La IP es un marcador -- muy útil de la acción estrogénica ya que su inducción puede reproducirse tanto "in vivo" como "in vitro" (68), aunque su papel en el crecimiento mediado por estrógenos es desconocido.

Una de las acciones más importantes del estrógeno - que puede observarse en las células diana, incluyendo las células de cáncer de mama hormonosensibles, es la inducción de la actividad progesterona (69) que puede estar implicada en - la ulterior regulación hormonal de las células.

Varios investigadores (70-72) usando métodos enzimáticos e inmunoquímicos han demostrado que la peroxidasa también parece ser un enzima inducida por estrógenos tanto en - tejido mamario normal como maligno.

Después de observar un aumento de la incorporación de timidina tras la estimulación estrogénica, se ha documentado que la timidinkinasa responsable de la fosforilización de - la timidina estaba también bajo control estrogénico (73). Otras actividades controladas por los estrógenos, incluyen la aparición de proteínas específicas intracelulares y secretadas, asi - como cambios morfológicos en la membrana celular (74).

La generalización más útil que puede hacerse a partir de estos datos en el momento actual es, que la mayoría de los efectos esteroideos están probablemente regulados a nivel - de la transcripción primaria. Probablemente, ulteriores investi

gaciones descubrirán lugares adicionales, potencialmente, regu ladores.

2.6.- Procesamiento del receptor.

Cuando el estradiol entra en la célula tumoral mama ria o en el tejido uterino sensible "in vitro", el complejo -- hormona receptor recién formado es rápidamente traslocado a - los lugares aceptores nucleares.

HORWITZ y McCUIRE (75) sugieren que los receptores nucleares unidos al complejo hormona-receptor citosólico, su-- fren un procesamiento de tal modo que desaparecen el 70% de sus sitios de unión, al menos durante unas pocas horas, tras las cuales el complejo receptor-nuclear adquiere un nuevo es- tado de equilibrio.

Sin embargo otros autores (76) han encontrado que el "procesamiento" no es una desaparición del receptor nuclear, como se había propuesto, sino más bien una modificación del - receptor hacia una forma menos soluble en cloruro potásico, y menos intercambiable. La nueva forma de receptor modificada - que aparece durante el "procesamiento" se caracteriza por una velocidad lenta de disociación del complejo RE y una sedimen- tación más rapida en los gradientes de densidad sucrosa.

Una variante hormoindependiente de células MCF-7 no muestra este procesamiento, sugiriendo así que este fenómeno - post-translocaional está asociado con la activación de los genes.

2.7.- Inactivación del receptor.

La inactivación del receptor que sigue a la transloca-- ción y a la unión nuclear al sitio aceptor se cree debida a la - desfosforilización del receptor secundaria a la acción de la fosfatasa nuclear (77).

De las experiencias anteriores parece desprenderse que el receptor inactivo puede ser reactivado mediante la fosforilización de un enzima ATP-dependiente en el citoplasma.

Estos hallazgos sugieren que el receptor es reciclado - por un proceso de desfosforilización en el núcleo, seguido por una refosforilización en el citoplasma, contribuyendo así a la reposición del receptor citoplásmico.

3.- RELACIONES HORMONA-RECEPTOR.

El sistema receptor estrogénico es sólo parte de un mecanismo hormonal complejo que influye en el desarrollo y función del cáncer de mama. Se han identificado muchos otros receptores hormonales en cultivos de células tumorales de mama, tales como receptores de progesterona, andrógenos, insulina, glucocorticoides, retinoides, prolactina, transferrina, factor de crecimiento epidérmico, calcitonina y vit D., pero el papel fisiológico especial de cada uno, exceptuando los de progesterona no está del todo aclarado.

4.- RECEPTORES DE PROGESTERONA.

La presencia de receptores de progesterona (RPg) en tumores RE positivos sugiere que estos tumores son capaces de sintetizar al menos un producto regulado por los estrógenos, pero ésto no significa que todas las respuestas inducidas por los estrógenos estén necesariamente conservadas.

En muchos sistemas "in vivo" o "in vitro", la administración de estradiol a células estrógeno-sensibles, provoca un aumento de 8 a 20 veces los RPg. Los inhibidores de la síntesis proteíca o del RNA bloquean este aumento (78).

La medición de receptores de progesterona estuvo dificultada por la falta de un ligando idóneo, dado que la progesterona se une fácilmente a otras proteínas plasmáticas tales como a la globulina de unión a los corticoides (CBG). Este obstáculo se soslayó con el descubrimiento de un nuevo progestágeno sintético el R-5020 (17,21, dimetil-19-nor-4,9 pregnadiene-3,20-diona), que muestra alta afinidad por los receptores de progesterona, sin necesidad de unirse a proteínas plasmáticas, baja velocidad de disociación y una interferencia insignificante con otros receptores hormonales (80).

Los RPg han sido estudiados extensamente en el sistema de oviducto del pollo donde pudo purificarse el receptor en los componentes A y B. Tanto el componente A como el B son proteínas 4S con un peso molecular de aproximadamente 79.000 y 108.000 respectivamente (81).

La subunidad A se une estrechamente al DNa, mientras que el componente B se une selectivamente a complejos proteínas no histona-DNA y tiene poca afinidad por el DNA (61).

Cuando se presentan como dímero AB, el sitio de unión en el DNA de la subunidad A está enmascarado. Se postula que - la unión inicial del receptor a la cromatina tiene lugar exclusivamente a través de la subunidad B, pero que la subunidad A subsiguientemente interacciona directamente con el DNA y estímula la síntesis del RNA mensajero (81).

HUGGINS y YANG (82) mostraron que tanto el embarazo como la administración de progesterona promovían el crecimiento de tumores mamarios de rata inducidos por el Dimetil-benzantraceno (DMBA). En contraste con sus efectos estimulantes, la progesterona puede causar regresión de los tumores de mama en -- animales y humanos, y la respuesta parece ser incluso mayor -- con una combinación de estrógenos y progesterona (83).

5.- METODOS DE DETERMINACION DE RECEPTORES ESTEROIDEOS.

Los receptores esteroideos han podido ser cuantificados porque tienen ciertas características que permiten su identificación. Son definibles por las siguientes propiedades "in vitro":

a) Capacidad de unión limitada: La respuesta biológica a una hormona esteroidea es un fenómeno saturable. Esto implica que hay sólamente un número limitado de sitios de unión en cual-- quier tejido dado. El citosol o la fracción nuclear de un tejido

diana asociado a varias concentraciones de esteroide marcado - con un isótopo permite cuantificar la asociación del esteroide -- con el receptor hasta alcanzar el equilibrio.

b) Alta afinidad: Los bajos níveles de esteroides circulantes que son generalmente del orden de 10^{-10} a 10^{-8} M, indican que estos receptores tienen una alta afinidad por su hormona respectiva.

c) Especificidad por la hormona: El receptor presenta una alta - afinidad por una o varias hormonas. Esta especificidad hace que la célula del tejido diana responda a la señal hormonal a pesar de la interferencia de otras señales. La unión del estrógeno a su receptor es específica, mientras que la unión de la progesterona a su receptor es menos específica relativamente, ya que la progesterona se une también a los receptores de andrógenos y de - glucocorticoides.

d) Especificidad de los tejidos: Una respuesta significativa a - las hormonas sexuales solo la presentan ciertos tejidos tales como útero, vagina y glándula mamaria, denominados tejidos diana, - los cuales tienen un número de receptores citoplásmicos muy elevado, comparado con otros órganos que también poseen receptores, como son el hipotálamo, riñón, diafragma, bazo y hígado, pero - en muy pequeña cantidad.

e) Correlación con la respuesta biológica: La unión de la hormona a su receptor podría ser demostrada por la amplitud de la - respuesta. Este criterio no ha podido demostrarse a causa de la interacción de diferentes hormonas.

Varias técnicas "in vitro" se han desarrollado en los últimos años para detectar y cuantificar la concentración de - proteínas receptoras intracelulares. Todas ellas conllevan:

a) Una tecnología muy precisa, capaz de distinguir entre fija-- ciones específicas e inespecíficas.

b) La medición de las afinidades de fijación y del número de - lugares de unión, estén ocupados o no por hormona endógena, y relacionarlos con la concentración de proteínas o de DNA de los extractos o citosoles de los tejidos en estudio.

c) La determinación de los lugares de fijación libres, es decir, no ocupados por hormonas en el momento del estudio y, por lo - tanto, capaces de ser marcados directamente por la adición de - esteroides radioactivos y también, o aún mejor, la determinación de la totalidad de los lugares ocupados por la hormona endógena, con la ayuda de un método de intercambio.

En todos los métodos utilizados existe una fase común en la que es necesario el aislamiento de la fracción citoplasmáti ca de las células.

Existen varios métodos de eficacia y rigor ya contrastados y otros nuevos que están en fase de evaluación. Los más - ampliamente utilizados han sido el de Carbón-Dextrano (DCC) y/o gradiente de densidad sucrosa, los cuales son considerados como los métodos standard.

Estos procedimientos fueron introducidos por JENSEN y McGUIRE (20,84) en los últimos años de la década de los sesenta.

5.1.- Método del Carbón-Dextrano (DCC).

Es el método generalmente adoptado en laboratorios de aplicación clínica para la determinación de receptores esteroideos, por su mayor rápidez y su menor costo.

El método consiste en incubar fracciones del citosol con concentraciones crecientes de hormona marcada, durante 18 horas a 4ºC. Durante este período el esteroide marcado se une específicamente al receptor.

Paralelamente también se realizan incubaciones de solución tampón con las mismas concentraciones de estradiol radioactivo que constituirán los blancos del ensayo.

El exceso de hormona marcada no ligada al receptor se elimina mediante la adición de carbón-dextrano y posterior centrifugación, rechazándose el sedimento (85).

Alícuotas del sobrenadante de cada una de las distintas muestras incubadas donde se encuentra el complejo hormona-receptor son contadas con la ayuda de un contador de centelleo líquido.

La cuantificación se realiza mediante el módelo matemático de Scatchard (45), en el que se representa en las abcisas la cantidad de hormona marcada ligada y en las ordenadas el cociente hormona-ligada/hormona-libre; obteniéndose una recta cuya intersección con el eje de las abcisas nos da el número total de sitios de unión (receptores) y cuya pendiente señala la cons-

tante de disociación (Kd) del complejo hormona-receptor, indicando la especificidad de la reacción. Los resultados se expresan en fentomoles (fmol = 10^{-15} M) por miligramo de proteína citoplásmica.

5.2.- Método de ultracentrifugación en gradiente de sucrosa.

Este método tiene la ventaja de demostrar las formas moleculares del receptor (8S y 4S) y de descartar las uniones no específicas. El principal inconveniente es el elevado coste y el pequeño número de análisis realizables, comparado con otras técnicas.

En este método, una fracción del citoplasma obtenido por ultracentrifugación diferencial, se diluye hasta obtener una concentración proteíca entre 2 y 6 mg. Se incuban alícuotas de esta fracción durante 15 minutos con estradiol no marcado y posteriormente se añade estradiol marcado, para incubar seguidamente a 4ºC durante 4 horas. Muestras idénticas son procesadas paralelamente, excluyendo el estradiol no marcado.

Después de esta incubación se trasladan las muestras a un precipitado de carbón-dextrano, centrifugándose a 3.200 r.p.m. para eliminar el exceso del mismo. Por otra parte debe prepararse con anterioridad un gradiente de sucrosa cuya concentración varia del 10-30%. Inmediatamente antes de que las distintas fracciones estén preparadas para aplicarlas al gradiente, se añade una pequeña porción de seroalbúmina marcada con C-14, que actuará como marcador interno. Finalmente se someten a ultracentrifugación durante 16 horas midiéndose las distintas fracciones del gradiente -

mediante contador de centelleo líquido.

Con el método de gradiente de sucrosa, la presencia de un pico de radioactividad ocupando una posición 8-9S indica con toda seguridad la presencia de receptores específicos para los -- estrógenos. La existencia de un pico 4-5S no es siempre hormono-específica (84).

5.3.- Métodos alternativos.

Se han aplicado otros métodos para la determinación de receptores eliminando el receptor unido de la hormona libre por - precipitación con Sulfato de Protamina (86). Otras técnicas de - adsorción y precipitación incluyen la adsorción del receptor mediante filtros de intercambio iónico; adsorción del receptor mediante - la hidroxilapatita (87), y finalmente elimiando el esteroide libre mediante anticuerpos antiesteroideos (88). Todos ellos tienen ventajas y desventajas, pero no están lo suficientemente comprobados para su utilización rutinaria.

5.4.- Métodos Histoquímicos.

La detección histológica de las hormonas esteroideas y de los receptores específicos en tejidos morfológicamente intactos permite visualizar la captación, transporte y distribución de las hormonas y entender de forma más completa las interacciones -- hormona-receptor bajo diversas condiciones fisiológicas y patofisiológicas.

5.4.1.- Anticuerpo Antihormona.- Varios estudios (89,90) han usado anticuerpos antiestradiol o anticuerpos frente a estradiol polimérico para localizar al receptor en tumores mamarios -- humanos.

El tejido tumoral es evaluado mediante una técnica con doble anticuerpo, que usa antisuero antiestradiol seguido por un suero antiinmunoglobulina conjugada con fluoresceína. Se han utilizado técnicas de inmunofluorescencia indirecta que emplean antisueros de oveja antiestradiol y de conejo antiprogesterona junto a antisueros conjugados con isotiocianato de fluoresceína con la intención de detectar simultáneamente la presencia de ambas hormonas en las líneas celulares de tumores mamarios humanos y en - biopsias de cáncer de mama.

También se han utilizado varias técnicas de inmunoperoxidasas. Todas ellas emplean un anticuerpo antiesteroide aprovechando la actividad enzimática de la peroxidasa que lleva incorporada un sustrato cromógeno (91).

El método de peroxidasa-antiperoxidasa (PAP) puede -- aumentar la sensibilidad de 100 a 1000 veces comparado con los métodos de inmunofluorescencia y puede realizarse tanto en especímenes fijados en lugar de congelados. La principal desventaja de este método, al igual que en otros histoquímicos, es la dificultad de cuantificar el receptor.

5.4.2.- Conjugados de esteroides con sustancias fluores-

ceinadas.- Esta técnica utiliza sustancias similares a los esteroides que llevan un trazador visual y mantienen la afinidad de unión por los receptores esteroideos. En la mayoría de los casos, estos derivados se componen de moléculas esteroideas unidas covalentemente a un transportador proteíco que previamente ha sido marcado con isotiocianato de fluoresceína, lo que permite su visualización por el microscopio de fluorescencia.

PERTSCHUK y cols. (92) usando 17-beta-estradiol y - - 11 alfa-hidro-progesterona conjugados con seroalbúmina bovina ⁼ fluoresceinada encuentra un 92% de correlación con el análisis - bioquímico de RE en 314 muestras de tumores mamarios y un 86% de correlación con el análisis histoquímico de RPg en 86 muestras.

Existen otros métodos en donde se ha marcado el estrógeno con fluoresceína 17-FE (lleva una mitad de la fluoresceína unida a la posición 17 del estradiol) con lo cual puede entrar en la membrana celular y marcar los sitios del receptor - en los tejidos diana, poniendo de manifiesto la interacción estrógeno-receptor.

FISHER y cols (93) no encontraron relación cuantitativa directa entre este método citoquímico y el ensayo de carbón-dextrano. Sin embargo, demostraron que la técnica citoquímica era útil para medir la proporción de células con reacción positiva al receptor de estrógeno en una muestra tumoral y que el 81% de los tumores con valores de RE entre 10 y 99 fmoles/mg.

medidos con el ensayo de DCC se asociaba con más del 10% de células positivas al marcador.

La mayoría de las veces la fluoresceína se vé en toda la célula que contiene el receptor, aunque en ocasiones, solamente se tiñe selectivamente el núcleo o el citoplasma.

Siendo necesario un mayor perfeccionamiento de esta técnica citoquímica, el ensayo es simple, rápido, barato y merece una evaluación más profunda.

Desafortunadamente ninguna de las técnicas histoquímicas han sido evaluadas de forma independiente, prospectiva y ciega. A pesar de ser atrayentes, su uso rutinario no puede considerarse apropiado en la actualidad. Se requieren estudios ulteriores antes de que puedan abandonarse los métodos de ensayo tradicionales.

5.5.- Anticuerpos antirreceptor: El reciente desarrollo de anticuerpos monoclonales específicos para la proteína receptora de estrógenos permite la detección del receptor independientemente de la unión de la hormona marcada al receptor.

Parte de la dificultad en obtener un anticuerpo específico frente al receptor está relacionada con la concentración tan baja de RE incluso en los tejidos diana.

Los anticuerpos frente al receptor de estrógeno de úte-

ro de ternera generados en conejos o cabras tienen una reactividad cruzada con el RE de muchas especies, mientras que los obtenidos por inmunización de la rata Lewis reaccionan sólamente con el RE de ternera.

Se obtuvieron linfocitos esplénicos de una rata inmunizada frente a receptores parcialmente purificados procedentes de células tumorales mamarias; estos linfocitos se fusionaron con tres diferentes líneas celulares de mieloma de ratón, dando lugar a distintas líneas células de hibridoma.

Estas células de hibridoma secretaron anticuerpos monoclonales específicos contra el receptor estrogénico humano, pero - mostraban una reacción cruzada con el RE de varias especies de mamíferos.

DeSOMBRE y cols (94) recientemente han conseguido un antisuero monoclonal frente al receptor estrogénico que les permite la utilización de un sistema inmunorradiométrico de gran sensibilidad y especificidad.

6.- CONTROL DE CALIDAD DE LOS ENSAYOS DE RECEPTORES.-

El control de calidad de los ensayos de receptores es - obligatorio para que su uso sea fiable en el manejo clínico de -- las pacientes con cáncer de mama.

Varios grupos, tales como el grupo cooperativo de mama de la O. R T C y la reunión del "NCI Sponsored Consensus Mee-

ting on steroid receptors in breast cancer" han recomendado un intercambio de muestras duplicadas de tumor o de homogenizados de útero de ternera liofilizado para asegurar la estandarización y el control de calidad (95).

Se han establecido las líneas de guía específicas para estos grupos, para ayudar a evitar errores en la realización e interpretación de los ensayos de receptores.

7.- UTILIDAD CLINICA DE LA DETERMINACION DE RE Y RPg. EN EL CANCER DE MAMA.

Las células de mama normales contienen receptores citoplásmicos o de membrana para cada una de las hormonas esteroideas o peptídicas que influyen en el crecimiento y función de la glándula mamaria.

Estos receptores son los responsables de la interacción inicial entre la hormona y la célula y funcionan como desencadenantes de la secuencia de acontecimientos bioquímicos característicos de cada hormona en particular.

Cuando ocurre una transformación neoplásica de las células diana, como son las del cáncer de mama, éstas pueden retener todo o parte de los sitios receptores de una población celular normal. Si las células retienen los receptores esteroideos, su crecimiento será dependiente de las hormonas y podrá ser controlado por manipulaciones endocrinas. Este seria el caso de un tumor -

hormonodependiente; pero si la célula no conserva estos receptores, no será reconocida por las hormonas circulantes como célula diana y el control hormonal desaparecerá, siendo el tumor no hormonodependiente.

Esto implica que la cuantificación del número de sitios receptores puede utilizarse como índice de la dependencia hormonal celular.

Esta hipótesis ha sido confirmada, y en el momento actual está bien establecido que los tumores de mama que no contienen RE raramente responden a una terapeútica endocrina, mientras que los tumores con RE positivos frecuentemente responden a las manipulaciones hormonales (96).

No obstante la positividad de los RE en un tumor no garantiza una respuesta a la terapia endocrina, ya que el 40% de las pacientes no responden a pesar de que el análisis de RE es positivo. HORWITZ y cols. (97) sugieren que ciertos tumores RE positivos no responden a manipulaciones endocrinas, porque existe un defecto en algún paso distal del mecanismo de acción estrogénica, conduciendo a un crecimiento autónomo. Por tanto, es necesario confirmar la integridad de la secuencia metabólica que es desencadenada por la unión del estrógeno al receptor.

Basados en la observación de que los RPg son inducidos por los estrógenos en los tejidos diana normales (98) y en cultivos de células de cáncer de mama humano (69) surgió la hipótesis que los RPg podrían ser un mejor marcador que el RE

para asegurar la existencia de una vía intacta en la respuesta al estrógeno. Actualmente es aceptado que los RPg son un mejor marcador de la dependencia hormonal de un tumor que el - - RE (99-100).

Todo ello sugiere que en los tumores de mama deben - ser medidos el contenido tanto de RE como de RPg rutinariamente, y que el resultado de estos ensayos puede ayudar a individualizar el tratamiento de las pacientes con cáncer de mama. Su cuantificación además nos informa sobre la conducta biológica del tumor, su agresividiad y la probabilidad de recurrencia.

8.- RECEPTORES HORMONALES: RELACION CON DISTINTOS PARAMETROS.

8.1.- Distribución de RE y RPg.

Se ha confirmado que entre un 50-70% y un 35-60% de - los cánceres de mama tienen en su citosol cantidades medibles de RE y RPg respectivamente. Las variaciones de los porcentajes se deben a los diferentes níveles de positividad que adoptan los -- distintos autores (entre 3 y 10 fmoles/mg de proteina citosólica) (101-102).

La concentración de RE en los tumores varía en un - amplio margen desde níveles indetectables a más de 1000 fmoles/mg proteína y para los RPg de o - 5000 fmoles/mg. de proteína (103).

En cuanto a las metástasis de cáncer de mama, el por-

centaje de RE positivos varía desde el 35-60%. Los RPg también tienen una menor incidencia, alrededor de 40-47% (104-106).

La concentración media de los níveles de RE en tejido metastásico es similar a la encontrada en tumores primarios, no siendo así en cuanto a los níveles de RPg que se encuentran más bajos en el tejido metastásico.

8.2.- Estado menopaúsico y edad.-

En mujeres premenopaúsicas el porcentaje de positividad y valores cuantitativos de RE son más bajos que en las postmenopaúsicas. El porcentaje de RE positivos va desde el 50% en pacientes por debajo de los 50 años, hasta el 70% en pacientes por encima de los 50 años. Esta mayor incidencia de positividades y de níveles en las pacientes postmenopaúsicas es un hecho comprobado por la mayoría de investigadores (102,107-109).

No todos los autores están de acuerdo en la causa responsable de este aumento. A este respecto se barajan distintas teorías. La más aceptada reconoce, en mujeres con ciclo menstrual conservado, un aumento en la síntesis de RE por la acción estrógénica, pero precisamente esta mayor concentración plasmática de estrógenos ejerce un efecto de bloqueo de los RE, impidiendo la fijación del estradiol marcado utilizado en su determinación, con la consiguiente aparición de falsos negativos. Por el contrario, en la mujer postmenopaúsica, la disminución de estrógenos que presentan en este período, determinaría la existencia de RE no

ocupados. Y esto explicaría la mayor incidencia de positividades que parecen presentar las pacientes de mayor edad.

Datos recientes sugieren, sin embargo, que las concentraciones más bajas de RE encontradas en pacientes premenopaúsicas no se explican sólo por la parcial o completa presaturación de los sitios receptores, ya que los níveles fisiológicos de estrógenos no son suficientes para saturar todos los lugares receptores (110), y además, no se ha encontrado relación entre concentración de estrógenos y contenido de RE (111), lo cuál sugiere que otros factores pueden también ser importantes.

Otro posible mecanismo para explicar este hecho es que los altos níveles de progesterona circulantes en pacientes premenopaúsicas repriman la síntesis de RE a diferencia de lo que ocurre en el estado postmenopaúsico donde los níveles de progesterona son bajos (111).

Una de las controversias actuales es si este aumento de receptores de estrógeno se relaciona con la edad o con el estado menopaúsico.

Existen pocos estudios que analizen estos factores conjuntamente, pero en un trabajo reciente de CLARK y cols. (112) concluyen que este aumento de RE se relaciona directamente con la edad y no con el estado menopaúsico.

La incidencia de tumores con RPg positivos es similar tanto en mujeres pre como en postmenopaúsicas, en la mayoría de los datos de la literatura, encontrándose aproximadamente en un

40-57% (113-114). Los níveles medios de RPg también son similares en ambos grupos.

También se ha analizado si los RPg se relacionan con - la edad o con el estado menopaúsico, o si es un factor indepen-- diente de los dos. Los estudios realizados demuestran que se correlaciona con los dos, tanto con la edad como con la menopausia - (112).

No obstante, el cáncer de mama parece ser intrínsecamente diferente en mujeres jóvenes y mayores, como está reflejado por la epidemiología, así como por el estado del receptor.

8.3.- Sitio de metástasis.-

Los Tumores RE positivos tienen una ligera predilección a metastatizar en piel, ganglios y huesos (107, 115-116).

La incidencia de metástasis viscerales, sistema nervioso central, y pleura no parece influenciarse por el estado del receptor. Aunque existen trabajos que sugieren que las pacientes con - RE negativos tienen tendencia a metastatizar en sistema nervioso - central y hígado (117-118).

8.4.- Tamaño del tumor y localización.-

Mientras que algunos investigadores han señalado una - tendencia de los tumores grandes a ser más frecuentemente RE negativos y RPg negativos (112, 119-120), otros, no encuentran ningu-

na relación significativa (121-124).

No se ha señalado relación alguna entre localización - tumoral y estado del receptor (112.125).

8.5.- Número de ganglios infiltrados.-

La mayoría de autores observan que no existe relación entre el estado del receptor en el tumor primario y el número de ganglios axilares afectos (102, 112, 124).

También se han realizado estudios de receptores a nível del tumor y en los ganglios afectos. No existe concordancia - en los resultados, aunque algunos autores (126) encuentran una mayor concentración de receptores en los ganglios linfáticos, que puede en ocasiones, duplicar la del tumor primario. Esto lo atribuyen a la alta celularidad tumoral encontrada en los ganglios en comparación con el tumor primario.

8.6.- Grado histológico.-

Numerosos estudios sugieren que existe un mayor número de casos RE negativos en aquellos tumores con grado III de diferenciación, comparados con los grados I o II (120, 127-128).

De hecho, aquellos tumores más diferenciados parecen ser más frecuentemente RE positivos que los tumores pobremente - diferenciados. Esto sugiere que el estado de receptor representa un aspecto bioquímico de la diferenciación tumoral.

McCARTY (129) observa que la relación entre grado histológico y contenido de receptores es mucho más estrecha si consideramos RE y RPg simultáneamente.

8.7.- Celularidad tumoral.-

Muchos autores han demostrado que la celularidad epitelial de los tumores de mama se relaciona directamente con su tendencia a ser RE positivos (130).

Otros autores (127, 131) sugieren que la presencia o ausencia de RE y RPg no está en relación con el número de células tumorales en la muestra estudiada.

8.8.- Tipo histológico.-

Se ha señalado que tumores de tipo lobulillar y tumores ductales con componente tubular, tienen más RE que los tumores ductales típicos (131-132).

En los tumores lobulillares la frecuencia de RE positivos es de un 80-78% y RPg en una proporción de un 50-55%. En los ductales infiltrantes RE 70% y RPg 60% (132-134).

Otros autores no encuentran correlación con el tipo histológico (121).

8.9.- Elastosis.

Pocos autores han encontrado correlaciones significativas entre el grado de elastosis y contenido de RE. Algunos de ellos señalan una ligera tendencia a mayor positividad de los - RE en aquellos tumores ricos en tejido elástico (135-136).

8.10.- Infiltración linfocitaria.-

Parece existir una relación inversa entre el grado de infiltración linfocitaria y la incidencia de tumores con RE positivos (120).

8.11.- Cinética celular.-

Varios investigadores han publicado (137-138) que el índice mitótico medido por la incorporación de timidina tritiada, se correlaciona inversamente con la presencia de receptores en - un tumor.

Usando citometría de flujo, encuentran que los tumores de mama con RE negativos tienen un 17% de células tumorales en fase S del ciclo, mientras que las células conteniendo RE tienen 11% de las células en fase S. En los tumores RE negativos se - observa cierta tendencia a una mayor aneuploidia (139).

Los tumores con un rápido crecimiento celular como - son los cánceres de mama inflamatorios poseen en escasa proporción RE y RPg. Estos se encuentran alrededor de un 28% de este

tipo de tumores y con níveles cuantitativamente más bajos que - aquellos tumores que tienen una baja proporción de crecimiento (140-141).

8.12.- Respuesta al tratamiento citostático.-

Se ha querido comprobar la posible relación entre el contenido de receptores y la respuesta a la quimioterapia citotóxica. Este punto parece ser uno de los aspectos más controvertidos.

La mayoría de autores han demostrado que no existe ninguna correlación (142).

9.- VARIACION DEL CONTENIDO EN RECEPTORES EN UN MISMO TUMOR.

Varios grupos de investigadores han examinado distintas porciones de un mismo tumor de mama y han demostrado variaciones en la concentración del receptor (143-146).

Generalmente hay una concordancia en la clasificación de tumores como negativos o positivos, pero se han observado variaciones en la concentración de receptores en diferentes áreas de un mismo tumor. Cuando estas variaciones ocurren, pueden ser debidas a la heterogenidad del tumor, a la distribución que adopten las células malignas en la sección del mismo, o a imprecisiones - del ensayo.

No existe acuerdo según los datos de la literatura - (145-146) sobre qué porción de un mismo tumor es más rica en - receptores, el centro o la periferia. DAVIS (146) encuentra un mayor contenido en RE y RPg en el centro que en la periferia, mientras que SILFVERSWARD (145) encuentra valores de RE progresivamente mayores desde el centro a la periferia.

Otros autores (119) indican una similitud en el contenido de receptores de tumores que ocurren simultáneamente en -- ambas mamas, pero refieren que los tumores bilaterales asincrónicos manifiestan una mayor disparidad en el contenido de receptores.

10.- RECEPTORES HORMONALES E INDICE DE RESPUESTA A LA TERAPEUTICA HORMONAL.

La hormonodependencia del cáncer de mama se conoce desde 1896 cuando BEATSON (2) refirió la regresión de tumores inoperables depués de la ovariectomía en dos mujeres premenopaúsicas. Desde entonces, a la castración terapeútica se fueron - añadiendo nuevas formas de tratamiento como la suprarrenalectomía, hipofisectomía y la administración de andrógenos y estrógenos. Con estas formas de tratamiento se conseguían respuestas en un 30% - de los carcinomas de mama (147-148), lo que hizo suponer que existian factores intrínsecos tumorales que condicionaban la eficacia - de la hormonoterapia.

La demostración de que gran parte de los efectos hormo

nales son mediados a través de los receptores citoplasmáticos y el conocimiento y cuantificación de los mismos en el cáncer de mama, ha llevado a cierto grado de especificidad y selectividad de pacientes en la práctica de la terapia hormonal de esta en-- fermedad.

La principal aplicación de la determinación de RE ha sido la selección de pacientes que se van a beneficiar de un -- tratamiento endocrino. Es un hecho el que los tumores RE negati_ vos no suelen responder a la terapia endocrina.

Los resultados de varios investigadores, (149), separadamente, demuestran que los tumores receptor estrógeno positivo responden a la terapia endocrina en una proporción de un 40-62%. Cuando las pacientes son agrupadas de acuerdo al tipo de terapia endocrina el porcentaje de respuestas es similar. No -- obstante, existen un 40% de mujeres con tumores que tienen RE y que no se van a beneficiar de tales terapeúticas. Se ha comprobado que el nivel de RE en un tumor es el factor determin-- nante de la intensidad de la respuesta tumoral. Un tumor con - un alto nivel de RE puede contener una gran proporción de células con estos receptores, lo que propiciaría una gran reduc-- ción tumoral con tratamiento endocrino. Tumores con níveles indetectables o bajos de RE, tienen tan sólo una proporción de -- respuestas del 9%. Cuando el nivel de RE es de 3-100 fmoles/mg. el índice de respuestas es del 45%, mientras que alcanzan el 63% cuando es mayor de 100 fmoles/mg. (96).

Puesto que se ha demostrado que la síntesis de RPg es estrógeno-dependiente, éstos receptores podrán considerarse - como un producto final de la acción estrogénica. De ello se deduce que la medida de ambos receptores permite predecir mejor la respuesta al tratamiento endocrino. Numerosos ensayos clínicos han confirmado esta hipótesis y en tumores que poseen ambos receptores la respuesta a los tratamientos hormonales es de un -- 75-80% (150).

El subgrupo de pacientes con tumores RE- RPg+, -- aunque es pequeño (9%), muestra un porcentaje de respuestas de alrededor de un 53%. SARRIF (151) observa que algunos tumores con este fenotipo contienen RE si en la técnica de determinación utiliza citosol previamente tratado con carbón-dextrano, con el fin de eliminar el estradiol endógeno unido al receptor. El grupo de pacientes con tumores RE+ RPg- responden en un 32% (150).

El estado menopaúsico también afecta a la respuesta a la terapeútica endocrina y, en general, las mujeres postmenopaúsicas responden más frecuentemente que las premenopaúsicas. Cuando cada grupo menstrual es analizado, las premenopaúsicas jóvenes o postmenopaúsicas jóvenes, tienen una proporción de respuesta más baja que las pacientes mayores de cada grupo (152).

Las pacientes que mejor responden según la localización de las metástasis son aquellas que las presentan en tejidos blandos, y las que responden peor son las metástasis viscerales y entre ellas las hepáticas. La terapia endocrina es raramente

efectiva en las metástasis con linfangitis pulmonares o en las - lesiones de la piel de tipo inflamatorio (153).

Es bien sabido que las metástasis pueden tener un comportamiento biológico distinto al tumor primario y así podrían darse variaciones en el fenotipo de los receptores en el curso evolutivo de la enfermedad. Por otro lado en muchas pacientes no se - puede obtener muestra biópsica de sus metástasis. Por tanto, una importante cuestión que se plantea es si la determinación de los receptores realizada en el tumor primario, en el momento de la - mastectomía, sirve para predecir la respuesta a una terapeútica hormonal en el momento de la recaída.

La mayoría de autores están de acuerdo que el índice de positividad de los receptores, determinado en el momento de la mastectomía, muestra una buena correlación con la respuesta a la terapia endocrina en el momento de la recurrencia. KING (154) realiza un estudio del contenido de receptores de tumores obtenidos - en diferentes tiempos en una misma paciente y encuentra que tan sólo en un 15% cambian el fenotipo en cuánto a RE y un 20% en cuánto a RPg.

11.- TRATAMIENTOS HORMONALES.

Muchos enfoques terapeúticos clásicos, recomendados en el pasado, han perdido actualidad. Los procedimientos ablativos, tales como la hipofisectomía y adrenalectomía, así como la -

administración de grandes dosis de andrógenos y estrógenos son cada vez menos utilizados, debido a su potencial morbilidad y a las reacciones secundarias causadas por ellos.

Por otro lado, el mejor conocimiento de la acción hormonal en la célula diana, ha permitido desarrollar agentes nuevos con mejores índices terapeúticos.

La utilización de sustancias que actúan bloqueando o modificando algún nivel de la acción de las hormonas esteroideas, va a conseguir que se modifique el desarrollo tumoral. Entre éstas se encuentran los antiestrógenos, progestágenos y aminoglutetimida.

11.1.- Antiestrógenos.-

A este grupo pertenecen una serie de compuestos no esteroideos, capaces de disminuir la incorporación de los estrógenos a nivel de los tejidos diana, tanto en el animal como en el hombre. (155).

Esto se debe a que establecen un bloqueo competitivo específico a nivel de la célula tumoral entre los estrógenos, cualquiera que sea su origen, y los receptores específicos. Los antiestrógenos entran en la célula, se unen al receptor de estrógeno y bloquean parte del efecto estrogénico, especialmente la división celular. Por otro lado se ha visto que también producen un aumento de los receptores de progesterona (156-157).

El progreso de la química de los antiestrogenos ha conducido a la síntesis de productos tales como tamoxifeno, de gran eficacia terapeútica en el cáncer de mama, y con mínimas reacciones secundarias (155).

In vitro, el tamoxifén actúa competitivamente impidiendo, de forma reversible, la fijación de las moléculas de estradiol a los receptores estrogénicos del útero de rata, explicando así su acción antiestrogénica. No obstante, no se descarta que la droga inhiba por otro lado la producción de estrógenos. (158).

Estudios realizados en cultivos celulares de carcinoma de mama humano han demostrado que tamoxifén inhibe la incorporación de timidina tritiada al DNA, pero este efecto puede hacerse reversible tras la adición de nuevas concentraciones de estradiol (159).

Los ensayos iniciales de tamoxifen en el cáncer de mama metástasico fueron publicados por COLE en 1971 (160) y posteriormente por WARD en 1973 (161). Estos investigadores mostraron que la frecuencia de regresiones en el cáncer de mama metástasico tratado con tamoxifén eran equivalentes a las aparecidas con altas dosis de estrógeno y por contra, dada su escasa toxicidad, era de myor aceptación por las pacientes comparándolo con los estrógenos.

Cuando se tiene en cuenta el estado de los receptores, el índice de respuesta tumoral es de un 50-60%, si los RE son

positivos, la medida de los RPg en el tumor puede ser utilizada para mejorar la precisión de respuesta, llegando a ser del 77% cuando RE y RPg son positivos (162–163).

Varios ensayos indican que el tamoxifen es efectivo tanto en pacientes pre como postmenopaúsicas, aunque la frecuencia de respuesta aumenta con la edad, y con el tiempo transcurrido después de la menopausia (164).

En relación con la localización de las metástasis, según los diferentes ensayos realizados, las lesiones de tejidos blandos responden mejor que las óseas y viscerales. Hay que señalar que en pocas ocasiones se obtienen regresiones de metástasis hepáticas y muy excepcionalmente en las metástasis cerebrales. (165).

La frecuencia de respuesta a una terapia endocrina, después de la utilización de tamoxifén es más elevada en las pacientes que previamente han respondido a este compuesto (166).

La duración media de la respuesta se sitúa alrededor de los 12 meses (165).

Tamoxifén ha sido empleado en una amplia escala de dosificaciones de 10 a 120 mg/día. pero no parece existir una relación dosis respuesta (167). Se acepta que la dosis más adecuada es la de 10 mg dos veces al día.

11.2.- Progestínicos.-

Los progestágenos en general fueron por más de una década considerados fármacos menores en el tratamiento de la fase diseminada del cáncer de mama. Esto se explica por los pobres resultados obtenidos con éstos fármacos a dosis convencionales.

A partir de 1973 es cuando la medroxiprogesterona (MPA) se reevalua como fármaco eficaz en el tratamiento de la fase avanzada del cáncer de mama. El empleo de altas dosis (1000 a 1500 mg/día i.m.) indujo un mayor porcentaje de respuestas (168).

El MPA actúa por intermedio del receptor de progesterona y antagoniza el efecto del estrógeno sobre la división celular. Este efecto antiestrogénico es de gran importancia, pero su mecanismo no es completamente conocido. (166).

El progestágeno más comúnmente usado es la medroxiprogesterona acetato, que puede ser administrado por vía parenteral u oral. Las dosis utilizadas por vía intramuscular han sido de 100 a 2000 mg/día. Las dosis empleadas por vía oral han sido de 400 mg/día. La dosis óptima según los diversos autores está comprendida entre 500 y 1000 mg. i.m. al día durante un mes, como terapia de ataque, continuando con 500 mg. 2-3 veces a la semana como mantenimiento (169-171).

Con estas dosis el índice de respuestas objetivas

alcanzado es similar a las obtenidas con antiestrógenos.

Las altas dosis respecto a las dosis mas bajas presentan obviamente una mejoría en cuánto a índice de respuesta y de las condiciones generales de las pacientes, junto con la paliación del dolor. Sin embargo, son responsables de la mayor incidencia de efectos colaterales y en particular de abcesos glúteos.

La respuesta con MPA fueron más frecuentes en pacientes con metástasis en partes blandas y óseas. Por el contrario las metástasis viscerales fueron poco sensibles (171).

11.3.- Aminoglutetimida.-

Tanto la adrenalectomía bilateral como la supresión suprarrenal con grandes dosis de costicosteroides, son métodos reconocidos para el tratamiento del cáncer de mama metastásico. Sin embargo, la mortalidad operatoria y la morbilidad post-operatoria limitaron el uso de la adrenalectomía a un número muy seleccionado de pacientes. Con las dosis elevadas de corticosteroides se producían efectos secundarios importantes, además de que con éstos últimos la frecuencia de respuesta era significativamente menor y de más corta duración comparada con la adrenalectomía.

Para evitar estas limitaciones GRIFFITHS (172), fué el primero en sugerir el empleo de un inhibidor directo de la

síntesis esteroidea suprarrenal, la aminoglutetimida, como medio alternativo de conseguir la eliminación suprarrenal.

La aminoglutetimida, un derivado del hipnótico glutetimida, fué utilizada como anticonvulsionante en 1960, pero retirada posteriormente a causa de su efecto sobre la corteza suprarrenal. Investigaciones posteriores demostraron que el fármaco causa una inhibición reversible de la biosíntesis suprarrenal de cortisol, aldosterona y andrógenos, al impedir la conversión enzimática del colesterol en delta-5 pregnenolona. También actúa inhibiendo el enzima aromatosa el cual interviene en la conversión periférica de androstendiona a estrona (173).

En los cinco últimos años se ha estudiado por varios investigadores el efecto de la aminoglutetimida en el tratamieento del cáncer de mama metástasico (174). Los ensayos iniciales se limitaron a pacientes que se habían hecho refractarias al tratamiento humoral previo, o a enfermas con alto riesgo quirúrgico para la adrenalectomía. En 134 pacientes, se obtuvo globalmente un 33% de respuestas objetivas, pese al mal estado general de las mismas (175).

Más recientemente, ha sido empleada la aminoglutetimida en pacientes que eran subsidiarias de adrenalectomía o hipofisectomía. En estas condiciones la frecuencia de respuestas se situó entre 30-50% dependiendo de los factores de selección de las pacientes y de los criterios de respuesta manejados por los diferentes investigadores (174).

Cuando las pacientes que reciben éste tratamiento se seleccionan en base al contenido de RE el índice de respuestas se situa alrededor del 58-60%. la duración de las respuestas conseguidas parece muy semejante a las obtenidas con los métodos ablativos quirúrgico (176).

A causa de que el tratamiento con aminoglutetimida origina una insuficiencia suprarrenal es necesaria la terapia sustitutiva esteroidea sea con dexametasona o hidrocortisona. Es preferida la última porque la aminoglutetimida se ha demostrado que acelera el metabolismo de la dexametasona, y ello puede provocar la liberación de ACTH hipofisaria, la cuál puede sobrepasar el bloqueo suprarrenal creado por la aminoglutetimida (177).

En general, la aminoglutetimida se ha empleado a una dosis inicial de 250 mg. 4 veces al día. Aunque no graves, son frecuentes los efectos secundarios y aproximadamente 40-50% de las pacientes tratadas presentan erupciones cutáneas maculopapulosas y efectos neurológicos como letargia, somnolencia y ataxia. Afortunadamente éstos desaparecen de forma espontánea en las 6 primeras semanas de tratamiento en el 95% de los casos, pese a la continuación del mismo (174).

Por el déficit de la síntesis de aldosterona es necesario el reemplazamiento mineralocorticoideo en aproximadamente el 20% de las pacientes.

Con el fín de disminuir los efectos secundarios producidos por esta droga, se han realizado estudios comparando la

dosis de 500 mg. día frente a 1000 mg. día y se ha comprobado que se reduce la intensidad de los mismos, sin comprometer la actividad antitumoral (178).

Su utilidad ha sido demostrado sobre todo en pacientes con metástasis en tejidos blandos y en óseos (174).

Basándose en los datos actuales parece ser que la adrenalectomía química más la hidrocortisona, suponen una alternativa adecuada a los grandes métodos ablativos de adrenalectomía e hipofisectomía.

Su manejo es simple, evita el riesgo de mortalidad quirúrgica, y por ser reversible la supresión suprarrenal con la aminoglutetimida, no necesita un tratamiento de mantenimiento esteroideo a largo plazo.

11.4.- Combinaciones hormonales.-

A fín de mejorar el tratamiento hormonal del cáncer de mama, se han desarrollado estudios para determinar si una combinación de hormonas es superior a los agentes hormonales empleados aisladamente.

Se han publicado estudios referidos a la eficacia de tamoxifen formando parte de un tratamiento combinado en asociación con otros tratamientos endocrinos. La asociación con MPA no supuso mejora alguna sobre tamoxifen solo, pero un defecto imputable a este ensayo parece ser la baja dosis de MPA em-

pleada (100 mg/día) (179).

Basados en sus diferentes mecanismos de acción se están realizando estudios utilizando secuencialmente el tamoxifen y el MPA, ya que el tamoxifen aumenta la concentración de receptores de progesterona por tanto la susceptibilidad de las células tumorales a los efectos inhibitorios de las progestinas (180).

También se han realizado ensayos combinando tamoxifen con aminoglutetimida, basados en la que aminoglutetimida al disminuir la tasa de estrógenos en el organismo, podría mejorar el índice de respuesta a tamoxifen y por tanto que la combinación de aminoglutetimida mas tamoxifen sería más eficaz.

Tanto en estudios experimentales como humanos se ha demostrado que la reproducción de los estrógenos circulantes potencian la acción del antiestrógeno tamoxifen. Las investigaciones de LIPPMAN y cols (156) han puesto de manifiesto en la línea celular de cáncer de mama humano MCF-7, que la actividad estimuladora de los estrógenos excede significativamente a la acción supresora del tamoxifen. Asimismo estos autores afirman que la afinidad de los estrógenos por los receptores estrogénicos es 100 a 1000 veces mayor que la de tamoxifen. Por tanto, aunque se sabe que el tamoxifen ejerce una actividad antitumoral en presencia de estrógenos, en teoría, el efecto supresor de tamoxifen podría mejorarse reduciendo los niveles estrogénicos. Así, la competencia entre estrógenos y tamoxifen

por los receptores se resolvería a favor de tamoxifen.

No obstante, en los estudios realizados no se ha podido establecer una clara superioridad de la combinación de aminoglutetimida y tamoxifen sobre estos agentes usados independientemente (181), aunque existe una base suficiente para desarrollar estudios randomizados en este campo.

11.5.- Quimioterapia-hormonoterapia.-

La heterogeneidad biológica es probablemente uno de los factores más importantes que intervienen en el grado y la duración de la respuesta a una terapeútica endocrina y citotóxica en los cánceres de mama.

Recientemente se ha demostrado que en el momento en que el cáncer de mama es diagnosticado clínicamente (es decir, cuando existen alrededor de 10^9 células) contiene varias subpoblaciones celulares de diferentes fenotipos. Estas subpoblaciones pueden presentar diferencias en sus carácteres metabólicos, en el contenido de receptores hormonales y en su inmunogenicidad y cada subpoblación puede responder diferentemente a un tratamiento endocrino, citotóxico o radioterápico.

Las observaciones citoquímicas sobre la distribución de los receptores hormonales en las células de cáncer de mama, muestran una mezcla de tipos celulares en cuánto a contenido de receptores (182).

La presencia de una tasa aumentada de RE detectada por métodos bioquímicos se asocia generalmente a una elevada proporción de células RE positivas, y éstos resultados hacen pensar que el grado de respuesta hormonal en los cánceres de mama, depende de la proporción de células RE positivas en un tumor.

Igualmente se ha demostrado que la tasa de RE puede ser discordante en muestras múltiples y simultáneas, en el caso de un mismo tumor, e incluso entre dos tumores de una misma mama (183). El grado de discordancia entre dos biopsias simultáneas en dos grandes series es de 15 y 17% (184) y ha sido del 24% en tomas de biopsias serias realizados en el caso de la misma paciente (185)

Todo ello nos induce a pensar que la mayoría de tumores de mama son heterogéneos y están constituídos por porcentajes variables de células hormonodependientes (receptores positivos) al lado de otras que no lo son (receptores negativos). Ello condiciona que la respuesta terapeútica a la hormona o quimioterapia no sea homogénea en todas las células, así como la existencia de grupos celulares resistentes a uno u otro tipo de tratamiento.

Considerando el diferente mecanismo de acción de ambas formas terapeúticas junto a la hipótesis de una doble población celular en este tipo de tumores, la aproximación más lógica podría ser la combinación de quimioterapia y hormono-

terapia en aquellos tumores con receptores hormonales positivos.

Aunque teóricamente es un planteamiento terapeútico atractivo, los resultados obtenidos con combinaciones quimioterapia-hormonoterapia no logran demostrar una superioridad del tratamiento combinado

La mayoría de los ensayos indican una mejoría en el índice de respuestas, así como en su duración con este tipo de tratamiento pero la supervivencia global no parece incrementarse (186-188).

Los resultados de combinación ooforectomía y quimioterapia en pacientes premenopaúsicas parece ser generalmente superior a la quimioterapia sóla en la mayoría de las series, pero son necesarios más estudios para asegurar un claro beneficio en la supervivencia de estas pacientes (187-189).

En mujeres postmenopaúsicas los resultados son menos favorables, y no hay una diferencia significativa de la supervivencia cuando estas combinaciones terapeúticas se comparan con el uso secuencial de hormonas y quimioterapia (190).

En todos los estudios realizados con combinación hormono-quimioterapia se echa de menos la falta de información acerca del estado del receptor de las pacientes que entraron en el estudio; por tanto la interpretación de los resultados es difícil.

11.6.- Nuevas formas de administración quimioterapia-hormonoterapia.

Los tumores RE positivos tienden a ser más diferenciados, con pequeña fracción de crecimiento, como se ha demostrado con las medidas de índice mitótico con marcaje de timidina tritiada (137-138).

WEICHSELBAUM (191) ha mostrado un incremento de la sensibilidad al Ara-C en las células de cáncer de mama humano RE positivas, tras aumentar el índice de crecimiento por la administración de concentraciones fisiológicas de 17-beta estradiol. Posteriormente, si la fracción de crecimiento de éstas células disminuye por la adición de dosis farmacológicas de estrógenos, la sensibilidad al Ara-C decrece.

LIPPMAN y cols (156), han estudiado los efectos de los estrógenos y antiestrógenos en el crecimiento de células de cánceres de mama humanos. En un ensayo dondo se añadió estradiol 10^{-8} M ó tamoxifen 10^{-7} M a las células en el momento cero, no aparecieron diferencias en el crecimiento celular de la población control y en las células con estrógenos durante las primeras 14 horas; después, cuando el estradiol estimula las células empiezan a incorporar timidina en una proporción mayor que las células control. En cambio las células tratadas con tamoxifen, muestran una inhibición alrededor de las 14 horas. A las 36 horas se les añadió estradiol 10^{-8} M a la mitad de las células incubadas con tamoxifen. Después de 12 horas se vió

en éstas células un pico en la incorporación de timidina con unos niveles que excedieron, no sólamente los de control, sino también los niveles estimulados por estrógenos.

La reversibilidad de la inhibición del tamoxifen por el estradiol así como la observación de que el efecto de tamoxifen es prevenido por la administración simultánea de estradiol, sugiere que el tamoxifen inhibe a las células actuando sobre receptores de estrógenos, y no por un efecto tóxico inespecífico de los antiestrógenos. Además el aumento de los niveles de incorporación de timidina sobrepasando al control sugiere que estas células pueden ser bloqueadas por un antiestrógeno en un estadio del ciclo celular, pero que cuando añadimos estradiol revierte la inhibición producida por el tamoxifen en una larga proporción de células que entran en la fase del ciclo celular de síntesis de DNA.

Con todo ello, y basados en que el cáncer de mama exhibe heterogeneidad celular en cuanto al estado de RE; que la terapeútica hormonal y quimioterápica tiene diferentes mecanismos de acción y de toxicidad; y que los agentes ciclo-específicos son más efectivos en aquellas células en rápida división, las combinaciones de hormono-quimioterapia utilizadas con secuencias racionales, pueden dar un mayor índice de respuestas cuando se comparan con una terapeútica aislada.

Así se han realizado diversos ensayos con este tipo de combinaciones. LIPPMAN (192) realiza un estudio randomizado

con quimioterapia versus antiestrógenos seguidos con dosis fisiológicas de estrógenos y posteriormente quimioterapia.

Estos autores no encuentran diferencias en cuanto al número de respuestas, pero sí que hallan una mayor duración de la respuesta y de la supervivencia.

La ORTC (193) ha realizado un estudio usando una estrategia similar de una inducción inicial con ablación endocrina, seguida por dosis fisiológicas de estrógenos, y por quimioterapia. Sus datos iniciales han mostrado una alta proporción de respuestas incluyendo remisiones completas en más del 50%.

ALLEGRA (194) también utiliza un esquema similar de tratamiento con tamoxifen, estrógenos y una quimioterapia con metrotrexate y 5-fluoruracilo, obteniendo un aumento de respuestas globales, de los cuales 56% son respuestas completas.

Por tanto el uso de estos esquemas terapeúticos parece prometedor en estos ensayos iniciales.

11.7.- Terapeútica adyuvante con hormonoterapia.-

En Europa se vienen realizando varios ensayos con tamoxifen como terapia coadyuvante. Entre ellos los de PALSHOF en Copenhage, (195). RIBEIRO (196) en Manchester y un ensayo multicéntrico de BAUM (197) en Inglaterra. Utilizan el tamoxifen en los estadios I y II tanto en pre como en postmenopaúsicas.

Se han publicado sólo resultados preliminares de estos ensayos. En dos estudios todas las pacientes han sido observadas al menos 5 años; en el resto el tiempo medio de observación se encuentra entre 17 y 29 meses. Los datos de supervivencia todavía no han sido publicados en la mayoría de estos ensayos.

En el grupo de Copenhage con un tiempo medio de seguimiento de 78 meses, el aumento en el intervalo libre de enfermedad solo fué significativo en pacientes postmenopaúsicas, mientras que en las pacientes premenopaúsicas no se alcanzó la significación estadística. En el grupo de Manchester en que las pacientes premenopaúsicas fueron comparadas con castración radioterápica versus tamoxifen la supervivencia a los 5 años fué similar en ambos grupos. En el grupo de pacientes postmenopaúsicas la supervivencia global no mejoró a los 5 años en las que fueron tratadas con tamoxifen frente al grupo control, pero un subgrupo de pacientes con más de 4 ganglios positivos afectos, mostraron un beneficio significativo de la terapeútica adyuvante con tamoxifen.

El estado de los RE en el tumor primario se valoró en la mayoría de pacientes que se incluyen en estos ensayos.

En el grupo de Copenhague no se encontró correlación entre el efecto terapeútico del tamoxifen y el estado del receptor tanto en pre como en postmenopaúsicas, aunque éstos datos son todavía muy preliminares.

En el estudio de BAUM, tampoco se observan diferencias significativas en cuanto al estado de RE.

Los datos de éstos estudios indican que el tamoxifen como agente único puede prolongar el intervalo libre de enfermedad en algún grupo de pacientes. Y es probable que los receptores esteroideos puedan ser utilizados como factores predictivos para la eficacia de la terapia endocrina, pero los resultados son todavía preliminares y actualmente no se pueden extraer conclusiones.

11.8.- Terapeútica adyuvante con quimioterapia + hormonoterapia

FISHER (198) ha publicado los resultados del protocolo B-09 del NSABP. En este ensayo se incluyen pacientes con mastectomía radical y uno o más ganglios axilares positivos. Realiza una randomización, y a un grupo se le administra L-Pam y 5-FU y al otro L-Pam, 5-FU más tamoxifen. Las pacientes fueron estratificadas según la edad y el número de ganglios positivos.

La recurrencia de enfermedad a los 3 años se redujo en las pacientes mayores de 50 años y que tomaban el régimen de tres drogas y además tenían receptores positivos. Este bebeficio era mayor en las que tenían más de 4 ganglios positivos y niveles de receptores elevados tanto de RE como de RPg. En este estudio se concluye que el contenido de RPg en los tumores

es un factor predictivo de la efectividad del tratamiento combinado quimio-hormonoterapia.

El estudio del CASE WESTERN RESERVE donde incluye pacientes con estadio II y en las que se conocía el estado de RE, es un ensayo randomizado con dos brazos, uno de quimioterapia y otro de quimioterapia más tomoxifen.

La tasa de recurrencia en pacientes RE positivas tratadas con la combinación quimio-hormonoterapia fué más baja que en las pacientes RE positivas tratadas con quimioterapia sólo(101).

El grupo LUDWING (199) realiza un ensayo de terapeútica adyuvante en mujeres postmenopaúsicas con cáncer de mama y compara la quimio-hormonoterapia con tratamiento hormona sólo.

Tras un seguimiento de 36 meses la supervivencia libre de enfermedad fué significativamente mayor en las pacientes con el tratamiento combinado que en las que se les administró sólo endocrinoterapia. Cuando analizan los patrones del primer fracaso, se observó que la quimio-hormoterapia reducía las recaídas locales, regionales y a distancia, mientras que la endocrinoterapia disminuía únicamente las recidivas locales y regionales.

Aunque prometedores, los resultados son todavía prematuros para extraer cualquier tipo de conclusión, siendo necesarios nuevos estudios en este sentido para confirmar los

resultados.

12.- RECEPTORES HORMONALES COMO FACTOR PRONOSTICO

La utilidad de las determinaciones de receptores no se limita a la predicción de la respuesta del cáncer de mama a la terapeútica endocrina. Se ha demostrado que la presencia o ausencia de los mismos en el tumor primario es también un factor pronóstico.

Pacientes con RE positivos tienen un mayor intervalo libre de enfermedad y supervivencia que aquellas con tumores que carecen de los mismos.

VALAGUSSA (200) demuestra que pacientes con ganglios negativos y receptores estrogénicos negativos tienen un intervalo libre de enfermedad similar a pacientes con ganglios positivos, sirviendo esto de base para poder seleccionar subgrupos de pacientes con ganglios negativos, que pueden tener una evolución más desfavorable y podrían beneficiarse de una terapeútica adyuvante.

En lo que respecta a los RPg, PICHON (201) ha demostrado que su positividad es un factor de buen pronóstico, aún en los casos que presenten factores desfavorables, tales como ganglios axilares afectos, premenopausia, etc. Estos hallazgos son similares a los observados por POUILLART (202) en el cáncer de mama metástasico.

CLARK (203) igualmente observa que en pacientes con estadio II de cáncer de mama que recibieron terapeútica adyuvante la existencia de RPg fué más importante que la de RE como predictora de una mayor supervivencia libre de enfermedad. Analizando diferentes factores pronósticos, tales como tamaño tumoral, afectación axilar y tratamiento recibido, sólamente el número de ganglios positivos y la presencia de RPg fueron significativos en la predicción de un mayor intervalo libre de enfermedad. No obstante, se requieren largos perfodos de seguimiento para definir mejor la superioridad de los RPg sobre los RE en cuánto a su influencia en el pronóstico de esta enfermedad.

P L A N T E A M I E N T O D E T R A B A J O

PLANEAMIENTO DE TRABAJO

El cáncer de mama es, sin duda alguna, el que con mayor frecuencia padece la mujer. Aproximadamente una de cada 13 contraerá esta enfermedad, que adoptará la forma diseminada metastásica en el 60-70% de los casos.

Para abordar esta fase avanzada de la enfermedad se dispone básicamente de dos tipos de terapeúticas, la quimioterapia y la hormonoterapia.

La hormonodependencia del cáncer de mama se conoce desde 1896 cuando BEATSON (2) observó la regresión de tumores inoperables en pacientes premenopaúsicas, tras realizar la ovariectomía. Posteriormente se utilizaron con el mismo fín la adrenalectomía y hipofisectomía que alcanzaron similares respuestas.

Estos procederes ablativos servían para eliminar las fuentes de hormonas circulantes, las cuáles estimulaban o mantenían el crecimiento de los tumores de mama.

La elección de la terapia endocrina para estas pacientes se realizaba de forma empírica, basados en ciertos criterios clínicos tales como, estado menopaúsico, intérvalo libre de enfermedad, tipo de lesión dominante. Y a pesar del tipo de

terapia endocrina empleada la regresión tumoral tan sólo ocurría en un 20-30% de las pacientes.

Sin embargo, en las dos décadas pasadas, las investigaciones realizadas por FOLCA (10) y JENSEN (11) sobre el modo de acción de las hormonas esteroideas, y la identificación de sustancias citoplásmicas responsables de la retención estrogénica "Receptores hormonales" han permitido comprender y tratar mejor los cánceres de mama.

Los resultados provenientes de la mayoría de laboratorios han mostrado que los cánceres de mama que no contienen receptores citoplásmicos de estrógenos raramente responderán a una terapeútica endocrina.

No obstante, aunque la presencia de receptores estrogénicos es una condición necesaria, ella no siempre es suficiente para obtener una respuesta favorable, ya que el 40% de las pacientes no responden a pesar que el resultado sea positivo.

HORWITZ (75) sugiere que ciertos tumores RE positivos no responden a manipulaciones endocrinas, porque existe un defecto en algún paso distal del mecanismo de acción estrogénica, conduciendo a un crecimiento autónomo. Es necesario confirmar la integridad de la secuencia metabólica que es desencadenada por la unión del estrógeno al receptor. Los receptores de progesterona son un producto final de la acción de los estrógenos a nivel celular. Por tanto la determinación de ambos receptores en un tumor nos dará una visión más amplia del

mecanismo hormonal celular.

Todo ello, sugiere que en los tumores de mama debe ser medido tanto el contenido de RE como de RPg, y estos resultados pueden ayudarnos a individualizar el tratamiento de las pacientes con cáncer de mama.

Con esta finalidad, la primera parte del trabajo ha estado dirigida al estudio de la reproductibilidad metodológica del ensayo de Carbón-Dextrano para la determinación de receptores de estrógeno y progesterona en nuestro laboratorio, y para su cuantificación mediante el método matemático de Scatchard con cinco puntos. Para ello, valoraremos en un tejido homogéneo y rico en ambos receptores, como es el útero de vaca:

- La variabilidad intraensayo en tejido pulverizado y en "pool" de citosol del mismo.
- La variabilidad inter-ensayo en tejido pulverizado y en "pool" de citosol.
- La influencia de la forma de conservación del tejido pulverizado. Congelándolo a 80ºC, o en Nitrógeno líquido (-190ºC).

La metodología anterior exige cantidades suficientes de tejido tumoral que en ocasiones es prácticamente inviable, sobre todo, si proceden de biopsias de metástasis o de tumores pequeños. Por lo cual nos proponemos estudiar la posibilidad de sustituir la sistemática anterior por otra técnica más simple

que consista en utilizar una sóla concentración de hormona marcada. A esta metodología le llamaremos "Monopuntual". Para ello:

- Realizaremos una valoración estadística investigando el coeficiente de correlación entre los dos métodos Monopuntual y Scatchard.

Tras la valoración del método de determinación de receptores y averiguar su reproductibilidad nos proponemos analizar el contenido de RE y RPg en:

- Tumores localmente avanzados que por las características de los mismos, las pacientes reciben un tratamiento de inducción con quimioterapia y luego pueden ser intervenidas quirúrgicamente.
- Lesiones metastásicas de cáncer de mama que sean accesibles para biopsiar.
- Tumores localizados de mama, en los que la primera actitud terapeútica es la mastectomía.

Existen investigadores que han aportado datos sobre la distribución de RE y RPg en cuanto a positividad o negatividad, pero hay pocas publicaciones sobre niveles cuantitativos y relación entre ellos.

Se ha demostrado que los niveles de RE presentes en un tumor son más importantes que la existencia o ausencia de los mismos en cuanto a la obtención de una respuesta a la

terapia endocrina. Además parece ser que existe una relación directa entre los niveles de RE y porcentaje de RPg positivos en un tumor. Por ello:

- Analizamos las relaciones entre nivel de RE y frecuencia de aparición de RPg.

La mayoría de estudios muestran que las mujeres postmenopaúsicas, así como de mayor edad, presentan una incidencia más alta de RE positivos que en premenopaúsicas. pero existen muchas controversias en cual es el factor responsable de este aumento. No obstante, se ha sugerido que la existencia y cantidad de RE y RPg pueden ser regulados en el mismo tejido tumoral, y que factores hormonales pueden influir en el contenido de receptores en el propio tumor. También se ha sugerido que los niveles elevados de progesterona en la fase luteínica del ciclo menstrual juegan un papel importante en cuanto a la menor incidencia de RPg positivos en pacientes intervenidas en esta fase del ciclo.

Por lo cual, nos proponemos analizar en los tumores localizados de mama, la incidencia y nivél de RE y RPg en relación con el:

- Estado menopaúsico.
- Edad de las pacientes.
- Fase del ciclo mentrual en el momento de la mastectomía.

El contenido de receptores en un tumor de mama, puede reflejar diferencias en el huésped o en los mecanismos patogénicos del tumor pudiendo existir relación entre los receptores y aquellos factores que reflejan actividad tumoral en cáncer de mama. Analizamos si factores de riesgo bien establecidos se relacionan con la presencia de receptores en el tumor:

- Tamaño tumoral.
- Número de ganglios.

La causa por la que un cierto número de pacientes con tumores RE positivos no respondan al tratamiento, así como el que ciertos tumores RE negativos sí lo hagan, no está aclarada. Según la experiencia de distintos autores, una explicación a estos hechos estaría en la variabilidad en el contenido celular de receptores en las diversas partes de un mismo tumor, y es por lo que queremos:

- Investigar la incidencia de la variación intratumoral en contenido de receptores de estrógeno en tumores de mama.

Una nueva línea de investigación ha sido añadida a la determinación de receptores. Se ha demostrado que los tumores que no contienen RE recaen más precozmente que los tumores con RE positivos.

Los trabajos de PICHON (201), CLARCK (203) y

FISHER (198) demuestran que los receptores de progesterona son un factor pronóstico independiente del estado menopaúsico, número de ganglios axilares infiltrados y tipo de tratamiento recibido. Además señalan que los RPg introducen un mayor criterio de selección pronóstica que los RE, ya que pueden ser considerados como un marcador de la respuesta de la acción estrogénica, y como tal podrían ser reflejo en un tumor de una mayor diferenciación celular.

Los datos existentes no son concluyentes.

En nuestro estudio nos proponemos analizar:

- El índice de recaídas, en un grupo de pacientes con cáncer de mama estadios I, II y III que recibieron tratamiento adyuvante, y relacionarlas con la presencia de RE y RPg en sus tumores.

M A T E R I A L Y M E T O D O S

MATERIAL Y METODOS.-

1.- MUESTRAS TUMORALES

Este estudio está realizado en una serie de 332 muestras tumorales que proceden de mujeres con neoplasias de mama, diagnosticadas en el Hospital Clínico Universitario de Valencia (HCUV) y en el Hospital General de Valencia (HGV), entre mayo de 1.982 y diciembre de 1.984.

La distribución de las muestras analizadas es:

- 20 carcinomas de mama localmente avanzados ($T_{3b-4}\ N_{O-1-2-3}M_0$) o con características evolutivas (PEV 1-2-3). este grupo de pacientes fueron mastectomizadas tras haber recibido todas ellas tratamiento citostático $\pm$ radioterapia.

  La muestra tumoral para el análisis de receptores se obtuvo de la pieza de mastectomía.

- Metástasis de carcinomas de mama, de diversas localizaciones:

  * 13 ganglios axilares contralaterales y ganglios supraclaviculares homolaterales o

contralaterales.

* 13 lesiones cutáneas.
* 10 recidivas sobre cicatriz mastectomía.
* 3 mama contralateral.
* 1 metástasis cerebral.

La determinación de receptores se hizo biopsiando el lugar de la metástasis que era accesible.

- 267 Carcinomas de mama localizados. Las pacientes de este grupo fueron mastectomizadas, sin haber recibido ningún tipo de tratamiento citostático, humoral ni radioterápico previo. Estas pacientes pertenecen a los estadios I, II y III.

Todas las muestras tumorales fueron divididas, remitiéndose una sección para la determinación de receptores tumorales y el resto de la muestra para estudio histopatológico.

La porción destinada para el estudio de receptores, cuando ésta procedía del Hospital Clínico, se introducía inmediatamente en nitrógeno líquido, procediéndose a su envío al laboratorio de receptores hormonales, donde se almacenaba a -80ºC, hasta el momento de la realización de la técnica.

Las muestras procedentes del Hospital General, se introducían recubiertas de algún material aislante, en un recipiente lleno de hielo, o en nitrógeno líquido y transportadas al laboratorio de receptores del Hospital Clínico, donde se

procesaban de la misma forma que las anteriores.

En el grupo de pacientes con tumores localmente avanzados se realizó el diagnóstico por medio de examen clínico, mamografía y termografía, y se les practicó una punción aspirativa o biopsia para el diagnóstico histológico.

A este grupo de pacientes se les administraron de 3-5 ciclos de quimioterapia de inducción con adriamicina (ADM), vincristina (VCR) 5-fluoruacilo (5-FU) y melfalán, y en dos pacientes se les asoció radioterapia.

En todas las pacientes de este grupo tras el tratamiento de inducción fué posible realizar una mastectomía radical modificada.

Posteriormente, las pacientes siguieron con tratamiento sistemático con la asociación qumioterapia de ADM, 5-FU y CPM, hasta que la dosis de adriamicina total alcanzó los 450 mg/m2. siguiendo posteriormente hasta completar los 12 meses de tratamiento con un esquema de CPM, 5-Fu y metrotrexate (MTX).

A las pacientes con receptores hormonales positivos se les asoció tratamiento hormonal con tamoxifen 20 mg/día, durante 12 meses.

El seguimiento de las pacientes se realizó de la siguiente forma: exploración, hemograma, biología hepática, función renal, Ca, P y CEA cada tres meses los dos primeros años, posteriormente cada 6 meses. Una radiografía de tórax cada 6 meses y gamagrafía osea y mamografía al año. La evidencia de

recaída, cuando fué posible, se confirmó mediante biopsia.

Las pacientes con lesiones metastásicas, recibieron tras la biopsia y confirmación histológica del tumor, tratamiento hormonal, quimioterápico o ambos, según el resultado de la determinación de receptores. Los esquemas terapeúticos aplicados en este grupo de pacientes fueron realizados según la edad y "status performance" de las mismas.

Las pacientes del grupo con tumores primarios que fueron mastectomizadas inicialmente, y cuyo diagnóstico se realizó en el HCUV, se estratificaron según grupos de riesgo con arreglo al TNM (204) para recibir un tratamiento adyuvante sistémico con quimioterapia más menos hormonoterapia.

Las pacientes fueron consideradas premenopaúsicas, si la fecha del último período menstrual era menor o igual a 12 meses y postmenopaúsicas si la última menstruación había tenido lugar hacía más de un año, o si los ovarios habían sido extirpados hacía más de 12 meses.

En pacientes con período menstrual activo en el momento de la mastectomía se anotó la fecha de la última regla antes de la intervención, así como la regularidad de sus ciclos menstruales.

El tamaño tumoral, y el número de ganglios infiltrados se obtuvieron del informe histopatológico.

El tratamiento adyuvante se realizó del siguiente modo:

1.- Las pacientes con tumores de hasta 5 cms. de diámetro y sin ganglios axilares afectos recibieron 3 u 8 ciclos de una combinación de ADM y CPM, según el tamaño tumoral fuese un T_1 ó T_2.

2.- Las pacientes con ganglios axilares infiltrados se subdividieron según el número de los mismos en dos grupos: de 1-3 y más de 3; ambas recibieron 8 ciclos de una combinación de cuatro fármacos ADM, CPM, 5-FU y MTX. En el grupo de más de 3 ganglios la dosis de ADM fue mayor. El MTX se suprimió en ambos grupos de pacientes tras los tres primeros ciclos.

3.- El grupo de pacientes con tumores T_{3b-4}, N_{1-2-3} M_0 pero que fueron mastectomizadas inicialmente, recibieron un tratamiento con ADM, CPM y 5-FU durante 8 ciclos y posteriormente un esquema de CPM, 5-FU y MTX hasta completar los 12 meses de tratamiento.

Cuando los receptores esteroideos fueron positivos, las pacientes recibieron además hormonoterapia con tamoxifen 20 mg/día durante un año.

Si las pacientes presentaban trastornos ECG, o tenían más de 70 años, se les administró un esquema de tratamiento similar al anterior pero sin ADM, la cual se sustituía por MItomicina-C.

Tras el diagnóstico de carcinoma de mama, a todas las pacientes se les relizó el siguiente estudio de extensión:

historia y examen físico, estudio de laboratorio (hemograma, VSG, biología hepática, renal, LDH, CA, P y glucemia, CEA), electrocardiograma, radiografía de torax, gamagrafía ósea, y ecografía hepática.

Antes de las administración de cada ciclo de quimioterapia se realizó exploración física, hemograma y ECG.

Si las cifras de granulocitos eran menores de 2000/cm^3 y/o el contaje de plaquetas menor de 125.000/cm^3 antes del ciclo, se retrasaba una semana la administración del tratamiento y si las cifras se mantenían bajas se disminuía el 25% de la dosis.

El seguimiento de las pacientes se realizó de la misma forma que el de las pacientes con tumores localmente avanzados que recibían quimioterapia previa.

Muestras tumorales mayores de 2 cms.

Con la finalidad de estudiar la variación intratumoral de los niveles de receptores de estrógenos en los tumores de mama, se analizaron 29 tumores mayores de 2 cms de diámetro.

La muestra tumoral destinada al estudio de receptores fué dividida en dos secciones para determinar la posible variabilidad en cuánto a contenido de los R.E. dentro del mismo tumor.

Ninguna de las pacientes había recibido tratamiento previo. Y en este estudio se incluyeron tumores procedentes de

pacientes pre y postmenopaúsicas.

Uteros de vacas.-

Para el estudio de la reproductibilidad de la técnica, así como control positivo en las determinaciones de RE y RPg. se utilizó útero de vaca, porque es un tejido considerado homogéneo y rico en receptores de estrógeno y progesterona.

Se obtuvieron úteros de vacas sacrificadas en el Matadero de Valencia, utilizándolos como muestras en el estudio de la reproductibilidad de la técnica. Además también se usaron como controles positivos en los ensayos de receptores rutinarios.

Este material fué lavado con tampón de homogenización frío para eliminar la sangre que pudiera contener y se cortó en varias piezas que fueron introducidas inmediatamente en nitrógeno líquido y transportadas al HCUV, donde se almacenaron al igual que las muestras problemas en un congelador a -80ºC. hasta el momento de su uso.

2.- REACTIVOS Y MATRIAL DE LABORATORIO

- Agua destilada.
- Albúmina bovina. Sigma.
- Alcohol etílico. Merck.
- Acido clorhídrico, Merck.

- Botella 20 ml.
- Botellas 10 ml.
- Carbón activado, Norit A. Sigma.
- Carbonato sódico. Merck.
- Cloruro sódico, Merck.
- Cubetas.
- Dextrano. Chemical Ltd.
- Dietil-stil-bestrol, Sigma.
- Dihidrotetosterona. Sigma.
- EDTA. Sigma.
- Espátula de acero.
- Estradiol (2,4,6,7 Estradiol 3H) Itisa.
- Frascos líquido de centelleo.
- Glicerol. Sigma.
- Hidróxido sódico, Merck.
- Hielo triturado.
- Martillo.
- matraces aforados.
- Monothioglycerol. Sigma.
- Nitrógeno líquido.
- Pinzas
- Pipetas pasteur.
- Pipetas Gilson.
- Pipetor.
- Placas de petri.

- POPOP. Amersham/Searle
- PPO. Amersham/Searle
- Promegestone (17 -metil 3H) Itisa.
- Promegestone (17 -metil). Itisa.
- reactivo de Folin. Sigma.
- Sulfato cuprico. Merck.
- tartrato Potásico sódico. Sigma.
- termos de acero.
- Tijeras.
- Tolueno. Merck.
- Tris. Sigma.
- Tubos de cristal pyrex
- Tubos plástico de 30 ml.
- Tubos de policarbonato para ultracentrifuga.
- Vasos de precipitado

3.- SOLUCIONES Y TAMPONES

- Solución Tris Buffer (TED)

  1.21 g. Tris.

  0,55 g. EDTA.

  100 ml. glicerol.

  100 µl. monothioglicerol.

  1000 ml. agua destilada.

- Solución Carbón-dextrano.

  10 ml. Tris o,1 M

  0,25 g. Norit A

  0,0025 gr. Dextrano.

  100 ml. agua destilada.

- Líquido de centelleo.

  4 g. PPO.

  50 mg. POPOP

  1000 ml. de Tolueno.

- Solución"A" determinación proteína.

  20 g. CO_3 Na_2

  1000 ml. Na OH O,1 M.

- Solución "B".

  5 gr. SO_4 Cu_5 H_2O

  10 gr. Tartrato potásico sódico.

  1000 ml. agua destilada.

- Reactivo de Folin.

  9 ml. Folin

  9 ml. agua destilada.

4.- APARATOS.

- Agitador
- Centrifuga refrigerada HERAEUS CHRIST, CRYOFUGE G-6

- Congelador -20ºC IGNIS
- Congelador -80ºC KOSKA
- Contador Beta. LKB WALLAC. 1217 RACK BETA
- Espectro-fotómetro SHIMADZU CL-720.
- Homogenizador BRAUN.
- Pulverizador
- Refrigerador a 4º C KELVINATOR.
- Ultracentrífuga refrigerada BECKMAN L8 - 80.
- Vortemixer.

5.- METODOS

La mayoría de los métodos para detectar la actividad del receptor se basan en un mismo principio básico: la incubación del citosol con esteroides radioactivos y la determinación de la radioactividad unida a la proteína receptora.

Varias son las técnicas utilizadas para separar la hormona unida del receptor de la hormona libre, pero en todas ellas existe una fase común que es el aislamiento del citoplasma celular.

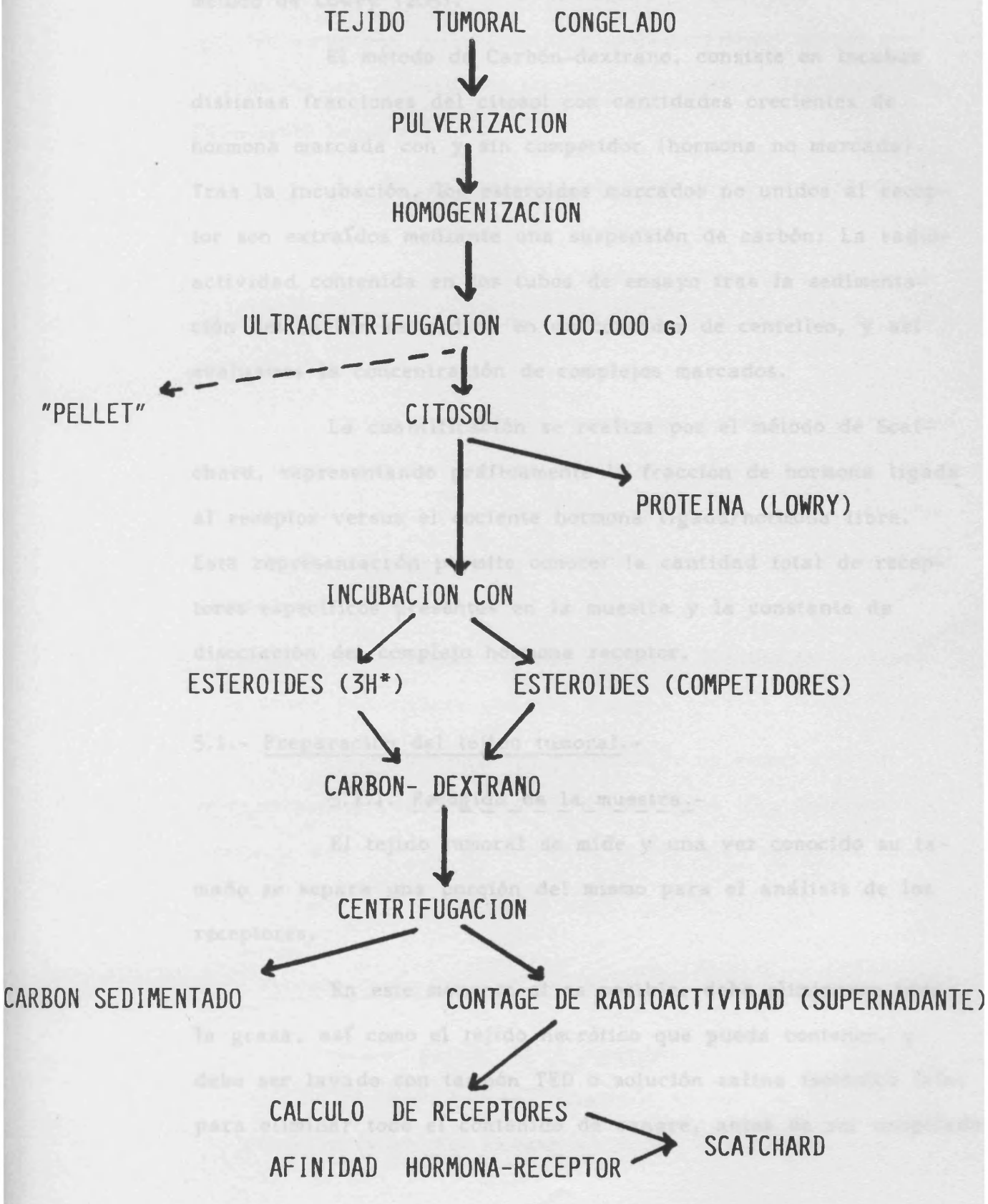
En nuestro estudio la técnica utilizada para la valoración de los niveles de RE y RPg ha sido la de Carbón-Dextrano (85). la secuencia esquemática que se sigue para la realización de la misma, es la que puede verse en el esquema nº 1.

En el citoplasma, los receptores esteroideos, se encuentran en forma soluble, por lo cual el tejido para ser analizado es primero pulverizado, seguido de una homogenización, sometiéndose posteriormente a una centrifugación a alta velocidad, tras la cual el supernadante que obtenemos llamado citosol, es la fuente de los receptores citoplásmicos solubles.

La proteína contenida en el citosol se mide por el

ESQUEMA Nº 1

METODO DE DETERMINACION DE RECEPTORES ESTEROIDEOS



método de Lowry (205).

El método de Carbón-dextrano, consiste en incubar distintas fracciones del citosol con cantidades crecientes de hormona marcada con y sin competidor (hormona no marcada). Tras la incubación, los esteroides marcados no unidos al receptor son extraídos mediante una suspensión de carbón: La radioactividad contenida en los tubos de ensayo tras la sedimentación del carbón es medida en un contador de centelleo, y así evaluamos la concentración de complejos marcados.

La cuantificación se realiza por el método de Scatchard, representando gráficamente la fracción de hormona ligada al receptor versus el cociente hormona ligada/hormona libre. Esta representación permite conocer la cantidad total de receptores específicos presentes en la muestra y la constante de disociación del complejo hormona receptor.

5.1.- Preparación del tejido tumoral.-

5.1.1. Recogida de la muestra.-

El tejido tumoral se mide y una vez conocido su tamaño se separa una porción del mismo para el análisis de los receptores.

En este momento si es posible, debe eliminarse toda la grasa, así como el tejido necrótico que pueda contener, y debe ser lavado con tampón TED o solución salina isotónica fría, para eliminar todo el contenido de sangre, antes de ser congelado.

Inmediatamente se introduce en nitrógeno líquido, ya que los receptores esteroideos son extremadamente lábiles y cuando no son conservados correctamente pueden dar resultados falsamente negativos.

5.1.2. Conservación del tejido hasta el momento de realizar la técnica.

El tejido tumoral, previamente congelado con nitrógeno líquido, es almacenado a -80ºC, hasta el momento del análisis de receptores.

La muestra tumoral puede ser guardada durante uno o dos meses, sin apreciables pérdidas en el contenido de proteínas receptoras. Los receptores de progesterona son más lábiles que los de estrógeno, y pueden degradarse más con el paso del tiempo.

Si se almacenan con nitrógeno líquido su conservación puede prolongarse por más tiempo.

El tejido una vez pulverizado es menos estable, aunque también si se introduce en nitrógeno líquido puede conservarse más tiempo, sin apreciables pérdidas en ambos receptores.

5.2. Procedimientos para la obtención del citosol.-

5.2.1. pesado de la muestra.-

El tejido tumoral congelado se pesa en una balanza de precisión sobre una cámara de petri. Este proceso debe

realizarse rápidamente para evitar su descongelación, así como un exceso de condensación.

Cuando las muestras tumorales son mayores de 0,9 gramos, se cortan y se utiliza una fracción para el ensayo de receptores y el resto se conserva de nuevo congelado a -80ºC o en nitrógeno líquido, según su utilización posterior.

La cantidad de tejido tumoral necesario para el ensayo conjunto de RE y RPg para realizar un Scatchard completo con 5 puntos es de 500 a 600 mgrs.

5.2.2. Pulverización del tejido congelado.-

Todo el material que utilizamos para realizar este proceso debe ser enfriado previamente.

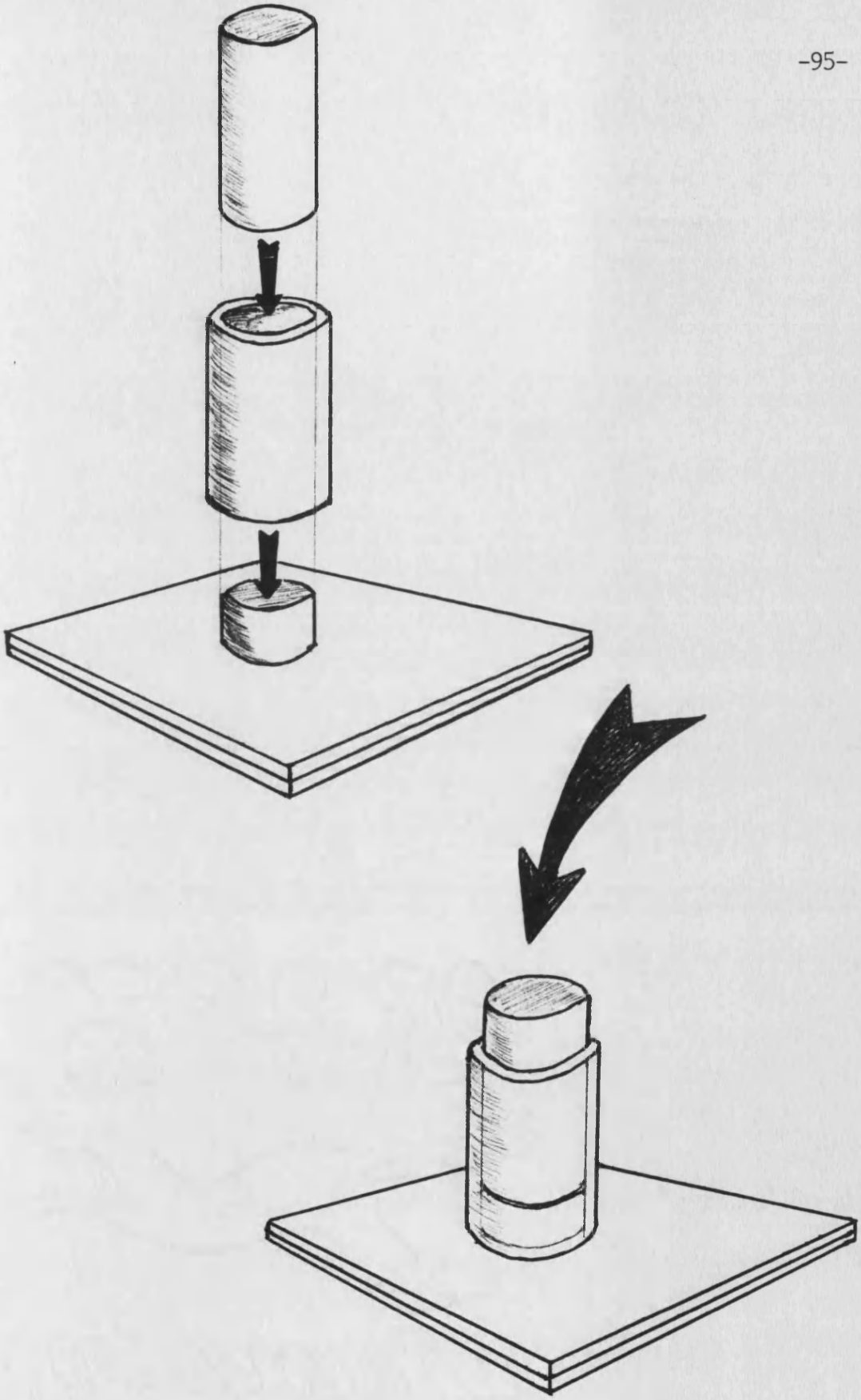
a) El tejido congelado puede ser picado o trozeado en finísimas secciones sobre una cámara de petri, en contacto con un baño de agua con hielo, mediante unas tijeras pequeñas y unas pinzas.

b) Cuando se dispone de un pulverizador el proceso se realiza con mayor rapidez, y con más precisión, pudiéndose mantener todo el sistema a bajas temperaturas con nitrógeno líquido, ya que todo él es de acero inoxidable.

Este pulverizador consta de una base de metacrilato en la que está incrustado un cilindro macizo de acero. Dispone además de un cilindro hueco y un pistón macizo. (Esquema nº2).

El tejido tumoral con nitrógeno líquido se introduce dentro del cilindro hueco sobre la base del cilindro macizo, se

ESQUEMA Nº 2



P U L V E R I Z A D O R

deja caer el pistón y se golpea con un martillo hasta que el tejido queda totalmente pulverizado.

Como el pistón y el cilindro hueco pueden extraerse totalmente, el tejido pulverizado se recupera en su totalidad.

5.2.3. Homogenización.-

El tejido pulverizado es transferido mediante una espátula de acero a una probeta especial "potter" que resiste temperaturas bajas, y se adapta dentro de ella perfectamente una varilla con un émbolo de teflón. Todo el sistema previamente ha sido enfriado en un baño de hielo.

Al tejido pulverizado se añade un volumen de tampón de homogenización TED 5 veces superior al peso del tejido en gramos (1 gr/5ml), es decir, un tumor que pese 0,5 gramos se le añaden 2,5 ml. de tampón.

La suspensión del tejido con el tampón contenida en el "potter", el cual se encuentra sumergido en un recipiente con un baño de hielo, es homogenizado mediante las oscilaciones que produce la varilla con el émbolo de teflón dentro del "potter". Se realizan movimientos vibratorios y circulares durante 15 segundos, unas 3 ó 4 veces con interrupciones entre ellas de 60 segundos, con la finalidad de que el homogenizado no se caliente por la fricción, y como consecuencia los receptores se degraden.

Estos movimientos periódicos y controlados se producen mediante un motor que se encuentra conectado a la varilla con

el émbolo.

A todo este sistema se le denomina "homogenizador". (Esquema nº 3).

5.2.4. Ultracentrifugación y separación del citosol.

El tejido homogenizado se transfiere a los tubos de policarbonato preparados para este fín en frío, y son introducidos en la ultracentrifuga.

La centrifugación se realiza a una velocidad de 100.000 g durante 30 minutos a 2ºC. en un rotor de ángulo fijo.

Tanto la centrífuga como el rotor son enfriados previamente.

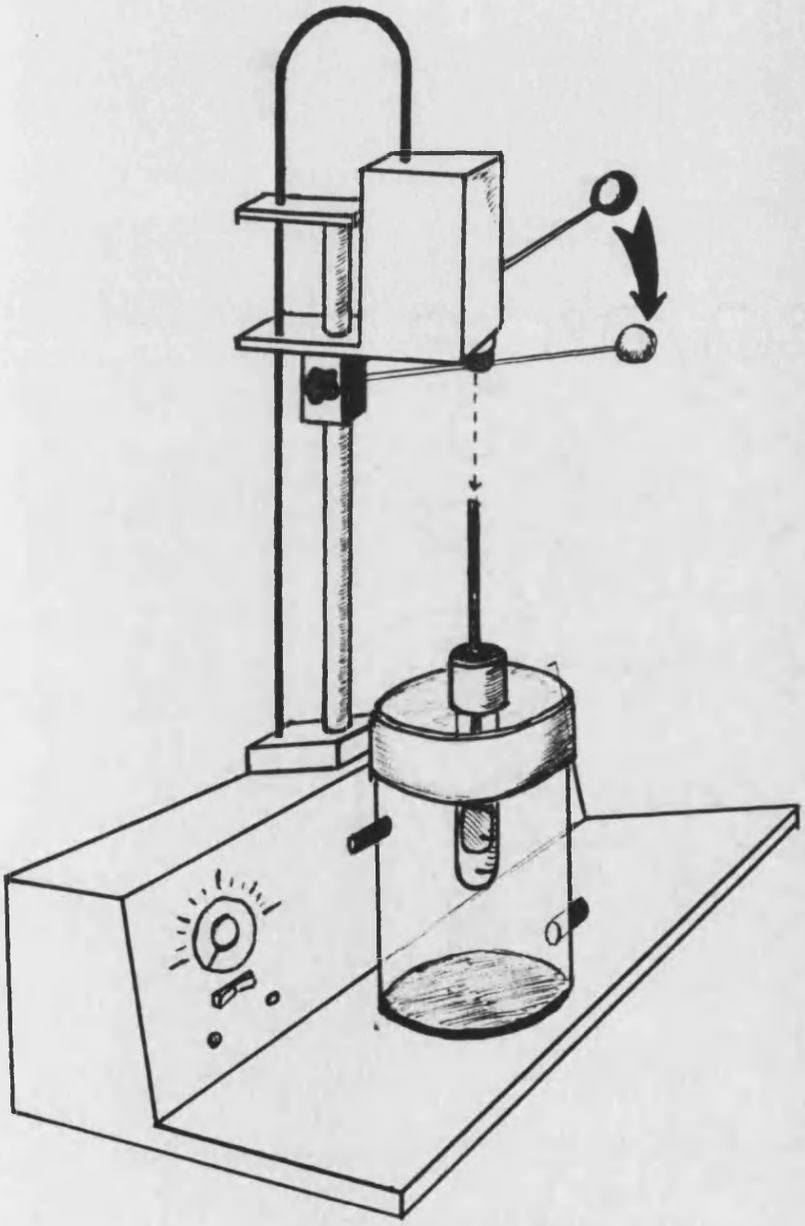
La alta velocidad es necesaria para que los diversos componentes celulares (microsomas, lisosomas, etc.) sedimenten y no produzcan un aumento de las uniones inespecíficas en el ensayo de receptores.

Una vez extraídos de la centrífuga los tubos de policarbonato se introducen rápidamente en agua y hielo, y mediante una pipeta pasteur se separa el sobrenadante (citosol) del material sedimentado ("Pellet").

Todo este proceso se debe realizar en una cámara fría.

Del citosol se separan 100 µl. para determinar la proteína contenida en él, por el método de Lowry, y el resto se utiliza para la dosificación de receptores.

ESQUEMA Nº 3



H O MO G E NE I Z A D O R

5.3. Dosificación de las proteínas por el método de Lowry.

El fundamento de éste método es que las proteínas reaccionan con el reactivo de Folin para dar un complejo coloreado. El color que se forma es debido a la reacción del cobre alcalino con la proteína, y la reducción de fosfomolibdato por la tirosina y el triptófano presentes en la proteína, la intensidad del color depende del número de aminoácidos aromáticos presentes y cambiará según la clase de proteína.

La técnica se realiza de la siguiente forma: A 100 microlitros de la muestra de citosol, se le añaden 500 microlitros de solución alcalina. Lo mezclamos vigorosamente y se deja reposar a temperatura ambiente 10 minutos. Posteriormente se añaden 250 microlitros del reactivo de Folin que habremos diluído previamente, y se mezcla rápidamente. Se deja reposar durante 30 minutos, y se leen en un espectrofotómetro a 660 nm.

Se prepara en cada determinación una curva patrón con albúmina bovina., y a partir de ella se determinan las concentraciones de proteínas del citosol problema.

La concentración de proteína en el citosol debe encontrarse entre 1 y 4 mgrs/ml, si no es así se realiza la dilución correspondiente con tampón TED.

5.4. Determinación de la actividad receptora.-

5.4.1. Incubación del citosol con esteroides marcados.

Se utilizan dos series de tubos por duplicado y en paralelo (20 tubos). Cada serie contiene 100 µl de citosol de la muestra problema.

A una de las series se les añade 100 nl de hormona marcada con tritio a unas concentraciones decrecientes de 6 nM a 0,325 nM de ^{3H}* Estradiol en el caso de los receptores de estrógeno y con una concentración de 10 nM a 0,625 nM de Promegestona ^{3H}* R-5020 para los receptores de progesterona.

Esta serie de tubos se usan para determinar directamente la capacidad total de unión de la muestra, tanto de uniones específicas como inespecíficas.

En la otra serie de tubos se añade la hormona no marcada en concentración 100 veces superior a la de hormona marcada (con la finalidad de saturar los sitios específicos de unión) y luego se añade esta última, con lo cual valoraremos las uniones inespecíficas.

Estas dos series de tubos utilizadas para cada receptor estudiado se incuban durante 16-18 horas de 0º a 4ºC.

5.4.2. Separación de la hormona ligada de la libre mediante carbón dextrano.

La discriminación de la hormona radiactiva ligada de la libre se ha realizado mediante la técnica de adsorción con carbón-dextrano. Este método se basa en la propiedad que el carbón vegetal tiene de adsorber y precipitar la hormona que permanece libre en la solución al término del período de incuba-

ción, ya que el carbón es un adsorbente bastante potente para eliminar la hormona no ligada a las proteínas. El papel del dextrano es limitar la adsorción del complejo hormona-receptor por el carbón.

Para lograr este objetivo, alicuotas de 500 µl de suspensión de carbón-dextrano, se añaden a las dos series de tubos, cuando finaliza la incubación. Posteriormente se agita vigorosamente con un Vortex, y se dejan incubar 30 minutos la serie de tubos correspondientes a los RE y 5 minutos para los RPg.

Todo este proceso se realiza, bien en cámara fría, o bien en un baño de agua y hielo.

Posteriormente se centrifuga a baja velocidad a 2000 g. durante 15 minutos a 2º C., para que el carbón sedimente en los tubos y los complejos hormona receptor queden en el sobrenadante.

5.4.3.- Dosificación de la radioactividad.-

La cantidad de radioactividad en la fracción del citosol, obtenida por la metódica anterior, ha sido determinada con la técnica de centelleo en fase líquida, mediante un contador beta.

Para este fín una alicuota de 500 µl del sobrenadante se separa cuidadosamente, y se introduce en los viales de contaje. Se le añaden 5 ml. de líquido de centelleo.

También se introducen en el contaje dos blancos, que contienen 500 µl de tampón TED con 5 ml. de líquido de centelleo.

De la misma manera también son contadas una alicuota por duplicado de 100 µl de cada concentración de hormona marcada utilizada en el ensayo junto con 5 ml. de líquido de centelleo, para asegurarse que las concentraciones de dosis preparadas son correctas y para realizar posteriormente el cálculo de Scatchard.

Asímismo también se cuenta cinco blancos que contenían 100 µl de hormona marcada y 100 µl de citosol, y tras la separación con carbón-dextrano se introducen en el contador.

Los viales se cuentan a continuación, durante 5 minutos, y el resultado nos viene dado por cuentas por minuto (CPM).

La radioactividad del esteroide unido al receptor específico es estimada, sustrayendo las CPM que nos dan los viales conteniendo el competidor de las CPM de los viales que no lo contienen.

5.5.- Cálculo de los sitios de unión. Método de Scatchard.-

Los datos obtenidos mediante el método de carbón dextrano pueden representarse mediante una curva de saturación típica.

La cinética de la interacción de la hormona con su receptor puede representarse de la forma siguiente:

$$[R] + [H] \rightleftharpoons RH$$

A bajas concentraciones de hormona, la velocidad de la interacción es proporcional a la concentración de receptor,

y a medida que aumenta la concentración de hormona, la velocidad de formación del complejo hormona-receptor disminuye, hasta alcanzar el equilibrio, permaneciendo constante e independiente de la concentración de hormona añadida.

En este momento, el proceso viene regido por la constante de disociación:

$$Kd = \frac{1}{K_a} = \frac{[H]\,[R]}{[R\,H]}$$

Por lo tanto, el proceso de interacción hormona receptor viene definido por su Kd y por el número total de moléculas de hormona a la que se liga.

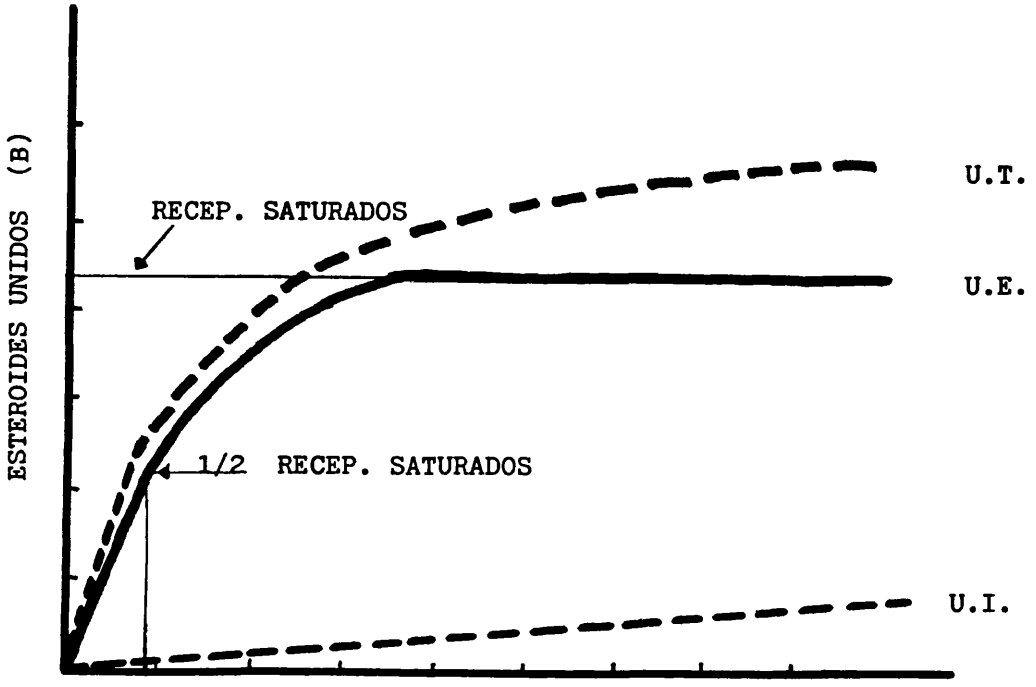
Por lo cual, para su cuantificación, se incuba, como hemos visto, una cantidad determinada de citosol con otras crecientes de hormona marcada; cuando se alcanza el equilibrio se determina la hormona libre y la ligada al receptor.

Esto es así, desde un punto de vista teórico, ya que la cantidad de hormona ligada es la suma de la unida al receptor (uniones específicas) y de la unida otras proteínas (uniones inespecíficas).

Esto se obvia realizando el ensayo paralelo con hormona marcada y un exceso de hormona no marcada, que nos dá como resultado las uniones inespecíficas, la diferencia entre estos dos ensayos aportará el número de uniones específicas al receptor. Y así se representa en Figura nº2. En abcisas tenemos la

F I G U R A Nº 2

C U R V A S D E S A T U R A C I O N



cantidad de hormona total añadida, que llamaremos (F) y en ordenadas la cantidad de hormona ligada, que llamaremos (B).

Con ello, vemos que las uniones inespecíficas están representadas por una línea recta, lo que traduce el aumento progresivo de las mismas en función de la cantidad de hormona presente. Mientras que las uniones específicas receptor-hormona, vienen limitadas por un nivel de saturación.

No siempre las curvas experimentales de saturación resultan tan claras. En algunos casos puede ser difícil el cálculo exacto del númro total de uniones presentes en una muestra determinada. Por ello, resulta de gran utilidad el hacer una transformación matemática según el modelo de Scatchard en la que figurando en abcisas la cantidad de hormona ligada y en ordenadas el cociente B/F se obtiene una recta.

El método de Scatchard se apoya en la siguiente base físico química:

La interacción entre una hormona y su receptor puede ser descrita por el equilibrio $R + H \rightleftharpoons RH$, como hemos visto anteriormente.

F = Hormona libre

B = Receptores ocupados

RV = receptores vacíos.

Y entonces tendremos que $B \rightleftharpoons Rv + F$

La concentración del esteroide unido al receptor puede derivarse de la ecuación de la ley de acción de masas:

$$Kd = \frac{[H]\,[R]}{[HR]} = \frac{1}{K_a} \qquad Kd = \frac{[F]\,[Rv]}{[B]}$$

$$\text{Si } [Rv] = [B] \text{ ======= } Kd = [F]$$

Luego la Kd es la concentración de hormona libre, a la que un 50% de los receptores se encuentran ocupados por la hormona.

$$Ka = \frac{1}{Kd} = \frac{[B]}{[F]\,[Rv]} \rightarrow \frac{[B]}{[F]} = Ka\,[Rv]$$

$$[Rt] = [B] + [Rv] \longrightarrow [Rv] = [RT] - [B]$$

$$\frac{[B]}{[F]} = K_a\left([Rt] - [B]\right) = K_a\,[Rt] - [K_a]\,B$$

$$\frac{[B]}{[F]} = \underbrace{Ka\,[Rt]}_{\text{cte.}} - \underbrace{K_a[B]}_{\text{pendiente}}$$

Lo que nos dá una ecuación lineal de la forma:

$$y = -a\,x + b$$

Si $y = 0$

$$0 = K_a[Rt] - K_a[B]$$

$$[Rt] = [B]$$

$$\text{Pendiente} = K_a = \frac{y}{x} \text{ ===== } K_a = \frac{B/F}{B}$$

$$Kd = \frac{1}{K_a} = \frac{B}{B/F}$$

$$Kd = \frac{B}{B/F}$$

Una línea recta indica la presencia de sólamente un componente de unión, la constante de disociación de la reacción de unión Kd es medida por la inversa de la pendiente de la recta. El valor de la Kd es del orden de 10^{-10} a 10^{-11} nM/1 para los RE y de 10^{-9} a 10^{-10} para los RPg y por tanto indican la presencia de receptor específico. La intersección de la recta con el eje de abcisas nos dará el numero total de sitios de unión.

Por tanto éste método de Scatchard es cuantitativo porque nos permite conocer la capacidad máxima específica de unión del receptor a su hormona correspondiente. Y además nos indica la afinidad de la unión que viene dada por la Kd.

En nuestro estudio realizamos los cálculos de la siguiente forma:

1.- Obtención de la medida de todos los duplicados de las diversas concentraciones, menos los blancos.

2.- El valor anterior es multiplicado por un factor de dilución para obtener el número total de c.p.m. de cada muestra. En nuestro ensayo este factor de dilución es 1.4.

3.- Se obtiene la diferencia entre las C.P.M. de las uniones totales menos las inespecíficas, el resultado serán las C.P.M. de las uniones específicas. (B).

4.- Convertimos las cuentas por minutos que nos proporciona el contador de centelleo en picomoles/100 µl. de solución incubada, para ello se dividen los valores de cada

muestra por los c.p.m. que nos da 1 picomol de esteroide marcado (previamente averiguado).

Los valores en CPM las diferentes concentraciones de hormonas utilizadas en el ensayo también son convertidas en picomoles de la misma forma que los anteriores.

5.- El esteroide libre (F) se calcula sustrayendo el esteroide ligado (B) del total de hormona esteroidea introducida. A partir de éstos datos se puede hallar fácilmente el coeficiente B/F.

En nuestro estudio la obtención de la recta la realizamos a partir de cinco puntos que nos proporcionan las cinco concentraciones de hormona por duplicado.

Representa la gráfica de Scatchard, la capacidad de unión del citosol (concentración de receptor) es medida por el valor que nos dá la intersección de la recta con la línea de abcisas.

Este valor nos lo dá en picomoles/1oo nl. que convertiremos en fentomoles/mg. de proteína citosólica, multiplicando por 10^4 y dividiendo por la cantidad de proteína presente en 1 ml. de citosol.

5.5.1. Automatización de los datos.

Este método para la determinación de los receptores supone el análisis de una serie importante de datos numéricos que resultan laboriosos en la rutina de laboratorio.

Por ello, hemos realizado un tratamiento automatizado

de los datos que permite la obtención de los resultados de una forma rápida y más exacta.

Partimos de tres grupos de datos que corresponden a las actividades en C.P.M. de las cinco diluciones seriadas de:

- Hormona ligada de forma no específica.
- Hormona total ligada a la muestra.
- cantidad de hormona total añadida.

De ellos se obtienen las siguientes series de valores:

- Cantidad de hormona ligada de forma específica al receptor en pmoles/100 µl (B).
- Cociente de hormona ligada/hormona libre (B/F).

El programa dibuja a continuación la gráfica de Scatchard y calcula directamente el número de receptores de la muestra y la constante de disociación del complejo hormona-receptor. Así como el factor de regresión de la recta, (Figura nº 3).

5.6.- Método Monopuntual.-

La metodología anterior presenta dificultades en ocasiones por la exigencia de cantidades suficientes de tejido tumoral, que a veces resulta practicamente inviable.

Para resolver la problemática reseñada, nos hemos valido de un método más simplificado que consiste en utilizar nada más que un solo punto correspondiente a la concentración más elevada de hormona. Previamente contrastamos la validez de

CALCULO AUTOMATIZADO DE LOS RECEPTORES

FECHA : 3 -MAYO- 84
PACIENTE :V.M.B.-RECEP. ESTROGENOS
HC
NUMERO DE ENSAYO : 252

Picomoles = 126500

U.UNESP.	V1	V2	VM	1.41
	52	50	51.0	71.91
	49	51	50.0	70.50
	98	94	96.0	135.36
	148	146	147.0	207.27
	212	210	211.0	297.51

U.TOTALES	V1	V2	VM	1.41	C-T	B	F	B/F
	280	296	288.0	406.08	334.17	.00264	.02588	.10207
	495	502	499.0	703.59	633.09	.00500	.05101	.09812
	878	866	872.0	1229.52	1074.16	.00865	.10474	.08258
	1369	1376	1335.0	1882.35	1676.08	.01324	.21591	.06133
	1760	1792	1776.0	2504.16	2206.65	.01744	.43355	.04023

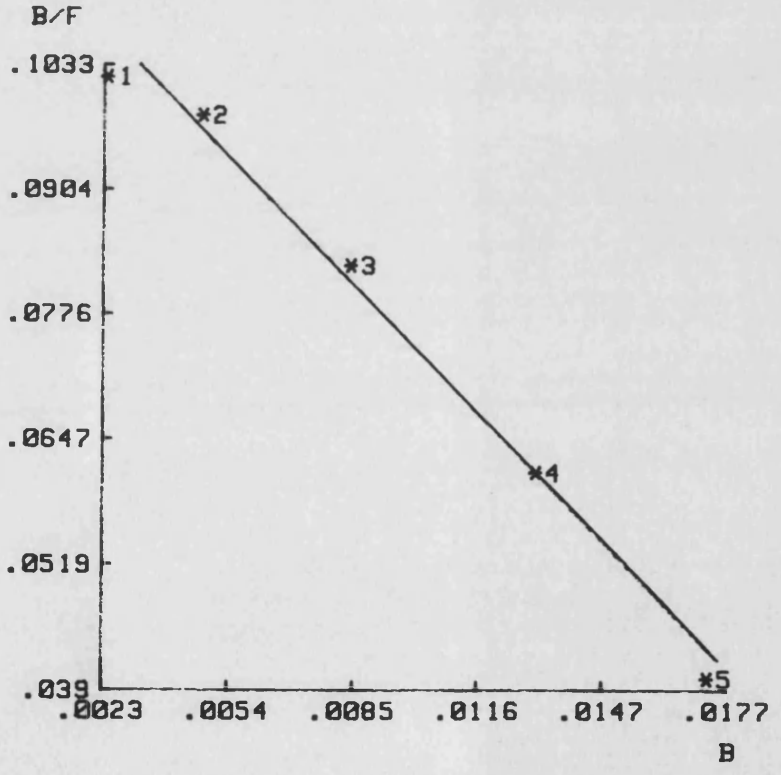
ESTEROIDE	V1	V2	V3	V4	VM	F
	3706	3587	3543	3587	3608.00	.028522
	7371	7202	6850	6919	7085.50	.056012
	14206	14932	14067	14092	14344.25	.113393
	29598	28532	29030	28792	28988.00	.229154
	58553	58742	56179	54730	57051.00	.450995

EMPLEANDO LOS PUNTOS 1 2 3 4 5

Y =-4.29177825149 X + .117193065346
r =-.994122858759
Kd. =-1.16501825281E-09 M
B = 27.3064120462 fm/100 ul citosol
Proteina = 2
Dilucion = 1
Num. de uniones / proteina = 136.532060231 fm/mg
Volumen = 4 ml
Peso del tumor = .5 gr
Num. uniones/tumor = 1365.32060231 fm/gr

F I G U R A Nº 3

G R A F I C A DE S C A T C H A R D



V.M.B.-RECEP. ESTROGENOS

esta técnica comparándola con la metodología anterior.

La cuantificación de los receptores por este método se realiza:

1.- Media de los duplicados de las muestras, menos los blancos.

2.- El valor anterior es multiplicado por un factor - de dilución 1,4, igual que en el método anterior.

3.- Hallamos la diferencia entre CPM totales menos - CPM inespecíficos, que nos dará los CPM de las - uniones específicas.

4.- Se transforman los CPM en picomoles igual que en en el método anterior y así tendremos las uniones específicas en picomoles/100 µl. Se multiplica por 10^4 y lo dividiremos por el valor de la proteína y nos dará las uniones específicas en fentomo-- moles/mg. de proteína.

5.7.- Níveles de positividad y negatividad de RE y RPg.

Siendo la sensibilidad de la técnica de carbón-dextrano de 1 fmol/mg. de proteína, se consideran valores positivos en el ensayo tanto para los RE como para los RPg aquellos que sean $\geq$ 10 fmoles/mg. de proteína citosólica. Los valores menores de 2 fmoles/mg. se consideran negativos, y aquellos valores comprendidos entre 3-9 fmoles/mg. de proteína se consideran "border-line".

En el análisis de los datos consideraremos receptor positivo sólamente cuando sean $\geq$ 10 fmoles/mg. de proteína.

Se acepta como indicativo de la presencia de receptores específicos un valor de la Kd de 10^{-10} a 10^{-11} M. para los RE y de 10^{-9} a 10^{-10} para los RPg.

5.8.- Método Estadístico.

5.8.1.- Comparación de dos varianzas.

Utilizando dos muestras independientes, la primera de tamaño n_1 y la segunda n_2, se obtienen las varianzas estimadas S_1^2 y S_2^2. Bajo la hipótesis de igualdad de varianzas, el estadístico $F = S_1^2 / S_2^2$ sigue una distribución - - - - $F (n_1 - 1, n_2 - 1)$. Si $F \geq F_{1-\alpha}$ se rechaza la hipótesis y las varianzas se consideran diferentes al nível de significación α. En caso contrario la hipótesis no puede ser rechazada y por tanto no se puede concluir que las varianzas sean -- distintas.

5.8.2.- Correlación y regresión.

El análisis de correlación estudia la asociación lineal entre dos variables cuantitativas, X e Y. Por su parte, la regresión trata de explicar la variación de la "variable respuesta" Y, a través de la variación de la "variable predictora"X.

Para estudiar la asociación lineal se obtiene el coe-

ficente de correlación, ρ , que toma valores entre -1 y 1. Un valor de ρ , distinto de cero significa que existe asociación lineal entre las variables, siendo ésta mejor cuanto mayor es el valor absoluto de ρ ; por tanto $|\rho| = 1$ indica asocia-- ción líneal perfecta. Un coeficiente de correlación positivo implica que un incremento en los valores de X lleva consiguo un incremento en los correspondientes valores de Y, en cambio si ρ es negativo los valores mayores de Y corresponden a los menores valores de X y viceversa.

El análisis de regresión consiste en obtener el valor esperado de Y para cada valor de X mediante la ecuación de regresión $y = a + bx$.

Para la realización de ambos análisis se dispone de un conjunto de observaciones de ambas variables sobre n individuos, $[(x_1, y_1), (x_2, y_2), \ldots\ldots, (x_n, y_n)]$, a partir de - los cuales se obtiene: 1º) El estimador del coeficiente de correlación

$$r = \frac{\sum_{i=1}^{n} (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^{n} (x_i - \bar{x})^2 \left(\sum_{i=1}^{n} (y_i - \bar{y})^2\right)}}$$

que bajo la hipótesis de no asociación lineal ($\rho = 0$) sigue una distribución t de Student con n-2 grados de libertad; si el valor r observado es superior al percentil de orden $1 - \alpha/2$ de esa distribución (o inferior al percentil de orden $\alpha/2$), es signifi- cativo y se puede concluir que existe asociación lineal a nível

de significación α .

2º) Los estimadores $\hat{a} = \bar{y} - \hat{b}\ \bar{x}$,

$$\hat{b} = \frac{\sum_{i=1}^{n} (x_i - \bar{x})\ (y_i - \bar{y})}{\sum_{i=1}^{n} (x_i - \bar{x})^2}$$

que proporcionan la ecuación de regresión estimada para un valor x_i observado: $\hat{y}_i = \hat{a} + \hat{b}\ x_i$.

Cuando los valores de una variable son obtenidos por dos procedimientos distintos, cuya equivalencia se desea comprobar, se realiza un análisis de regresión y correlación sobre los valores de dicha variable obtenidos para n individuos con el primer procedimiento (X), y los valores observados para esos mismos n individuos con el segundo procedimiento (Y). Se puede así evaluar la exactitud y confianza de los valores obtenidos por un procedimiento X, suponiendo que los obtenidos mediante el otro Y, son los correctos.

5.8.3.- Comparación de medias.

Esta técnica se utiliza para comprobar si los valores medios de dos poblaciones son distintos. Para ello, se toma una muestra, lo bastante grande de cada población, la primera de tamaño n_1 y la segunda de tamaño n_2, suponiendo que cada mues

tra procede de una distribución $N(\mu_i, \sigma_i^2)$. Se obtienen las medias y varianzas estimadas, $\bar{x}_1$, $\bar{x}_2$, s_1^2 , s_2^2 , elegida $_1$ como la mayor de las medias, se calcula:

$$d = (\bar{x}_1 - \bar{x}_2) \Big/ \sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}$$

Bajo la hipótesis de igualdad de medias, el estadístico "d" se distribuye de acuerdo con la Normal tipificada N(0,1). Si el valor "d" obtenido es superior al percentil de orden $1 - \alpha/2$ de la distribución N(0,1), el resultado se considera significativo por lo que se rechaza la hipótesis establecida, concluyéndose que las medias son distintas con nivel de significación α. En caso contrario no se puede concluir que las medias sean distintas con ese nivel de significación.

5.8.4.- Tablas de contingencia.

Para estudiar la asociación entre pares de variables categóricas (o categorizadas si son cuantitativas) se han utilizado tablas de contingencia o de frecuencias.

En ellas las filas van niveladas por las "K" categorias de una variable y las columnas por las "M "categorías de la otra. El valor f_{ij} de la celda (i,j) representa la frecuencia -- con que han aparecido simultáneamente la categoría i de la variable fila y la categoría j de la variable columna.

Bajo la hipótesis de independencia (no hay asociación entre las variables), el valor esperado de la frecuencia de la - celda (i,j) seria e_{ij} = fio . foj/foo, siendo: f_{io} la suma de las frecuencias de las celdas de la columna j y f_{oo} la suma de todas las frecuencias de la tabla. Entonces el estadístico:

$$X^2 = \sum_{ij} \frac{(e_{ij} - f_{ij})^2}{e_{ij}}$$

se distribuye aproximadamente como una Chi-cuadrado con - - - $[(K-1) \times (M-1)]$ grados de libertad. Si el valor observado de X^2 supera al percentil de orden $1-\alpha$ de esa distribución el resultado es significativo y se rechaza la hipótesis de independencia concluyéndose que existe asociación entre las variables al -- nível de significación α . En caso contrario la independencia no se puede rechazar a ese nivel de significación.

R E S U L T A D O S

RESULTADOS.

Para el análisis de receptores citoplásmicos de estrógeno y progesterona, hemos utilizado el método bioquímico de Carbón-Dextrano, basados en que es una técnica que ha demostrado su reproductibilidad, en multitud de ensayos, además de ser sensible, exacta y varias muestras pueden ser procesadas al mismo tiempo.

Se ha utilizado el análisis de Scatchard para conocer la afinidad del complejo hormona-receptor.

1.- REPRODUCTIBILIDAD DEL METODO.

Para que un ensayo sea utilizado en la rutina clínica de un laboratorio, su reproductibilidad debe ser claramente establecida.

Se investigó la reproductibilidad de las medidas del receptor de estrógeno y progesterona, utilizando la técnica de Carbón-Dextrano en un tejido considerado homogéneo y rico en receptores, como es el útero de vaca.

Se midieron las variaciones en el contenido de receptor en el mismo ensayo,teniendo como fuente el mismo tejido. Así mismo para investigar los factores que pueden contribuir a las fluctuaciones en el ensayo, se realizaron medidas simultáneas en un mismo citosol.

También se realizaron ensayos en diferentes días para medir las variaciones en cuanto a contenido de receptores en un mismo tejido y en un mismo citosol con el paso del tiempo.

1.1. Variabilidad intraensayo

Se analizó el coeficiente de variación intraensayo de la técnica utilizada para la determinación de RE y RPg; para ello se obtuvieron 12 alícuotas de un mismo lote de tejido pulverizado de útero de vaca, y 12 alícuotas de un mismo citosol, obtenido tras la pulverización, homogeneización y ultracentrifugación de una misma muestra de útero de vaca.

Este doble control nos permite analizar la influencia de la homogeneización en la variación de los resultados.

1.1.1. Tejido pulverizado

Tomamos las 12 alícuotas de un mismo lote de tejido pulverizado de útero de vaca, realizando la técnica simutáneamente. Las muestras se homogeneizaron separadamente el mismo día y tras la ultracentrifugación se obtuvieron 12 fracciones de

citosol. En cad una de ellas se analizó la cantidad de RE y RPg, así como la constante de disociación Kd y el contenido de proteínas.

El coeficiente de variación intraensayo encontrado fue de un 11% para los R.E. y de un 12% para los R.Pg.

El valor medio encontrado para la Kd fué de 3,8 $\pm$ 0,5 x 10^{-10}, con un coeficiente de variación del 13% para los RE y para los RPg la media de la Kd encontrada fué de 5,1$\pm$ 0,8x10^{-10} y un coeficiente de variación del 15,6%.

El coeficiente de variación en los valores de la proteína fué de un 10%.

1.1.2. Citosol

Para valorar la influencia de la homogeneización, se analizó la variabilidad intraensayo en 12 alícuotas de una misma fracción de citosol, con los siguientes resultados:

Coeficiente de variabilidad para los RE un 6% y para los RPg de un 8%. La Kd de los RE varió en un 10% y la de RPg fué de un 11%. La variación de la medida de la proteína fué de un 8%.

Cuando realizamos un análisis de varianzas, comparando los resultados intra-ensayo con tejido pulverizado y citosol, encontramos que existe una diferencia significativa, en cuánto a los RE ($p < 0,05$), lo que nos hace pensar que la homogeneización

constituye un paso importante en el ensayo de receptores, y que puede contribuir de una manera significativa en el coeficiente de variación que se obtiene en el mismo. (Tabla 1).

1.2. Variabilidad interensayo

Se estudió la variabilidad interensayo de la técnica, así como la influencia con el paso del tiempo, en cuánto a contenido de receptores en un mismo tejido y en un mismo citosol, con la misma sistemática utilizada anteriormente, pero en días diferentes.

1.2.1. Tejido pulverizado

Determinamos los valores de los RE, RPg, Kd y contenido de proteínas citosólicas en 10 muestras de un mismo lote de tejido pulverizado, pero en distintos días. El tiempo máximo transcurrido entre la primera y última determinación fué de 60 días. Durante este tiempo las muestras se conservaron congeladas a -80ºC.

El coeficiente de variación interensayo para las diferentes determinaciones fué de un 20% para los RE y de un 22% para los RPg.

La variación de la Kd fué de un 28% para los RE y de un 36% para los RPg.

La variación de la proteína fué de un 15%.

T A B L A Nº 1

VARIABILIDAD INTRAENSAYO EN EL CONTENIDO DE RE Y RPg

	R.E. (Fmol/mg)	R.Pg. (Fmol/mg)
TEJIDO PULVERIZADO	120 ± 13,2° (11,1%)*	202 ± 24,2 (12,0%)
N = 12		
"POOL" DE CITOSOL	96 ± 5,7 (6,0%)	190 ± 15,2 (8%)
N = 12	P < 0,05	P > 0,05

° = Media ± desviación standard

* = Coeficiente de variación

1.2.2. Citosol

Se analizó la variación inter-ensayo tras la determinación de los RE, RPg y Kd y contenido de proteína en 6 fracciones de un mismo citosol conservado a -80º C. El tiempo transcurrido entre las diferentes determinaciones fué de 10 días.

Se obtuvo un coeficiente de variación del 9% para los RE y de un 11% en la medida de los RPg.

La Kd tuvo una variación del 28% para los RE y de un 36% para los RPg. La cuantificación de la proteína tuvo un coeficiente de variación entre los diferentes ensayos de un 11%.

1.3. Comparación de los resultados intra-ensayo e inter-ensayo

Cuando comparamos las varianzas en cuanto a los resultados intra e inter-ensayo en tejido pulverizado y en citosol, no se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) tanto para los RE como para los RPg, tal y como se observa en la tabla nº (2). Por lo que comprobamos que el paso del tiempo no ejercía una influencia importante en cuanto al coeficiente de variación encontrado.

1.4. Variación según conservación del tejido pulverizado

Para investigar la variabilidad de las muestras según que su conservación fuese a -80ºC o a -190ºC (con nitrógeno líquido), se realizó un estudio con tejido pulverizado con-

T A B L A N° 2

VARIABILIDAD INTRAENSAYO "VERSUS" INTERENSAYO EN EL CONTENIDO DE RE Y RPg

	R.E. (Fmol/mg)	R.Pg. (Fmol/mg)
TEJIDO PULVERIZADO		
1. INTRAENSAYO N = 12	120 ± 13,2° (11,1%)*	202 ± 24,2 (12,0%)
2. INTERENSAYO N = 10	73 ± 15,6 (20,0%)	150 ± 33,0 (22,0%)
	P > 0,05	
"POOL" DE CITOSOL		
1. INTRAENSAYO N = 12	96 ± 5,7 (6,0%)	190 ± 15,2 (8%)
2. INTERENSAYO N = 6	108 ± 9,6 (9,0%)	220 ± 24,2 (11%)
	P > 0,05	

° = Media ± desviación standard

* = Coeficiente de variación

servado con nitrógeno líquido y tejido pulverizado almacenado en congelador a -80ºC.

El tiempo transcurrido para ambos tejidos pulverizados entre las diferentes determinaciones fué de 60 días.

Los resultados obtenidos para el tejido congelado a -80ºC son los reseñados en el apartado 1.2.1. de este capítulo.

Las variaciones que encontramos para el tejido conservado con nitrógeno líquido, tras realizar seis determinaciones en días diferentes fueron: Coeficiente de variación para los RE de un 16% y para los RPg de un 17%.

La variación de la Kd fué de un 20% para los RE y de un 31% para los RPg.

La variación de la proteína fué de un 12%.

Comparando ambos resultados según su conservación, se concluye que no existe significación estadística entre sus varianzas ($p > 0,05$) tal y como se muestra en la tabla 3.

2.- ENSAYO MONOPUNTUAL.

Para poder determinar los receptores en muestras pequeñas, procedentes de biopsias de tejido metastático, en donde no es posible realizar la metodología completa con un Scatchard típico con cinco puntos, hemos estudiado la posibilidad de sustituir la sistemática habitual por otra técnica más simple que

T A B L A N° 3

VARIACION EN EL CONTENIDO DE RE Y RPg. SEGUN LA CONSERVACION DEL TEJIDO PULVERIZADO.

	R.E.	R.Pg.
-80ºC N = 10	78 ± 15,6° (20%)*	150 ± 33,0 (22,0%)
-190ºC N = 6	162 ± 25,9 (16%)	230 ± 39,1 (17,0%)
	P > 0,05	

° = Media ± desviación standard

* = Coeficiente de variación

consiste en utilizar nada más que un sólo punto correspondiente a las concentraciones más elevadas de hormona.

Para estudiar la validez de la técnica de un sólo punto que llamamos "Monopuntual", y analizar si la podemos utilizar con un rango de confianza aceptable para el análisis de muestras pequeñas, hemos calculado los RE en 64 casos, haciendo un Scatchard tipo de 5 puntos, y la técnica Monopuntual para la concentración de 6nM de E_2:
Lo mismo hacemos con 64 casos de receptores de progesterona y la concentración de 10 nM de R-5020.

El análisis estadístico trata de aclarar la relación entre los dos métodos.

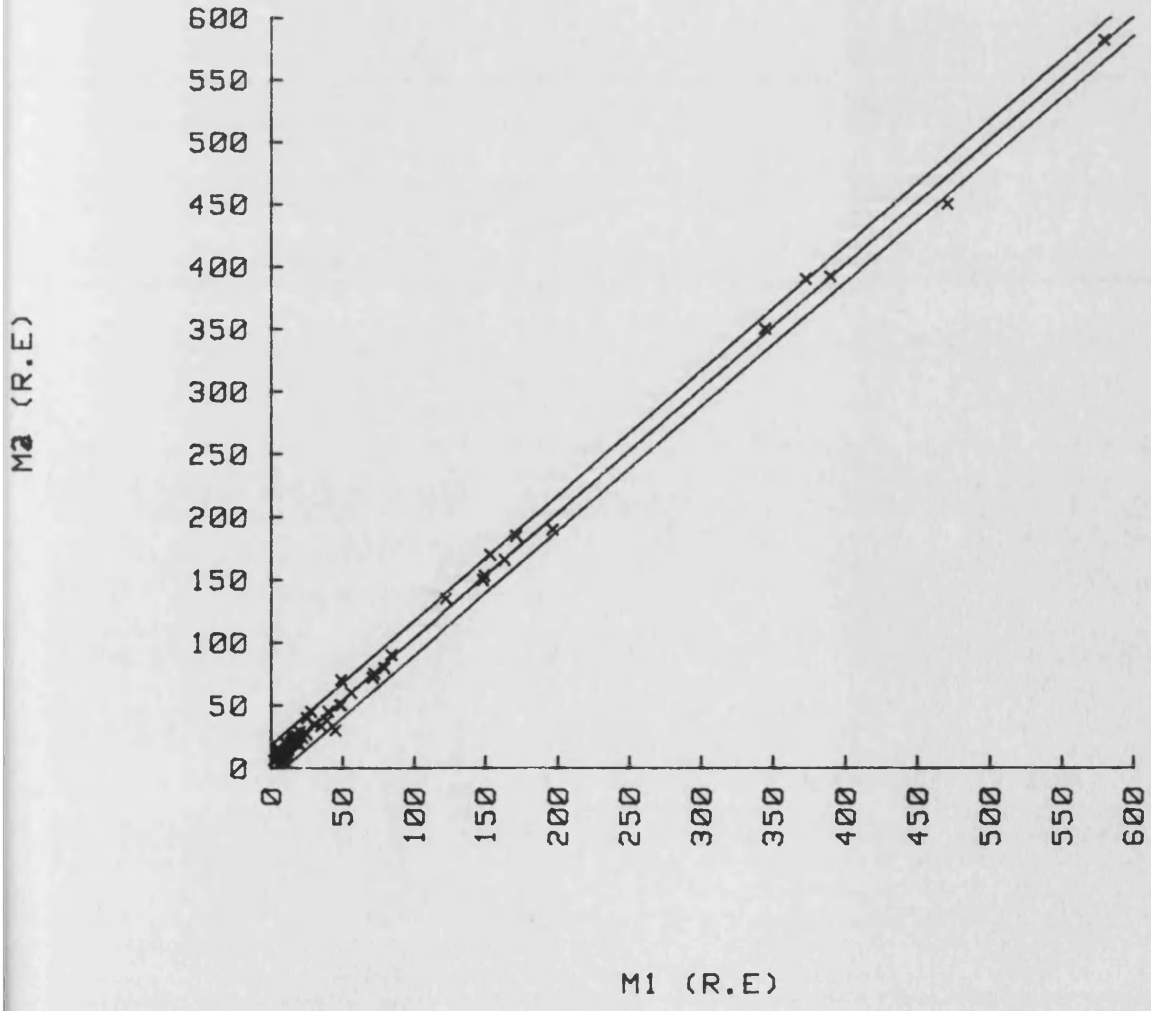
Queríamos saber si existía una correlación del M_1 con el M_2, y si globalmente a un aumento o disminución de los valores en el método 1 correspondía un aumento o disminución de los mismos con el método 2.

Los resultados fueron: Para los receptores de estrógenos el coeficiente de correlación M_1-M_2 fué de r=0,998, el cual mide la intensidad (muy alta) y el sentido (positivo) de la relación lineal entre los dos métodos (figura 4.).

Para los receptors de progesterona: el análisis estadístico realizado con los datos es idéntico al anterior. Buscamos la correlación entre los métosos 1 y 2. El coeficiente de correlación encontrado fué de 0,988 indicando también una asociación

F I G U R A Nº 4

COMPARACION METODO SCATCHARD versus MONOPUNTUAL



positiva entre ambos métodos. (Fig 5).

Dado el elevado valor del coeficiente de correlación y que el error típico de la predicción es pequeño, en propora los valores de las variables, se puede considerar que es correcto utilizar el método Monopuntual, cuando nos veamos precisados a ello. Hay que señalar que el error de la predicción es ligeramente superior en el caso de los RPg, pero también dentro de unos límites aceptables.

3.- DETERMINACION DE RECEPTORES DE ESTROGENO Y PROGESTERONA EN TUMORES DE MAMA.

Durante un período de estudio de 32 meses se han analizado 332 muestras tumorales para determinar el contenido de RE y 327 para el contenido de RPg. Todas las muestras procedían de mujeres con neoplasias de mama en diferentes estadios clínicos.

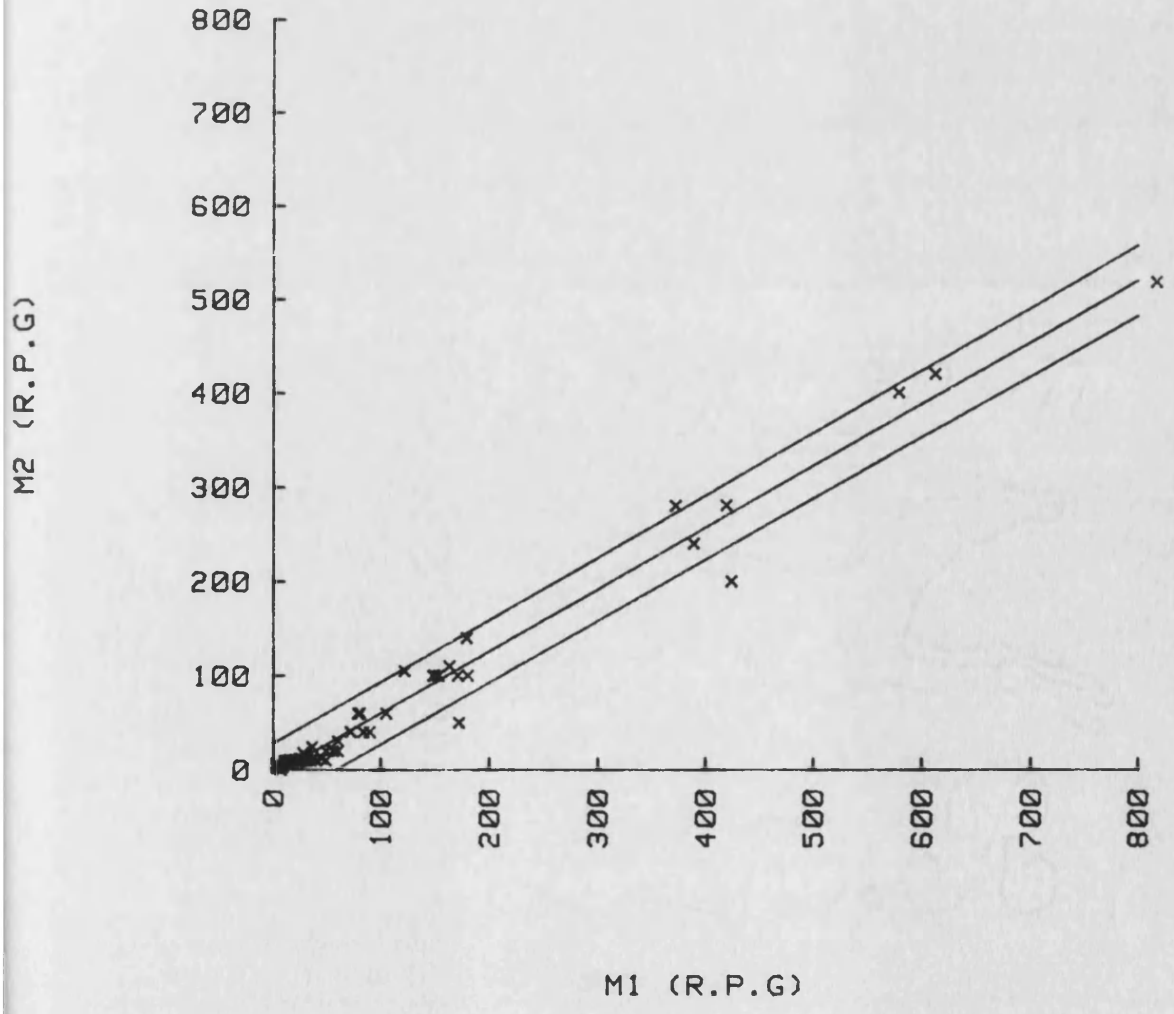
La técnica utilizada para analizar el contenido tanto de RE como el de RPg ha sido la de Carbón-Dextrano. En áquellas en las que la cantidad de tejido tumoral fué suficiente se realizó el Scatchard con cinco puntos; y las muestras que fueron menores de 300 mgrs. se realizó el ensayo Monopuntual.

Las muestras se distribuían de la siguiente forma:

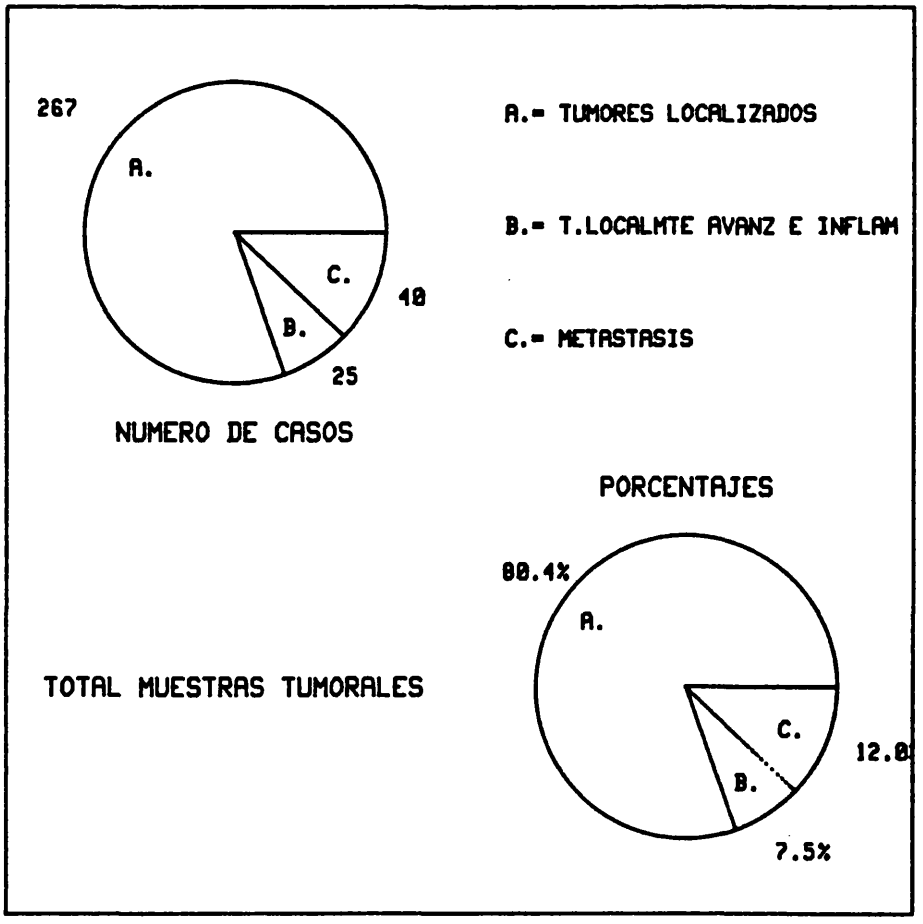
Diagrama 1

F I G U R A Nº 5

COMPARACION METODO SCATCHARD versus MONOPUNTUAL



D I A G R A M A Nº 1



- 25 tumores localmente avanzados e inflamatorios que habían recibido previamente a la terapeútica locorregional, quimioterapia ± radioterapia.
- 40 Met'astasis de carcinomas de mama de diversas localizaciones.
- 267 Tumores de mama. Estadios I,II y III, cuya primera actitud terapeútica fué la mastectomía.

3.1. Tumores localmente avanzados

Determinamos la cantidad de receptores hormonales en 25 muestras tumorales de pacientes con cáncer de mama localmente avanzados o inflamtorios. Por las características de la enfermedad, habían recibido al menos 3 ciclos de quimioterapia antes de la mastectomía; en 2 pacientes se asoció además radioterapia.

El análisis de receptores se realizó sobre las muestras tumorales obtenidas durante la mastectomía.

Las características de este grupo de pacientes fué: Edad media 53 años (rango 29-78 años). Un 52% eran premenopaúsicas y 48% postmenopaúsicas.

En el momento del diagnóstico, 4 pacientes fueron clasificadas como $T_{3b}\ N_{1-2-3}\ M_0$, y 21 como $T_{4-1-2-3}\ M_0$.

Según el período evolutivo, 12 pacientes tuvieron un Pev-1-2 y en 2 como Pev 3.

El porcentaje de receptores de estrógeno positivo encontrado fué del 32% y el de RPg del 24%.

3.2. Metástasis de carcinoma de mama

Se estudió el contenido de RE y RPg en 40 muestras tumorales procedentes de metástasis por carcinoma de mama.

La distribución de las mismas fué:

- 13 ganglios axilares contralaterales o supraclaviculares.
- 10 recidivas sobre la cicatriz de mastectomía.
- 13 lesiones cutáneas.
- 3 en mama contralateral.
- 1 metástasis cerebral.

En todos los casos se confirmó histológicamente la existencia de tumor en el lugar de la biopsia.

Las características de este grupo de pacientes fueron:

Edad media de 58 años (rango 32-79 años). Un 35% fueron premenopaúsicas y un 65% postmenopaúsicas.

Cuatro pacientes habían recibido tratamiento quimioterápico ± hormonoterapia al menos 2 meses antes de la toma de biopsia. El resto de las pacientes o no había recibido tratamiento sistémico previo o si lo habían recibido hacía más de 6 meses en el momento de la biopsia.

Los receptores de estrógeno en este grupo de pacientes fueron positivos en el 52,5% de los casos y los RPg en el 44%.

La concordancia en los valores de RE y RPg en una misma muestra tumoral fué globalmente de un 77,7%; RE+ RPg+ se dió en el 44,4% de los casos; y RE- RPg- simultáneamente en un 33,3%.

El fenotipo RE+ RPg- se encontró en un 17,6% y el fenotipo RE- RPg+ en un 3% de los casos. (Tabla nº4).

3.3. Tumores de mama estadios I, II y III

Se estudiaron 267 muestras tumorales procedentes de pacientes con cáncer de mama estadios I, II y III.

Las muestras tumorales para el estudio de los receptores, fueron obtenidas en el momento de la mastectomía.

Las características de este grupo de pacientes fueron:

Edad media 56,9 años (rango 22-88 años). Un 34,4% eran premenopaúsicas y 65,4% postmenopaúsicas. Diagrama 2.

De las 148 pacientes que fueron diagnosticadas en el Hospital Clínico de Valencia, 20 (13,5%) tenían un tamaño tumoral menor de 2 cms.; en 80 (54,0%) sus tumores medían entre 3-5 cms.; y 48 (32,4%) tenían un tamaño tumoral mayor de 5 cms.

En este mismo grupo de pacientes 66 (44,5%) no tenían ningún ganglio afecto; 41 (27,7%) tenían de 1 a 3 ganglios axilares infiltrados; y 41 (27,7%) tenían más de 3 ganglios infiltrados.

T A B L A Nº 4

DISTRIBUCION DE FRECUENCIAS DE RE Y RPg EN METASTASIS

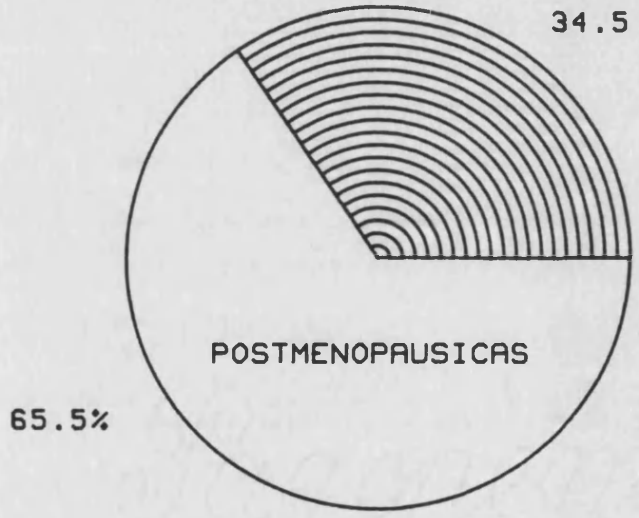
COMBINACION DE RECEPTORES	PORCENTAJE
RE + RPg +	44,4 %
RE - Rpg -	33,3 %
RE + RPg -	17,6 %
RE - Rpg +	3,0 %

RE + = > 10 fmol/mg.

RPg + = > 10 fmol/mg.

D I A G R A M A Nº 2

DISTRIBUCION DE PACIENTES SEGUN MENOPAUSIA



En 137 pacientes a las que se les administró, tras la mastectomía, un tratamiento adyuvante con quimioterapia ± hormonoterapia, y que fueron controladas de acuerdo al protocolo que se tienen establecido para este fin, en nuestro Centro, se analizó el número de pacientes que habían sufrido recaída de su enfermedad.

El tiempo de seguimiento medio fué de 19 meses (mínimo 3 meses y máximo de 32 meses).

En el momento de este análisis se han producido 11 recaídas; de las cuales 5 tenían más de 3 ganglios infiltrados; de 1-3 ganglios afectos 5 pacientes, y tan sólo una de las pacientes que recayó no tenía ningún ganglio infiltrado.

3.3.1. Distribución de RE y RPg

En las 267 muestras analizadas en este grupo de pacientes, se encontró que en 165 (61,8%) tenían un nivel de RE de 10 ó más fmol/mg de proteína, (considerando en nuestro estudio como positivo) y el resto 102 (38,2%) tenían un nivel de 0-9fmol/mg de proteína receptora (consideras como negativas en nuestro estudio).

En las 265 muestra donde se estudiaron los RPg se hallaron 133 (50,1%) que tenían niveles iguales o mayores de 10 fmol/mg de proteína receptora y 132 (49,8%) en que los niveles fueron de 0-9 fmol/mg.

En los diagramas 3 y 4 se representan las muestras positivas y negativas tanto de RE como de RPg respectivamente.

3.3.2. Concordancia de niveles de RE y RPg

La concordancia en la distribución de RE y RPg, ambos positivos o negativos en un mismo tumor, fué globalmente de 74,3%.

RE+ RPg+ en un mismo tumor se encontró en 115 muestras de las 265 estudiadas (43,4%) y en 82 (30,9%) ambos receptores fueron negativos. El fenotipo RE+ RPg- se encontró en 50 pacientes (18,8%) y RE- RPg+ se encontró en 18 pacientes, lo que supone un 6,7%. (Tabla 5).

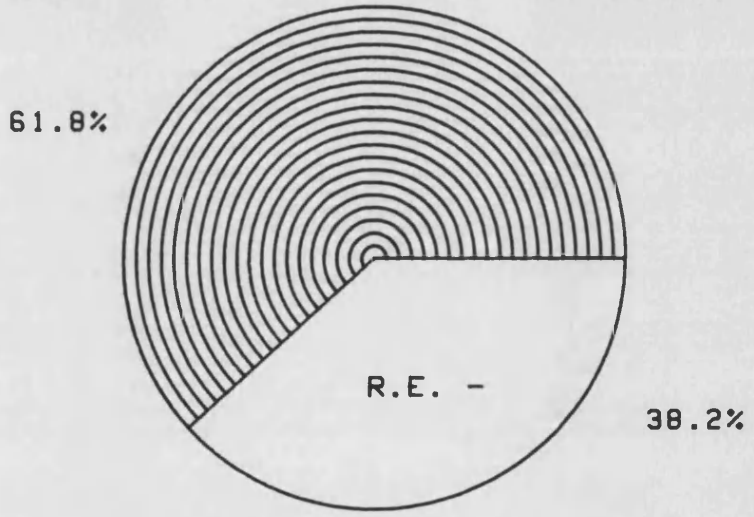
4.- CONCORDANCIA ENTRE NIVEL DE RE Y PORCENTAJE DE RPg POSITIVOS.

Cuando las muestras tumorales fueron agrupadas en función del nivel de RE y de RPg se encontró que existía una relación directamente proporcional entre ellas. Cuánto mayor era la cantidad de RE encontrada en el tumor, mayor fué la probabilidad de encontrar RPg positivos, tal y como se muestra en la figura 6.

Los tumores con valores de RE entre 0-2 fmol/mg. presentan RPg positivos tan sólo en un 13,7% de los casos, siendo los niveles de RPg en este grupo inferiores a 100 fmol/mg. Cuando

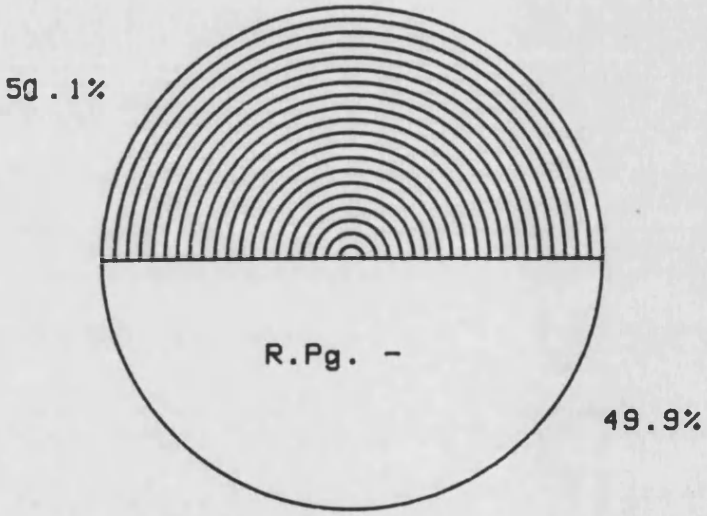
D I A G R A M A Nº 3

DISTRIBUCION DE R.E. EN TUMORES LOCALIZADOS DE MAMA



D I A G R A M A Nº 4

DISTRIBUCION DE R.Pg. EN TUMORES LOCALIZADOS MAMA

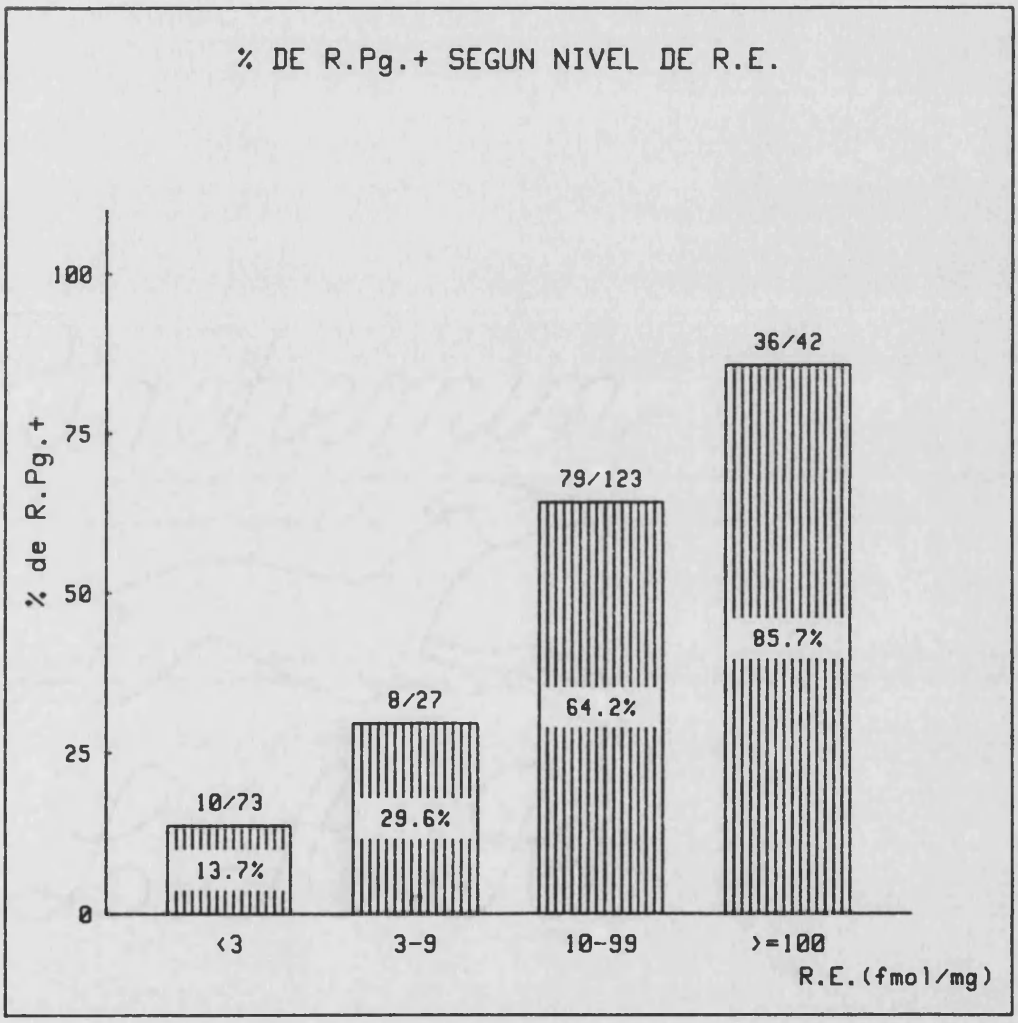


T A B L A Nº 5

DISTRIBUCION DE FRECUENCIAS R.E. Y R.Pg. EN TUMORES DE MAMA LOCALIZADOS

COMBINACION DE RECEPTORES	PORCENTAJES
R.E. + R.Pg. +	43,4%
R.E. - R.Pg. -	30,9%
R.E. + R.Pg. -	18,8%
R.E. - R.Pg. +	6,7%
R.E. + ≫ 1o fmol/mg.	
R.Pg. + ≫ 10 fmol/mg.	

F I G U R A Nº 6


% DE R.Pg.+ SEGUN NIVEL DE R.E.
% de R.Pg.+
100
75
50
25
0
10/73
13.7%
8/27
29.6%
79/123
64.2%
36/42
85.7%
<3
3-9
10-99
>=100
R.E.(fmol/mg)

se analizan los tumores con valores de RE entre 3 y 9 fmol/mg. el 29,63% de los mismos son RPg positivos, siendo también sus niveles en todos los casos menores de 100 fmol/mg.

En aquellos tumores cuyo contenido en RE fué de 10 a 99 fmol/mg la posibilidad de hallar simultáneamente RPg positivos fué de un 64,2%, y el 8% de éstos, tenían valores de RPg superiores a 100 fmol/mg. Finalmente, cuando se analizó el grupo de tumores con valores de RE superiores a 100 fmol/mg el 85,7% contenían RPg positivos, y de estos el 17% tenían valores superiores a 100 fmol/mg.

Se construyó una tabla de frecuencia con los datos analizados, estableciéndose la hipótesis de independencia entre las dos variables (RE y RPg), y observamos que existe una asociación entre las mismas . . ($p < 0,0001$). (Tabla 6).

5.- DISTRIBUCION DE RE Y RPG SEGUN LAS CARACTERISTICAS DE LAS PACIENTES.

En este apartado de nuestro estudio nos proponemos analizar en los tumores localizados de mama, la incidencia y nivel de RE y RPg en relación con el:

- Estado menopaúsico.
- Edad de las pacientes.
- Fase del ciclo menstrual en el momento de la mastectomía.

T A B L A Nº 6

DISTRIBUCION DE NIVELES DE R.E. Y R.Pg.

	RECEPTORES PROGESTERONA		
VALOR R. ESTROGENO	0 - 9	≥ 10	TOTAL
< 3	63 (86,3)*	10 (13,7)	73 (100)
3 - 9	19 (70,3)	8 (29,6)	27 (100)
10 - 99	44 (35,7)	79 (64,2)	123 (100)
> 100	6 (14,29)	36 (85,7)	42 (100)
T O T A L	132 (49,8)	133 (50,1)	265 (100)

* Porcentaje de pacientes entre paréntesis.

ESTADISTICO	VALOR	G.L.	PROBABILIDAD
PEARSON CHISQUARE	74.346	3	.00000

5.1. RE y RPg en relación con la menopausia

Cuando las pacientes fueron agrupadas según su estado menpaúsico, y se analizó el contenido de RE y RPg en las muestras tumorales se encontró que existía una diferencia en cuánto a positividad de RE entre ambos grupos. En cambio no existían diferencias en cuánto a porcentaje de positividad de los RPg entre pre y postmenopausicas. Figura nº 7.

La proporción de mujeres que contenían RE positivos en el grupo premenopaúsico fué de 47,8% y en el grupo postmenopaúsico de 69,1%. Siendo esta diferencia estadísticamente significativa . ($p < 0,001$).

En contraste, la proporción de pacientes con RPg positivos en ambos grupos pre y postmenopaúsicas fué similar: 48,35% versus 51,5%, (p= 0,6). Tabla nº 7.

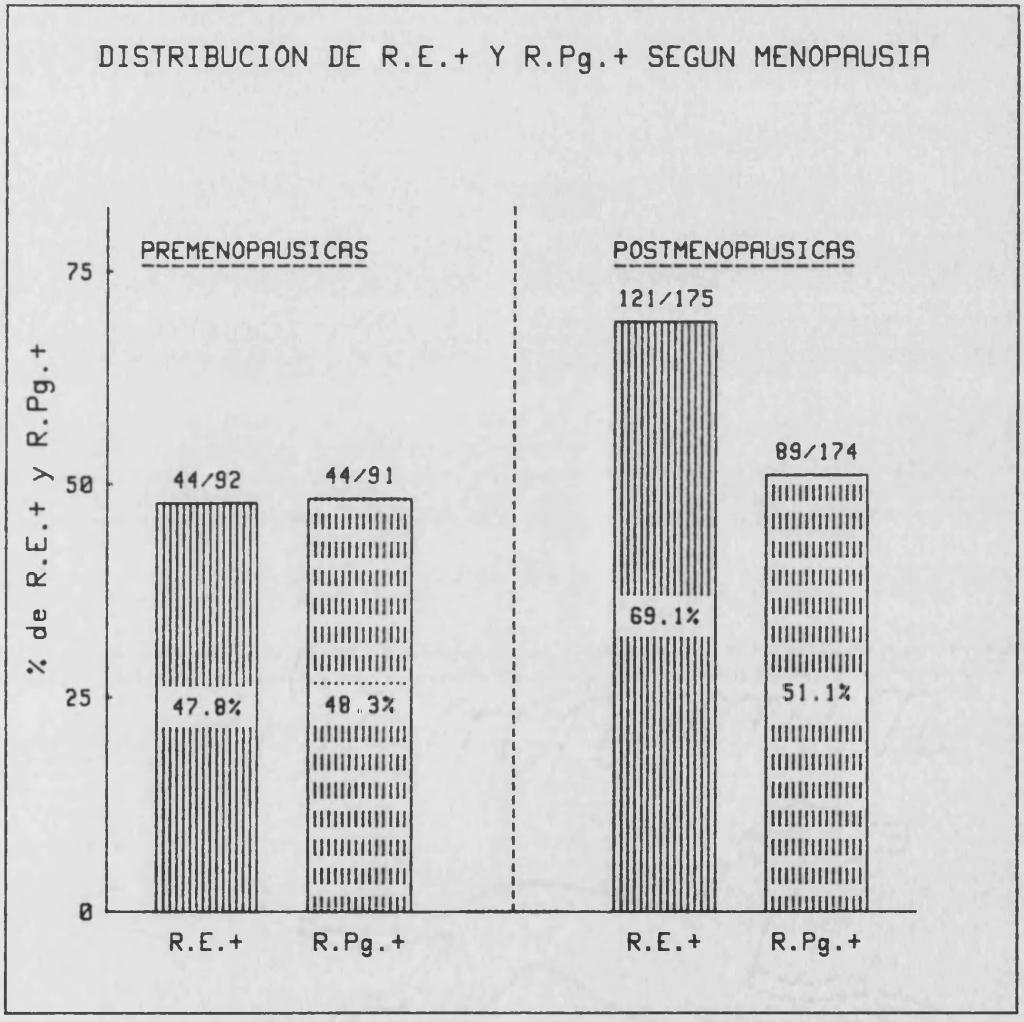
5.1.2. Concordancia de RE y RPg

Cuando se analizó la concordancia en cuánto al estado de RE y RPg se vió que en las pacientes premenopaúsicas ambos receptores fueron positivos a la vez en un mismo tumor en un 38,4% y en las postmenopaúsicas esta concordancia fué del 45,8%.

RE- RPg- se vió en el 41,7% de las pacientes premenopaúsicas y en el 25,2% de las postmenopaúsicas.

El fenotipo RE+ RPg- se encontró en mayor porcentaje

F I G U R A Nº 7


DISTRIBUCION DE R.E.+ Y R.Pg.+ SEGUN MENOPAUSIA
PREMENOPAUSICAS
POSTMENOPAUSICAS
% de R.E.+ y R.Pg.+
75
50
25
0
44/92
44/91
121/175
89/174
47.8%
48.3%
69.1%
51.1%
R.E.+
R.Pg.+
R.E.+
R.Pg.+

T A B L A Nº 7

DISTRIBUCION DE RE Y RPg SEGUN MENOPAUSIA

VALOR R. ESTROGENO	MENOPAUSIA PRE	POST	TOTAL
0 - 9	48 (52,1)	54 (30,8)	102 (38,2)
⩾ 10	44 (47,8)	121 (69,1)	165 (61,8)
TOTAL	92 (100)	175 (100)	267 (100)

ESTADISTICO	VALOR	G.L.	PROBABILIDAD
PEARSON CHISQUARE	11,60	1	.00066

VALOR R. PROGESTERONA	MENOPAUSIA PRE	POST	TOTAL
0 - 9	47 (51,6)	85 (48,8)	132 (49,8)
⩾ 10	44 (48,3)	89 (51,1)	133 (50,1)
TOTAL	91 (100)	174 (100)	265 (100)

ESTADISTICO	VALOR	G.L.	PROBABILIDAD
PEARSON CHISQUARE	.187	1	.66535

* Porcentaje de pacientes entre paréntesis.

en las postmenopaúsicas (23,5%) que en las premenopaúsicas (9,8%). En cambio la combinación RE- RPg+, aunque poco frecuente, se observó en un 5% de las pacientes postmenopaúsicas y en un 10% de las premenopaúsicas tal y como se comprueba en la Tabla nº 8.

5.1.3. Valores medios de RE y RPg

Los valores medios de los RE encontrados en las pacientes postmenopaúsicas fueron más elevados (90,9 fmol/mg) que en las pacientes premenopaúsicas (44,8 fmol/mg). Siendo esta diferencia estadísticamente significativa . ($p < 0,0001$).

En contraste los valores medios de los receptores de progesterona encontrados en las pacientes premenopaúsicas fueron ligeramente superiores que en las postmenopaúsicas (64,2 fmol/mg), pero estas diferencias no son significativas estadísticamente ($p= 0,2$).

La figura 8 nos muestra los valores medios de RE y RPg según el estado menopaúsico de las pacientes.

5.2. RE y RPg en relación con la edad de las pacientes

5.2.1. Incidencia de RE+ y RPg+

Las pacientes fueron agrupadas según la edad: menos de 40 años; 40-50; 51-60; 61-70 y más de 70 años.

En el grupo de menos de 40 años, aunque este com-

T A B L A Nº 8

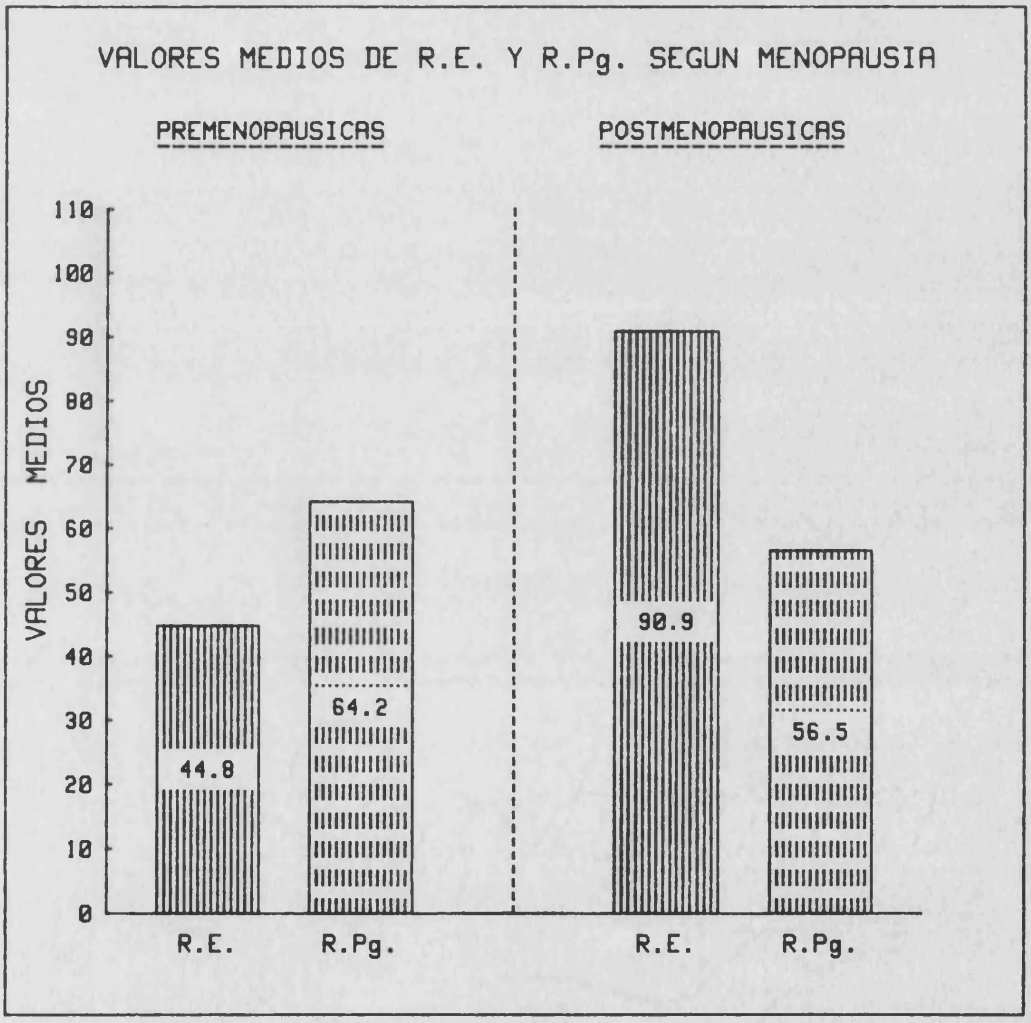
DISTRIBUCION DE FRECUENCIAS DE RE Y RPG SEGUN MENOPAUSIA

COMBINACION DE RECEPTORES	PREMENOPAUSIA	POSTMENOPAUSIA
RE+ RPg +	38,4 %	45,8 %
RE - RPg -	41,7 %	25,2 %
RE + RPg -	9,8 %	23,5 %
RE - RPg +	10,0 %	5,0 %

RE + $\geq$ 10 fmol/mg.

RPg + $\geq$ 10 fmol/mg.

F I G U R A Nº 8


VALORES MEDIOS DE R.E. Y R.Pg. SEGUN MENOPAUSIA
PREMENOPAUSICAS
POSTMENOPAUSICAS
VALORES MEDIOS
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
44.8
64.2
90.9
56.5
R.E.
R.Pg.
R.E.
R.Pg.

prende sólo 16 pacientes, el porcentaje de RE positivos fué de 31,25% y RPg positivos 12,5% de las pacientes. En el período de los 40-50 años el porcentaje de RE+ fué de 50,6% y el de RPg+ de 55,4%. En el grupo de 51-60 años, el porcentaje de pacientes con RE+ fué de el 57% de los casos y los RPg+ en un 47,1%.

Las pacientes de 61-70 años RE positivos fueron el 76,7% de los casos y RPg+ en 55,3% y finalmente en el grupo de pacientes mayores de 70 años la frecuencia de RE positivos fué de 78%, frente a 53% de RPg+. Los resultados se representan por medio de histogramas de frecuencias (Figura nº9).

Por tanto la proporción de pacientes con tumores RE positivos va aumentando de manera significativa con el incremento de la edad, como indica el valor de p menor de 0,0005. Sin embargo el porcentaje de pacientes con RPg no aumenta con la edad (p= 0,02) (Tabla nº 9).

5.2.2. Valores medios de RE y RPg

Se analizan los valores medios de RE y RPgen relación con la edad de las pacientes, viéndose que el contenido medio de RE aumenta con la edad: menos de 40 años, 30 fmol/mg; 40-50 años 45,5 fmol/mg; 51-60 años 83 fmol/mg; 61-70 años 90 fmol/mg; más de 70 años 111 fmol/mg. (Figura nº 10).

En cambio el valor medio de los RPg se mantiene más o menos estable a lo largo de todas las edades, aproximadamente 57 fmoles/mg. de proteína. En este grupo no obstante

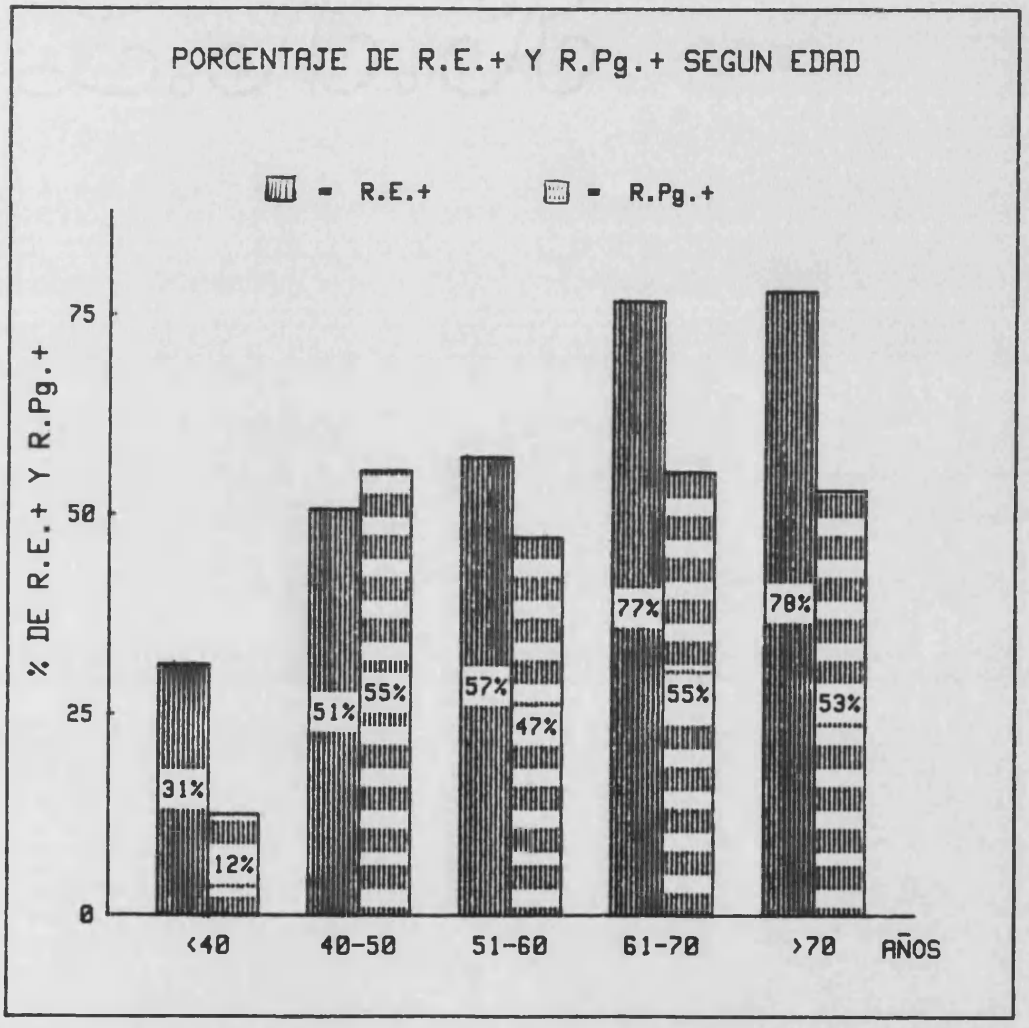
T A B L A Nº 9 (I)

DISTRIBUCION DE R.E. SEGUN EDAD

	VALOR ESTROGENO	
EDAD	0 - 9	≥ 10
< 40	11 (6,87)	5 (31,25)
40 - 50	37 (49,3)	38 (50,6)
51 - 60	30 (42,8)	40 (57,1)
61 - 70	13 (23,2)	43 (76,7)
> 70	11 (22)	39 (78)

ESTADISTICO	VALOR	G.L.	PROBABILIDAD
PEARSON CHISQUARE	21.79	4	.00022

F I G U R A Nº 9


PORCENTAJE DE R.E.+ Y R.Pg.+ SEGUN EDAD
= R.E.+
= R.Pg.+
% DE R.E.+ Y R.Pg.+
75
50
25
0
31%
12%
51%
55%
57%
47%
77%
55%
78%
53%
<40
40-50
51-60
61-70
>70
AÑOS

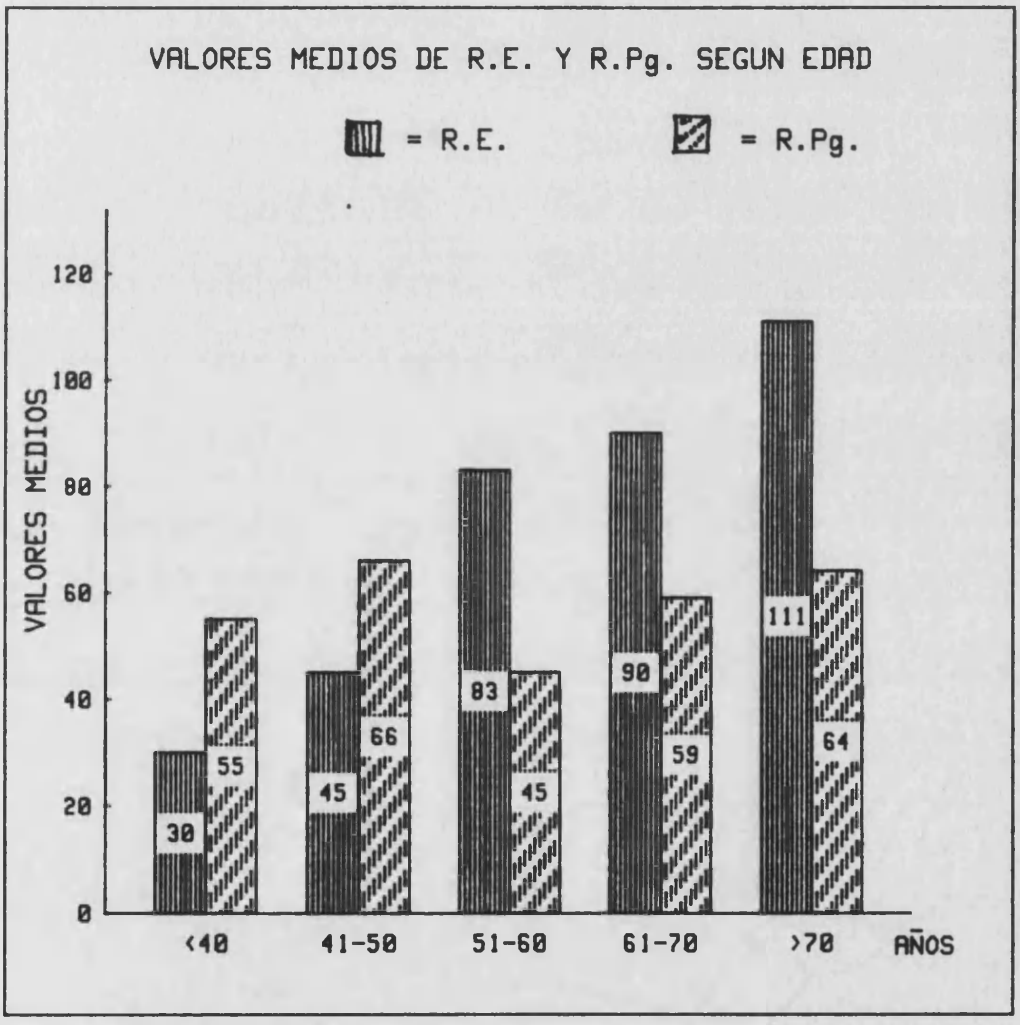
T A B L A Nº 9 (y II)

DISTRIBUCION DE R.Pg. SEGUN EDAD

EDAD	VALOR PROGESTERONA	
	0 - 9	≥ 10
< 40	14 (87,5)	2 (12,5)
40 - 50	33 (44,5)	41 (55,4)
51 - 60	37 (52,8)	33 (47,1)
61 - 70	25 (44,6)	31 (55,3)
> 70	23 (46,9)	26 (53,06)

ESTADISTICO	VALOR	G.L.	PROBABILIDAD
PEARSON CHISQUARE	10,91	4	.02752

F I G U R A Nº 10


VALORES MEDIOS DE R.E. Y R.Pg. SEGUN EDAD
= R.E.
= R.Pg.
VALORES MEDIOS
120
100
80
60
40
20
0
30
55
45
66
83
45
90
59
111
64
<40
41-50
51-60
61-70
>70
AÑOS

el máximo valor medio se observa para las edades de 41-50 años.

5.3.- RE Y RPg en relación con la fase del ciclo menstrual.

Con el fin de investigar si los níveles circulantes de hormonas esteroideas de estrógeno y progesterona ejercían algún influjo sobre el nivel de RE y RPg encontrados en el tumor, se han estudiado 53 pacientes premenopaúsicas, en las - que se pudo averiguar el día en que se encontraban del ciclo menstrual en el momento de la mastectomía.

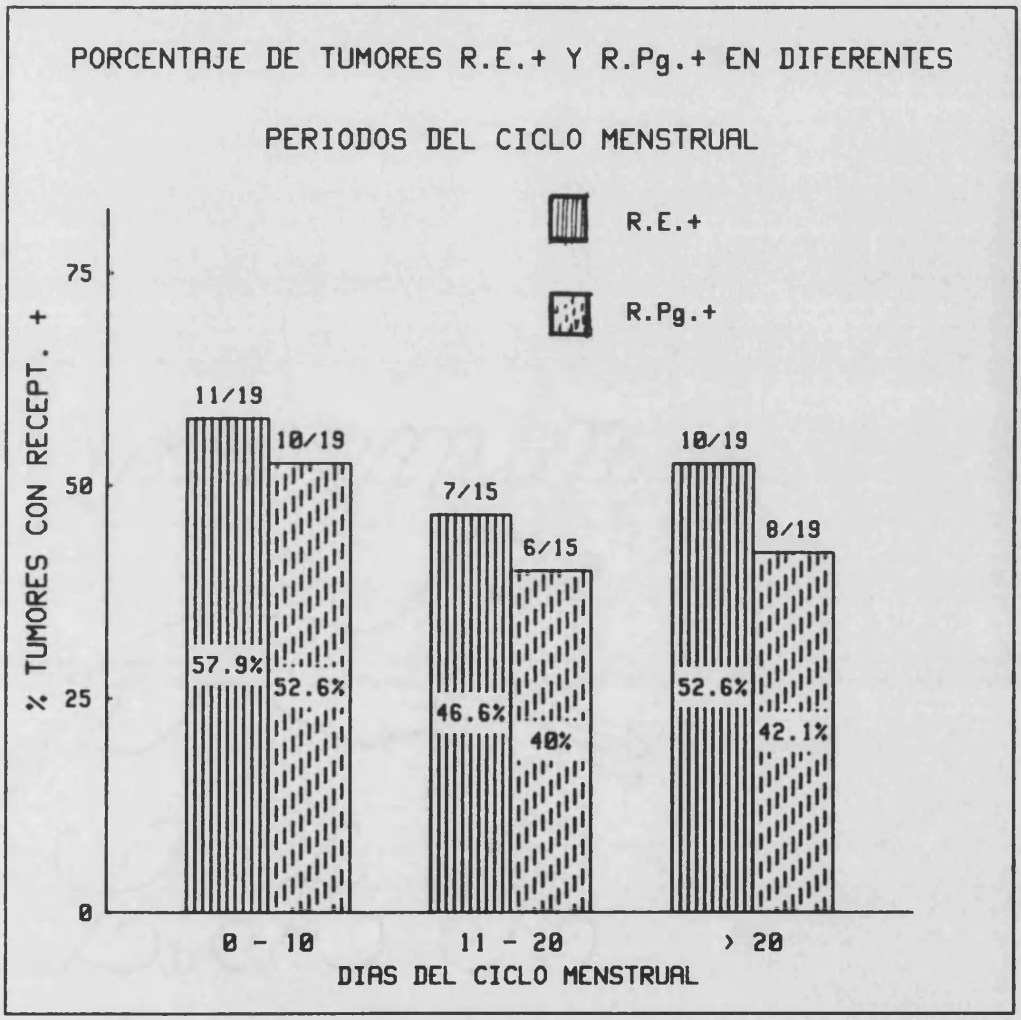
Las pacientes fueron subdivididas en tres grupos según se encontraran entre los días 0-10, 11-20 o más de 20, respecto a su ciclo menstrual. El número de pacientes en cada subgrupo fue similar.

Los resultados obtenidos fueron: El porcentaje de RE positivos no varió significativamente durante los tres períodos de 10 días; estos fueron 57,8%, 46,6% y 52,6%.

En cuánto a los RPg encontrados en cada período si que mostraron diferencias, pero éstas no obtuvieron tampoco una significación estadística ($p = 0,2$).

En el período de 0-10 días se encontraron 52,6% de RPg positivos, en el período de 10-20 días se encontró un 40% de RPg positivos y en el de más de 20 días un 42,1% de positividad para los RPg. (Figura 11).

F I G U R A Nº11


PORCENTAJE DE TUMORES R.E.+ Y R.Pg.+ EN DIFERENTES
PERIODOS DEL CICLO MENSTRUAL
R.E.+
R.Pg.+
% TUMORES CON RECEPT. +
75
50
25
0
11/19
10/19
7/15
6/15
10/19
8/19
57.9%
52.6%
46.6%
40%
52.6%
42.1%
0 - 10
11 - 20
> 20
DIAS DEL CICLO MENSTRUAL

6.- RELACION DE RE Y RPG Y CIERTOS FACTORES PRONOSTICOS EN CANCER DE MAMA.

6.1.- RE y RPg en relación con el tamaño tumoral.

Las pacientes fueron agrupadas según que el tamaño de sus tumores fuera menor de dos centímetros, entre 3-5 cms. y más de 5 cms.; y se relacionó con el contenido de RE y RPg.

En aquellos tumores iguales o menores de 2 cms. el porcentaje de RE positivos fue del 65%, y el de RPg positivos del 60%. En los tumores entre 3-5 cms. se encontraron RE positivos en el 70% y RPg positivos en el 57,5%. En aquellos tumores mayores de 5 cms. la frecuencia de RE positivos fué de un 60,4% y RPg positivos de 52,8%.

En cada categoría, según el tamaño tumoral, no hubo diferencias en la distribución de RE+ y RPg+. No obstante se encuentra una ligera disminución en la proporción de RE+ y RPg+ en aquellos tumores de mayor tamaño. Pero esta diferencia no resulta estadísticamente significativo como muestran los valores de $P = 0,5$ y $p = 0,7$ correspondientes a los estadísticos X^2 de las tablas de frecuencias de RE y RPg respectivamente (Tabla 10).

6.2.- RE y RPg en relación con el número de ganglios infiltrados.

Se analizó la relación entre el número de ganglios

T A B L A Nº 10

DISTRIBUCION DE RE y RPG SEGUN TAMAÑO TUMORAL

VALOR	TAMAÑO TUMORAL			
R. ESTROG.	≤ 2	3-5	> 5	TOTAL
0 - 9	7(35,0)*	24(39,0)	19(39,5)	50 (33,7)
≥ 10	13(65,0)	56(70,0)	29(60,4)	98 (66,2)
TOTAL	20(100)	89(100)	48(100)	148 (100)

ESTADISTICO	VALOR	G.L.	PROBABILIDAD
PEARSON CHISQUARE	1,24	2	.53608

VALOR	TAMAÑO TUMORAL			
R.PROGEST.	≤ 2	3-5	> 5	TOTAL
0 - 9	8(40,0)	34(42,5)	23(47,9)	65 (43,9)
≥ 10	12(60,0)	46(57,5)	25(52,0)	83 (56,0)
TOTAL	20 (100)	80 (100)	48(100)	148 (100)

ESTADISTICO	VALOR	G.L.	PROBABILIDAD
PEARSON CHISQUARE	.502	2	.77819

* Porcentaje de pacientes entre paréntesis.

axilares infiltrados y el contenido de RE y RPg del tumor.

Las pacientes fueron estratificadas en tres grupos según el número de ganglios infiltrados (ninguno, entre 1-3 y más de 3).

Aproximadamente el 65% de las pacientes de cada subgrupo fue RE+ y el 55% RPg+. No encontramos relación entre el número de ganglios infiltrados y el contenido en RE y RPg del tumor primario, como se comprueba con los correspondientes valores de $p = 0,9$ y $p = 0,7$ de los estadísticos x^2 de la tabla 11.

7.- VARIACION EN CUANTO AL CONTENIDO DE RE EN DIFERENTES PARTES DE UN MISMO TUMOR.

Se analizaron simultáneamente dos porciones de un mismo tumor en 29 muestras tumorales de pacientes con neoplasias de mama, con el fín de investigar la variabilidad en -- cuanto al contenido de RE dentro de un tumor.

La edad media de las pacientes de las cuales procedían las muestras tumorales fue de 55,8 años (rango 35 a 81 años). Diez pacientes (34,5%) eran premenopaúsicas y 19 (65,5%) postmenopaúsicas.

En 21 tumores (72,5%) fueron concordantes los resultados de las dos muestras en cuánto a contenido de RE y en 8 tumores (27,5%) fueron discordantes los resultados de -

T A B L A Nº 11

DISTRIBUCION DE RE y RPg SEGUN Nº GANGLIOS

VALOR R. ESTROG.	NUMERO DE GANGLIOS 0	1-3	≥ 4	TOTAL
0 - 9	23(34,8)*	14(34,1)	13(31,7)	50 (33,7)
≥ 10	43(65,1)	27(65,8)	28(68,2)	98 (66,2)
TOTAL	66(100)	41(100)	41(100)	148 (100)

ESTADISTICO	VALOR	G.L.	PROBABILIDAD
PEARSON CHISQUARE	.115	2	.94418

VALOR R. PROGEST.	NUMERO DE GANGLIOS 0	1-3	≥ 4	TOTAL
0 - 9	27(40,9)	19 (46,3)	19(43,3)	65 (43,9)
≥ 10	39(59,0)	22 (53,6)	22(53,6)	83 (56,0)
TOTAL	66(100)	41 (100)	41(100)	148 (100)

ESTADISTICO	VALOR	G.L.	PROBABILIDAD
PEARSON CHISQUARE	.438	2	.80327

* Porcentajes de pacientes entre paréntesis.

las dos muestras estudiadas (Tabla 12).

De los 21 tumores concordantes 12 de ellos (41,3%) tenían ambas muestras positivas; en 7 (24,1%) ambas muestras negativas, y en 2 (6,9%) ambas "border line".

De los 8 tumores en los cuales se encontró discordancia en los resultados podemos hacer dos grupos: los que consideramos una discordancia menor entendiendo como tal la diferencia de grado de positividad (una muestra positiva o negativa y la otra "border line") y un segundo grupo con discordancia mayor, entendida como el hallazgo de muestras positivas frente a otras negativas (Tabla 13).

La discordancia mayor en cuánto a contenido de RE fué de un 6,9% mientras que la menor fué de un 20,6%.

Es de destacar que el rango de positividad en las muestras con determinaciones discordantes fué mucho menor (12-20 fmoles/mg) que el que se obtuvo en las muestras en que ambas determinaciones fueron positivas (10-223 fmoles/mg).

Las pacientes con RE negativos en ambas determinaciones tienden a ser más jóvenes (edad media 44 años) que las que tienen alguna muestra con RE positivos (edad media 60 años).

En los tumores con RE positivos en todas las muestras se observó que en su mayoría el nivel de positividad es uniforme tan sólo en dos casos de los 12 se obtuvieron variaciones más importantes.

T A B L A Nº 12

VARIACION DE LOS VALORES DE RECEPTORES EN CANCER DE MAMA: ENSAYOS SIMULTANEOS

	1er ENSAYO	2º ENSAYO	Nº DE PACIENTES
CONCORDANTE			
	E.R. +	E.R. +	12 (41,3%)
	E.R. ±	E.R. ±	2 (6,9%)
	E.R. -	E.R. -	7 (24,1%)
DISCORDANTE			
	E.R. +	E.R. ±	4 (13,8%)
	E.R. -	E.R. ±	2 (6,9%)
	E.R. -	E.R. +	2 (6,9%)

TABLA Nº 13

VARIACIONES CUANTITATIVAS EN EL CONTENIDO DE R.E. EN LAS MUESTRAS CON VALORES DISCORDANTES

	CASO	1er ENSAYO	2º ENSAYO
DISCORDANCIA MAYOR (1)	A	14*	0
	B	12	0
DISCORDANCIA MENOR (2)	C	14	3
	D	7	15
	E	15	6
	F	20	7
	G	2	6
	H	5	2

(1) R.E. + R.E. -

(2) R.E. + R.E. ± ó R.E. - R.E. ±

(*) R.E. valores en Fmoles/mg. de la fracción de proteína citoplásmica.

8.- RE Y RPg EN RELACION A LA PROGRESION DE ENFERMEDAD

En 137 pacientes a las que se les administró, tras la mastectomía un tratamiento adyuvante con quimioterapia± hormonoterapia, y que fueron controladas de acuerdo al protocolo que se tiene establecido par este fín en nuestro centro, se analizó el número de pacientes que habían tenido una recaída de su enfermedad en relación con el estado de RE y RPg en sus tumores.

El tiempo de seguimiento medio fue de 19 meses (mínimo 3 meses y máximo de 32 meses).

En el momento de este análisis se han producido 11 recaídas; de las cuales 5 tenían más de 3 ganglios infiltrados; de 1-3 ganglios afectos, 5 pacientes; y tan sólo una de las pacientes que recayó no tenía ningún ganglio infiltrado.

Analizando el grupo de tumores con RE positivos se vió que la recaída se produjo en 5 casos (5,68%) y en el grupo de tumores con RE negativos se produjeron 6 recaídas lo que supone un 12,24%.

En el grupo de pacientes con RPg positivos recayeron 2 (2,63%) y en el de RPg negativos recayeron 9 (14,75%).

Cuando analizamos estadísticamente los resultados, comprobamos que el estado RE positivo o negativo no influye en el porcentaje de recaídas significativamente ($p= 0,1$). Por el contrario el estado de RPg negativo está asociado con un mayor riesgo de recaída ($p < 0,05$) en este pequeño grupo de pacientes

analizado. (Tabla nº 14).

Cuando las pacientes fueron agrupadas según el contenido de RE y RPg conjuntamente en sus tumores y se analizaron las recaídas, se observó que:

En el grupo que tenía RE+ RPg+ y que comprendía 68 pacientes tan solo recayeron 2 (2,94%); en cambio cuando se analizó el grupo RE- RPg- el cual comprendía 41 pacientes, las recaídas se produjeron en 6 (14,6%).

En el subgrupo RE- RPg+ aunque comprende un escaso número de pacientes, no se produjo ninguna recaída, y en el grupo RE+ RPg- se produjeron 3 recaídas. (Tabla nº 15).

Además hay que señalar que las pacientes que recayeron en el grupo con ambos receptores negativos, la recaída se produjo mucho más precozmente que en aquellas pacientes que también lo hicieron, pero que tenían en sus tumores ambos receptores positivos, o alguno de ellos positivo (11 versus 18 meses).

Por tanto, a pesar del corto tiempo de seguimiento, y aunque no podemos sacar conclusiones a este respecto, es de señalar que el grupo de pacientes con receptores de progesterona negativos, registró la mayor frecuencia de recaídas.

T A B L A Nº 14

DISTRIBUCION DE RE y RPg SEGUN LAS RECAIDAS

VALOR R. ESTROGENO	RECAIDA SI	RECAIDA NO	TOTAL
0 - 9	6 (12,2)**	43 (87,6)	49 (100)
>/ 10	5 (5,6)	83 (94,3)	88 (100)
TOTAL	11 (8,0)	126 (91,9)	137 (100)

ESTADISTICO	VALOR	G.L.	PROBABILIDAD
PEARSON CHISQUARE	1,8	1	.17543

VALOR R. PROGESTERONA	RECAIDA SI	RECAIDA NO	TOTAL
0 - 9	9 (14,7)	52 (82,2)	61 (100)
>/ 10	2 (2,6)	74 (97,3)	76 (100)
TOTAL	11 (8,0)	126 (91,9)	137 (100)

ESTADISTICO	VALOR	G.L.	PROBABILIDAD
PEARSON CHISQUARE	6,7	1	.00946

** Porcentajes de pacientes entre parentesis.

T A B L A Nº 15

DISTRIBUCION DE RECAIDAS SEGUN R.E. Y R.Pg.

COMBINACION DE LOS RECEPTORES	N.PACIENTES	N.RECAIDAS
RE + RPg +	68	2 (2,90%)
RE - RPg -	41	6 (14,6%)
RE + RPG -	20	3 (15,0%)
RE - RPg +	8	0 (-----)

RE + $\geq$ 10 fmol/mg

RPg + $\geq$ 10 fmol/mg

D I S C U S I O N

DISCUSION

Las hormonas sexuales esteroideas son transportadas a través de la sangre a todos los tejidos corporales, pero estimulan sólamente a los tejidos y órganos diana, tales como el útero, ovario y glandula mamaria.

Las hormonas esteroideas se encuentran a muy bajas concentraciones entre 10^{-10} y 10^{-8} M, por lo cual el tejido diana debe tener unos lugares de reconocimiento muy sensibles (receptores) para responder a tan bajos niveles.

Estos receptores son unas proteínas que se unen a las hormonas con una alta afinidad y especificidad.

Los RE y RPg se localizan en el citoplasma y en el núcleo de las células de tejidos y dependen de la estimulación hormonal para realizar las funciones que les son propias.

Actualmente está comprobado que los estrógenos, progestágenos, andrógenos y esteroides adrenocorticales tienen un idéntico mecanismo básico de acción en sus respectivos tejidos diana. Después que el esteroide entra en la célula, tras atravesar la membrana celular, éstos se unen específicamente y con alta afinidad al receptor soluble citoplásmico. El complejo resultante receptor-esteroide, tras su activación (cambio estructural)

pasa al núcleo, donde se une a un sitio aceptor en la cromatina. El complejo nuclear receptor-esteroide unido facilita la transcripción genética, induciendo un aumento en la producción de varios RNA y eventualmente aumentando la síntesis de proteínas.

Numerosos estudios han demostrado que la proteína receptora citoplásmica es necesaria para la acción de los esteroides, y que ella es la responsable de la interacción inicial entre la hormona y la célula. Esta unión, significa la "señal" para que se desencadenen los acontecimientos bioquímicos posteriores, responsables de la acción de la hormona en particular.

Cuando ocurre una transformación maligna, las células pueden conservar todos o parte de los sitios receptores de una población celular normal. La determinación del número de sitios receptores nos informa si el crecimiento y función de una célula son regulados por su ambiente hormonal o no. Esto implica que la cuantificación del número de sitios receptores podrá indicarnos la dependencia hormonal celular.

Esta hipótesis ha sido confirmada, y en el momento actual está ben establecido que los tumores que no contienen RE raramente responden a una terapeútica endocrina, mientras que los tumores con RE positivos frecuentemente responden a las manipulaciones hormonales.

No obstante, la positividad de los RE en un tumor no garantiza una respuesta a la terapia endocrina, ya que el 40% de las pacientes no responden a pesar de la positividad

de tales receptores. HORWITZ (75) sugiere que ciertos tumores RE positivos no responden a las manip laciones endocrinas porque existe un defecto en algún paso distal del mecanismo de acción, conduciendo a un crecimiento autónomo. Sería necesario confirmar la integridad de la secuencia metabólica que es desencadenada por la unión del estrógeno al receptor.

Basados en la observación de que los RPg son inducidos por los estrógenos en los tejidos diana normales y el cultivo de células de cáncer de mama humano, McGUIRE Y HORWITZ (98) sugirieron que los RPg podr'ian ser un mejor marcador que el RE, ya que aseguran la existencia de una vía intacta en la respuesta al estrógeno. Actualmente es aceptado que los RPg son un marcador mejor de la dependencia hormonal de un tumor que los RE.

Todo ello sugiere que en los tumores de mama debe ser medido el contenido tanto de RE como de RPg rutinariamente, y que el resultado de estos ensayos puede ayudar a individualizar el tratamiento de las pacientes con cáncer de mama.

La utilidad clínica de los receptores esteroideos en otras neoplasias como son las de endometrio, ovario, próstata, riñóny melanoma no está bien establecida por el momento.

Los receptores esteroideos han podido ser cuantificados porque tienen ciertas características que permiten su identificación. Son definibles por las siguientes propiedades "in vitro":
a) capacidad de unión limitada: La respuesta biológica a una

hormona esteroidea es un fenómeno saturable. Esto implica que hay sólamente un número limitado de sitios de unión en cualquier tejido dado. El citosol o la fracción nuclear de un tejido diana asociado a varias concentraciones de esteroide marcado con un isótopo permite la unión del esteroide con el receptor hasta alcanzar el equilibrio. b) Alta afinidad: Los niveles circulantes de esteroides son generalmente de 10^{-10} a 10^{-8} M. Por lo que estos receptores deberán tener una alta afinidad por su hormona respectiva. c) Especificidad por la hormona: El receptor presenta una alta afinidad por una o varias hormonas. Esta especificidad hace que que la célula del tejido diana responda a la señal hormonal a pesar de la interferencia de otras señales. La unión del estrógeno a su receptor es específica, mientra que la unión de la progesterona a su receptor es relativamente menos específica, ya que la progesterona se une también a los receptores de andrógenos y de glucocorticoides. d) Especificidad de los tejidos: Una respuesta significativa a las hormonas sexuales sólo la presentan ciertos tejidos tales como útero, vagina y glandula mamaria, denominados tejidos diana, los cuales tienen un número de receptores citoplásmicos muy elevado, comparado con otros órganos que también poseen receptores como son el hipotálamo, riñón, diafragma, bazo e hígado, pero en muy pequeña cantidad. e) Correlación con respuesta biológica: La unión de la hormona a su receptor podría ser demostrada por la amplitud de la respuesta. Este criterio no ha podido demostrarse a causa de la interacción de diferentes hormonas.

Varias técnicas in vitro se han desarrollado en los últimos años para detectar y cuantificar la concentración de proteína receptora intracelular.

La amplia variedad de ensayos utilizados para la determinación de estos receptores se basa en la medida de estas proteínas, en forma de complejos unidos a ligandos esteroideos marcados con isótopos.

El método más frecuentemente utilizado para el análisis de receptores es el de Carbón-Dextrano (85) siendo el que hemos utilizado nosotros por su sensibilidad y exactitud, así como por la posibilidad de ensayar varias muestras al mismo tiempo, utilizando un mismo stndard. En él empleamos concentraciones crecientes de ligando radiactivo específico hasta alcanzar el equilibrio, lo que permite construir una curva de saturación.

No obstante las preparaciones de tejido diana contienen otros componentes capaces de unirse a los ligandos esteroideos, además de a sus propios receptores específicos. Tales componentes de unión no específicos generalmente tienen una relativa baja afinidad pero una alta capacidad por los ligandos. Por ello se utilizan ligandos esteroideos con el fín de saturar los receptores específicos, y ello nos permite medir también los componentes de unión no específica.

La hormona marcada libre no unida es eliminada por medio del Carbón-Dextrano, por la propiedad que tiene el carbón vegetal de adsorber y precipitar a la hormona libre. El dextrano

actúa de estabilizador de los compljos hormona-receptor formados.

La radiactividad medida en las muestras con exceso de ligando no marcado nos valora las uniones no saturables, mientra que las que contienen ligando marcado sólo, indican el total de uniones. La diferencia entre las dos nos da las uniones específicas construyendo a partir de ellas la curva de saturación.

A partir de los datos experimentales de unión que nos proporciona la metódica anterior, en ocasiones resulta difícil obtener una curva de saturación de una manera clara, por lo cuáles de gran utilidad el realizar una transformación matemática derivada de la ley de acción de masas. Nosotros con este fín hemos empleado el método de Scatchard (45). Con él, utilizando los valores de unión específica, se calcula el número total de sitios receptores y la constante de disociación, con lo que conseguimos información sobre la afinidad del receptor que estamos midiendo, puesto que pueden estar presentes proteínas contaminantes que también se unan al esteroide y nos dén un falso positivo.

Otros autores para separar la hormona libre de la unida han utilizado métodos físicos, como la técnica de gel de Poliacrilamida (87) y el gradiente de densidad sucrosa (84) siendo este último método muy utilizado por numerosos laboratorios de investigación. Con él se pueden identificar las moléculas de receptor basándose en la velocidad de sedimentación

de las proteínas en función de su peso molecular y densidad. Esta técnica da una información útil de las formas moleculares del receptor. Habitualmente en este método se usa una concentración de esteroide sólo, no obteniéndose información en cuánto a la afinidad del ligando por el receptor. Además estos procederes de separación física necesitan mucho más tiempo par su realización y conducen a pérdidas en las medidas del receptor. Son métodos para cuantificar los receptores lentos y caros. Su uso en la rutina clínica ha sido muy limitado.

Varios autores (206-207) han demostrado una correlación cuantitativa excelente entre el análisis de receptores por el ensayo de Carbón-Dextrano y el método de gradiente de sucrosa.

No obstante, CHESTER (208) encontró que el ensayo de Carbón-Dextrano era más sensible para determinar los RE. ANDERSON (209)demuestra también mayor sensibilidad para la determinación de RPg por este método que con el de gradiente de densidad sucrosa, y esta diferencia se acentúa más cuando en este último ensayo no se usaba el molibdato.

Otras técnicas de adsorción y precipitación incluyen la obtención del receptor mediante filtros de intercambio iónico, adsorción del receptor mediante la hidroxilapatita, eliminación del esteroide libre mediante anticuerpos antiesteroideos y precipitación del receptor mediante sulfato de protamina. Todos ellos tienen ventajas y desventajas, pero no están lo suficientemente estandarizados para su utilización rutinaria.

Con la finalidad de localizar el receptor en el propio tejido y de poder identificar aquellos carcinomas de mama que tienen una población heterogénea con sólo un número pequeño de células RE positivas, se han investigado métodos histoquímicos, utilizando técnicas de inmunofluorescencia o de inmunoperoxidasas, y anticuerpos antiesteroideos. La dificultad de cuantificar los resultados en términos de concentración de receptor constituye la mayor limitación de estas técnicas.

Se han ensayado otros métodos histoquímicos utilizando conjugados de esteroides con sustancias fluorescinadas. FISHER (93) realizó un estudio comparativo entre este método citoquímico que usaba fluresceína unida a la posición 17 del estradiol, y el método de Carbón-Dextrano, no encontrando relación cuantitativa directa. Sin embargo, demostró que la técnica citoquímica era útil para medir la relación de células positivas al RE en una muestra tumoral y comprobó que el 81% de los tumores con valores de RE entre 10 y 99 fmol/mg medido en el ensayo de Carbón-Dextrano se asociaba con más del 10% de células positivas al marcador.

Desafortunadamente ninguna de las técnicas histoquímicas han sido evaluadas de forma independiente, prospectiva y ciega. A pesar de ser atrayentes su sensibilidad tiene que ser todavía evaluada. Se requieren más estudios, antes de que se puedan abandonar los métodos bioquímicos de análisis del receptor.

No obstante, con el desarrollo reciente de anticuerpos monoclonales específicos podrán realizarse ensayos directos de radioinmunoanálisis.

DeSOMBRE y Cols (94) han conseguido un anticuerpo monoclonal frente al receptor de estrógeno, y ésto va a permitir la utilización de un sistema inmunorradiométrico de gran sensibilidad y especificidad, para la determinación de este receptor.

Se han descrito muchos métodos para determinar la actividad de los receptores esteroideos en los tumores de mama. Pero el método de Carbón-Dextrano, en nuestra opinión, tiene muchas ventajas sobre los otros descritos: permite afirmar con seguridad la cantidad de receptores unidos; determina la constante de disociación; es un método sensible, exacto y reproducible y además pueden ensayarse al mismo tiempo varias muestras, utilizando un mismo standard.

El principal inconveniente de esta metodología es la labilidad del receptor y su posible degradación en una de las fases analíticas y la presencia en el homogenizado de contaminantes que se unen al esteroide de modo inespecífico, y pueden conducir a una subestimación en la medida del receptor.

Para evitarlo, en nuestro laboratorio, mantenemos elfragmento tumoral a 0-2ºC de temperatura inmerso en tampón frío. Esta precaución es suficiente si el procedimiento lo iniciamos inmediatamente, en caso contrario es necesario congelar el fragmento en nitrógeno líquido y mantenerlo a -80ºC hasta el mo-

mento del examen.

El tampón fosfato que se utiliza contiene como agentes estabilizantes el glicerol, el cual disminuye la disociación del complejo hormona-receptor de progesterona (210). También utilizamos el thioglicerol, que protege a los grupos sulfidrílicos de la molécula del receptor (211).

El homogeneizado se tiene inmerso en baño de agua y hielo, respetando el intervalo de al menos 1 minuto cada 4 veces, para evitar el aumento de temperatura que conllevaría a una degradación del receptor (212).

La centrifugación del homogeneizado se realiza a 100.000 g con lo cual se obtiene una mayor sensibilidad, ya que ésto permite provocar la separación del máximo posible de ligandos inespecíficos.

Además de los componentes de unión no específicos, en las muestras biológicas utilizadas para la medida de receptores pueden exisstir contaminantes tales como la globulina de unión de las hormanas esteroideas (SHBG) y globulinas de unión corticoidea (CBG). Ambas se unen a sus respectivos ligandos con considerable afinidad.

La SHBGpuede causar problemas en la medida de los RE y la CBG en la medida de los RPg.

Actualmente con la utilización en los ensayos de receptores de ligandos esteroideos sintéticos marcado,se ha superado parcialmente este inconveniente. Generalmente, estos esteroides

no interactúan,en la mayoría de los casos con las proteínas séricas contaminantes, sin embargo si que se unen a los sitios receptores de baja afinidad, no especiíficos, y éstos necesitan ser diferenciados.

Algunos de estos ligandos sintéticos se disocian más lentamente de su receptor y además presentan mayor afinidad por él que los ligandos naturales. La mayor desventaja de algunos de ellos es su interacción con varias clases de receptores esteroide de competición que bloquee los receptores específicos.

Se utiliza el dietilestilbestrol (DES) como competidor, que no reconoce a la SHBG como ligando. Así es posible eliminar la interferencia debida a esta globulina de alta afinidad por el estradiol. Este competidor se une al receptor específico bloqueándolo.

Considerando esta característica, el DES viene actualmente utilizándose en nuestro laboratorio como alternativa al 17-beta estradil. La concentración de DES es de 150 nMol/l.

Para la determinación de RPg se usa la progestina sintética llamada R-5020, que no se une a los receptores glucocorticoideos, ni a la CBG.

Para la obtención de la recta de Scatchard nos basamos en los resultados de cinco concentraciones seriadas de hormona y por duplicado. Sin embargo, esta metodología presenta dificultades, por la exigencia de cantidades suficientes de tejido tumoral que en ocasiones es prácticamente imposible.

Para resolver este problema estudiamos la posibilidad desustituir la sistemática anterior por otra técnica más simple que consiste en utilizar nada más que un sólo punto, correspondiente a las concentraciones más elevadas de hormona, tanto para los RE como par los RPg.

El coeficiente de correlación que obtuvimos entre los resultados de los dos métodos para los RE fué muy elevado, lo que nos indicó que podíamos utilizar el método monopuntual con un margen muy aceptable de fiabilidad.

Con respecto a los RPg el coeficiente de correlación entre ambas técnicas no fué tan elevado, no obstante también indicaba una asociación positiva entre ambos métodos.

Aunque no podemos valorar la capacidad de afinidad del receptor y el error en la cuantificación de los receptores aumenta, cuando nos vemos obligados, por la escasa cantidad de material tumoral, a utilizar la técnica monopuntual podemos hacerlo con un margen de confianza aceptable.

Varios estudios (213-214) han mostrado que ambas técnicas son equivalentes para evaluar la concentración del receptor. Aunque en la práctica la medida del valor de la Kd añade mayor rango de confianza ya que nos indica la especificidad de unión de la reacción.

El ensayo monopuntual, debe recomendarse sólamente cuando el análisis de receptors esteroideos tiene que realizarse en pequeñas muestras de biopsias.

NICOLO (213) obseva también una excelente correlación, cuando compara los resultados obtenidos con el método de Carbón-Dextrano con cinco puntos en el Scatchard y el método de una sóla concentración saturante de hormona. El coeficiente de regresión que obtiene es de 0,99.

El desarrollo de ensayos de rutina requiriendo menos tejido es un tema de interés para la mayoría de laboratorios clínicos. MAGDALENAT (215) y SILVERWSWARD (216) realizan un test simple usando el 3 H*Estradiol y 3 H*5020, para la determinación de RE y RPg sobre mateial procedente de aspirados por aguja, y esto podría ser de una gran ayuda.

Los valores de RE y RPg encontrados en los tumores malignos de mama varían con un amplio rango de 0-1000 fmol/mg para los RE y desde 0-5000 fmoles/mg para los RPg. En nuestro estudio, con ideramos receptores positivos aquellos valores $\geq$ de 10 fmoles/mg. de proteína. Este límite, está basado en los resultados publicados por la mayoría de autores (102, 107, 154). Pensamos que lo ideal sería que cada laboratorio determinase el límite inferior para su ensayo, tanto en relación con la sensibilidad de la técnica, como correlacionando los niveles de receptores y las respuestas tumorales a tratamientos hormonales en la clínica. Con los datos de respuesta obtenidos se podría hacer una línea arbitraria, a partir de la cual los especímenes podrían ser etiquetados como rico o pobre en receptores. Cuando mayor sea el número y el tiempo de seguiemiento de las pacientes más discriminativo será este valor límite.

En nuestro caso, dado el número de pacientes y tiempo transcurrido desde la puesta en marcha de la técnica, nos resulta imposible determinar dicha línea de separación.

Está plenamente establecido que aquellos tumores con menos de 3 fmol/mg. de proteína son considerados RE y RPg negativos. El valor límite para considrar un tumor como RE y RPg positivo está más discutido. Generalmente se acepta que aquellos que tienen un valor por enci ma de 10 fmol/mg. de proteína son positivos. Las concentraciones entre 3 y 10 fmol/mg. son considerados indeterminados. Cuando el nivel de RE en un tumor aumenta, la probabilidad de una respuesta objetiva a la hormonoterapia se incrementa. La proporción de respuestas en el grupo de RE con valores de 0-9 fmol/mg. es sólamente un 9% frente a un 30% en aquellos tumores entre 10-20 fmoles/mg. Para los tumores con valores entre 20-50 fmoles/mg. la respuesta objetiva fué de un 63% . En aquellos tumores con valores mayores de 50 fmol/mg de proteína la respuesta objetiva es mayor del 70% de las pacientes (107).

Los valores de la Kd van de 10^{-10} a 10^{-11} M para los RE y de 10^{-9} a 10^{-10} M para los RPg. Cuando la Kd está presente en estas concentraciones es indicativo de la presencia de receptores específicos de estrógeno y progesterona respectivamente (217).

Dado que la determinación de receptores hormonales en la clínica está considerada una técnica que debería realizarse rutinariamente por la información que proporciona a la hora

de plantear estudios clínicos y adoptar decisiones terapeúticas, el proceder analítico, debe estar rigurosamente estandarizado y ser rigurosos con los datos suministrados.

Debido a la complejidad de la técnica y el hecho de que se haya convertido en un análisis cotidiano, requiere una cuidadosa puesta a punto, así como tener establecidos los controles necesarios para poder verificar en todo momento el rigor de la misma.

El cuidado que hay que tener al determinar los receptores hormonales, no queda relegado sólo a la técnica en sí misma, sino también a la recogida, almacenamiento y tratamiento de las muestras problema.

Las fuentes de variación pueden investigarse utilizando unos controles adecuados. El material de control estable puede ser tejido liofilizado o tejido homogéneo congelado (218-219).

La técnica de Carbón-Dextrano para la cuantificación de receptores esteroideos comprende varios procesos. El rango de valores de receptores obtenidos para un tejido pulverizado y homogeneizado puede atribuirse a variaciones técnicas encontradas en cada uno de los pasos de este método.

Para analizar la reproductibilidad de la técnica en nuestro laboratorio, y poder establecer un control de calidad, así como investigar como influyen las diferentes etapas de la misma en la variación de los resultados, se ha utilizado un tejido pulverizado de útero de vaca considerado homogéneo y

rico en RE y RPg como control positivo.

Analizamos la variabilidad intraensayo en 12 alícuotas de un mismo lote de tejido pulverizado. Obtuvimos un coeficiente de variación de un 11% para los RE y de un 12% para los RPg.

Estos datos coinciden con los de otros autores como HAWKINS (126) que encuentra una variabilidad de un 14-15% en múltiples determinaciones de un mismo bloque de útero de rata.

La variabilidad encontrada por RAAM y cols. (212) fué algo mayor que la encontrada por nosotros. Ellos atribuyen este coeficiente de variación al proceso de homogeneización, que realizan manualmente.

En nuestro laboratorio, aunque el proceso de homogeneización también es regulado manualmente, el tiempo de cada uno de estos ciclos de homogeneización está bien establecido, así como el intervalo de tiempo que supone el enfriamiento de la muestra entre cada uno de los ciclos.

No obstante, analizamos la variabilidad que obteníamos cuando este paso de homogeneización no intervenía en la metodología. Para ello, realizamos la técnica a partir de 12 fracciones de un mismo citosol, analizadas simultáneamente. El coeficiente de variación que obtuvimos fué de un 6% para los RE y de un 8% para los RPg.

Cuando comparamos las varianzas obtenidas intra-

ensayo con tejido pulverizado y con un "pool" de citosol, observamos que las diferncias fueron estadísticamente significativas en cuanto a los RE, pero no para los RPg. Comprobamos por tanto, que la homogeneización contribuía a una variación mayor dentro del ensayo.

HAHNEL y VIVIAN (121) analizan tambien la variabilidad de la técnica a partir del citosol y el coeficiente de variación que obtuvieron fué de un 5-8% cuando el citosol contenía concentraciones elevadas de receptor.

Los resultados obtenidos en nuestro laboratorio en cuánto a las variaciones intra-ensayo de la técnica de Carbón-Dextrano, tanto en un tejido pulverizado como en un "pool" de citosol, nos permiten adoptarla para el proceder rutinario de la determinación de receptores en tejido tumoral de mama.

Para investigar las variaciones inter-ensayo de la técnica, con diferentes preparaciones de esteroides, distintos tampones y soluciones standrds para las proteínas, y además averiguar la influencia en cuánto a la conservación de la muestra con respecto al período de tiempo transcurrido, realizmos la técnica en diferentes días, en un mismo tejido pulverizado y en un mismo citosol.

Las variaciones inter-ensayo encontradas en distintas fracciones de un mismo citosol en diferentes día fué de un 9% para los RE y de un 11% para los RPg. Estos datos revelan que las variaciones debidas a diferentes preparaciones de esteroides,

de proteínas standars y las diferentes condiciones de ensayo no son significativamente mayores que las variaciones obtenidas cuando todas las condiciones son idénticas.

Existen estudios que señalan pérdidas importantes de receptores cuando se realiza la técnica sobre fracciones de citosol congelados (87). En nuestro estudio aunque el tiempo de conservación del citosol congelado fué corto, tan sólo 10 días, no se observaron pérdidas significativas del receptor.

El coeficiente de variación inter-ensayo que obtuvimos en el tejido pulverizado congelado fué de un 20% para los RE y de un 22% para los RPg.

Cuando comparamos la varianza de los resultados intra-ensayo e inter-ensayo para un tejido pulverizado, no se observan diferencias significativas entre ellas.

Otros autores (212) encuentran un coeficiente de variación inter-ensayo entre un 21% y un 44%, si bien hay que resaltar que el intervalo de tiempo entre los diferentes ensayos en nuestro estudio fué de tan sólo 60 días, comparado con el de estos autores que fué mínimo de 1 mes y máximo de 5 meses.

El tiempo que puede conservarse una muestra congelada sin apreciar pérdidas significativas del receptor,según los resultados publicados por diversos investigadores no es concluyente ya que algunos no aprecian pérdidas significativas en el transcurso de dos meses (220), y otros (221) no objetivan

pérdidas importantes en cuanto al RE en al menos 4 meses de conservación de la muestra a -80ºC.

Los resultados de nuestro estudio en cuánto a las pérdidas observadas en el transcurso de los 60 días no fueron importantes, como se desprende del coeficiente de variación obtenido.

Analizamos también la reproductibilidad de nuestros datos en cuanto a los valores de la proteína en muestras de citosol y en tejidos pulverizados, estudiados en un mismo día o en día separados, y claramente comprobamos que las fluctuaciones inter-ensayo o intra-ensayo en las medidas de proteínas son esencialmente constantes.

La falta de reproductibilidad en los valores de la proteína ha sido la responsable en muchos estudios de control de calidad, de la variabilidad intra-ensayo en cuanto a los valores de receptores, ya que estos se expresan en fentomoles/mg. de proteína (222).

En nuestro ensayo se comprueba que la variación en los valores de la proteína se mantienen más o menos constantes, no pudiendo ser atribuída la variabilidad obtenida a la falta de reproductibilidad de los valores de la misma.

La Kd tambien fué analizada y se vió que la variabilidad de la misma fué mayor cuando las muestras a estudiar fueron congeladas y esta diferencia era superior en la fracción de citosol conservado a -80ºC. No encontramos una explicación

válida para este fenómeno. Aunque posiblemente es debido a la congelación y descongelación del citosol, lo que ejerce una influencia en la reacción y altera los valores de la Kd.

En conclusión, la variabilidad en la cantidad de RE y RPg que se observa en nuestro laboratorio en los citosoles preparados a partir de un lote de tejido de útero de vaca pulverizado o de un citosol del mismo analizado simultáneamente o en ensayos separados no se debe principalmente al paso del tiempo ni a las diferentes cantidades de ligandos añadidos, ni a las variaciones en la medida de las proteínas, sino que posiblemente se deba a otros factores implicados en la técnica. La homogeneización del tejido si que hemos observado que tiene una influencia en la variabilidad de la misma, posiblemente por desnaturalización térmica de las proteínas. Esto conlleva a establecer un control más estricto del número de veces que el tejido es pulverizado y homogeneizado, ya que disponemos de un homogeneizador controlado manualmente.

Consideramos que se deberán promover controles de calidad inter-laboratorios, para poder precisar los errores metodológicos, que de no ser así, posiblemente no los detectamos.

Además es necesario reconocer y eliminar las diferencias en cuanto a los métodos usados por los distintos laboratorios en orden a que los resultados sean comparables, y la fiabilidad de los datos del ensayo de receptores hag que se puedan comparar con otros parámetros clínicos de enfermedad.

Analizamos el efecto de la temperatura en la conservación de las muestras de tejido pulverizado. Si estas fueron conservadas a -80ºC durante 60 días se obtuvo un coeficiente de variación de 20% par los RE y de un 22% para los RPg y cuando se conservaron con nitrógeno líquido (-196ºC) durante el mismo período de tiempo la variación que se encontró no fué mucho menor. Lo que nos hace concluir que se pueden utilizar ambas formas de conservación de las muestras tumoales sin que se produzcan pérdidas apreciables en el receptor.

Nuestros resultados coinciden con los datos obtenidos por otros investigadores (221-223) que no encuentran pérdidas significativas en tejidos congelados a -80ºC durante dos meses, tiempo máximo que nosotros mantenemos congelado el útero de vaca.

La mayoría de programas de control de calidad inter-laboratorios publicados en la literatura, utilizan como control positivo tejidos liofilizados,los cuales son mucho más estables, y las pérdidas que se observan en cuanto a receptores son menores con el paso del tiempo. El tejido liofilizado se puede conservar durante más de 6 meses sin evaluarse pérdidas importantes (218).

Algunos autores (219) no obstante, incluso para ensayos de control de calidad inter-laboratorio, también han utilizado tejido congelado de útero de vaca, viendo que si su conservación es adecuada, puede ser útil para este fín.

Con estos medios nosotros esperamos una mayor concordancia entre el resultado bioquímico y la respuesta a una terapeútica hormonal de un umor definido en el ensayo como receptor positivo.

Una vez comprobada la técnica de determinación de receptores hormonales en nuestro medio, estuvimos en disposición de utilizarla en la clínica diaria.

Han sido estudiadas una seie de pacientes, todas ellas diagnosticadas de carcinoma de mama. Distinguimos tres grupos dependiendo de la extensión de la enfermedad:

1.- Tumores localmente avanzados (T_{3b-4} N_{0-3} M_0) y con características evolutivas Pev 1,2,3, que eran inoperables de entrada; Este grupo de pacientes recibieron un tratamiento con quimioterapia previo a cualquier manipulación sobre la tumoración.
2.- Pacientes con enfermedad metastásica, habiéndose determinado los receptores, sobre lesiones accesibles a biopsia.
3.- Pacientes con carcinoma de mama en las que la actuación quirúrgica fué la primera arma terapeútica utilizada.

1.- Tumores localmente avanzados.- Antes de analizar los resultados obtenidos en este tipo de tumores, tenemos que destacar que todas las pacientes habían recibido quimioterapia previamente a la obtención de la muestra sobre la que se determinaría el ensayo de receptores. Así mismo dos pacientes habían recibido radioterapia.

De los 20 tumores que analizamos, doce tenían un tiempo de duplicaciónrápido, menor de 6 meses (PEV 2) y dos eran carcinomas inflamatorios.

Encontramos Receptores de estrógeno positivos en un 32% de los casos y en un 24% se detectaron receptores de progesterona positivos. Valores significativamente menores que los hallados en el grupo de pacientes con estadios I-III en nuestro estudio.

KANTAIJAN y cols (224) determinan los RE en 47 pacientes con tumores localmente avanzados de mama, siendo en un 53% positivos y en un 47% negativos. Resultados que no difieren de los encontrados en otros estadios de la misma enfermedad.

Cuando en pacientes con cáncer de mama metastásico se han determinado secuencialmente los receptores hormonales antes y después de haber recibido tratamiento con quimioterapia no se observan modificaciones significativas en cuanto al porcentaje de muestras positivas o negativas. HULL (144) observó en 4 pacientes RE positivos en las que se realizó una segunda biopsia tras la administración de quimioterapia, un incremento de los niveles de RE. En los que inicialmente tenían RE-, no observó ninguna modificación.

POUILLART comunica, que los tumores de mama, en los que se supone la existencia de una población mixta de células con y sin receptores hormonales, tras quimioterapia au-

mentan proporcionalmente los valores de RE y RPg.(Com. personal)

BRESSOT y cols (225) encuentran una disminución significativa del porcentaje de tumores RE y RPg positivos cuando las pacientes han sido tratadas con radioterapia antes de la recolección de la muestra para la determinación de receptores.

El hecho de que en nuestro estudio obtengamos un porcentaje de receptores hormonales positivos menor que el hallado por otros autores, no creemos que esté en relación con la terapeútica administrada anteriormente a la recogida de la muestra sobre la que se realizó el ensayo, sino más bien por las características que presentaban las pacientes que hemos estudiado. El 70% de ellas tenían tumoraciones que clínicamente fueron clasificadas como PeV 2 y 3, lo que conlleva a que son tumores mucho más indiferenciados y con una mayor fracción de crecimiento celular (140-141).

Así mismo el mayor porcentaje de pacientes en este grupo eran premenopaúsicas.

PIERA y cols (226) observan que dentro de los tumores localmente avanzados, existe un subgrupo de peor pronóstico caracterizado por ser pacientes más jóvenes, con tumores de evolución rápida, con caractirísticas pseudoinflamatorias y con determinaciones de receptores en la mayoría de los casos negativos.

LEVIN y cols (227) en un grupo de pacientes con

PEV-2 obtiene un 35% de RE positivos, y en la mayoría de los casos encuentra el fenotipo RE+ RPg- . Asímismo, en otro estudio del Instituto Gustave Roussy, tan sólo encuentran RE+ RPg+ en un 28% de los tumores inflamatorios (141).

MEYER y cols. (137) así como SILVESTRINI y cols. (138) han mostrado que los tumores con una alta fracción de crecimiento medida por el lábelix index (LI) son con mayor - frecuencia receptores negativos.

2.- Lesiones metástasicas.- Cuando analizamos los resultados de las 40 biopsias de lesiones metastásicas en relación a su contenido de RE y RPg un 52% son RE positivos y un 44% RPg positivos, resultados que coinciden con los publicados por la mayoría de autores (98,105,227).

Analizando la concordancia de RE y RPg en las - metástasis encontramos que la distribución de los distintos - fenotipos es similar en este grupo de pacientes que los que - aparecen en estadios precoces de la enfermedad.

VIHKO y cols (106) sin embargo señalan que el -- fenotipo RE+ RPg+ es menor en el grupo de pacientes metastá- sicas que en el de pacientes con tumores localizados. Y sugie ren que las metástasis pueden perder en el curso de la enfer medad su carácter hormonodependiente, y aconsejan determinar el estado del receptor cuando aparecen las metástasis.

Aunque la demostración de esta teoría requeriría un seguimiento del estado de RE y RPg en pacientes individualmente, durante el curso de la enfermedad y de su tratamiento, existen datos en la literatura donde realizando ensayos secunenciales encuentran una correlación para los RE de un 85% y para los RPg de un 80% (154) en el momento de las metástasis en relación con la determinación en el tumor primario, por lo cual, la mayoría de autores coinciden en señalar que la determinación de receptores en el momento de la mastectomía es un indicador válido para la respuesta al tratamiento hormonal -- cuando aparece la metástasis.

En nuestro estudio no analizamos la supervivencia de las pacientes del grupo con receptores positivos por el -- corto espacio de seguimiento, y por el pequeño número de pacientes. Otros autores han publicado que los receptores positivos, sobre todo los de progesterona en las pacientes con metástasis por carcinoma de mama, además de servirnos como índice de respuesta al tratamiento endocrino, son un factor pronóstico en cuánto a la supervivencia. POULLART (202) en una comunicación reciente demuestra que las pacientes con RPg positivos tienen una supervivencia significativamente mayor que las del grupo con RPg negativos.

3.- Tumores localizados de mama.- En este tipo de tumores la distribución de receptores de estrógeno positivos y negati-

vos encontrada en nuestro estudio coincide con la mayoría de los publicados en la literatura, cuando el nivel de positividad que se adopta es el mismo (96,102,103,105).

En cuánto a la incidencia de RPg en este grupo de tumores, nuestros resultados coinciden con la mayoría de autores (102,103,127). THORPE (228) encuentra una mayor incidencia de ellos en su estudio, comparados con otros autores, lo cual atribuye a la diferente metodología empleada.

OSBORNE y cols. (101), encuentran un índice menor de positividad que la que vemos en nuestro estudio. Una posible explicación para este hecho es que utiliza la técnica de gradiente de densidad sucrosa para el análisis de los RPg en donde se evalua solamente la fracción 8S unida, y no los RPg que se encuentran en la 4S, siendo así que ambas fracciones 8S y 4S unidas son analizadas usando el método de carbón-dextrano.

Cuando analizamos los resultados conjuntamente de RE y RPg en un mismo tumor encontramos una concordancia global de un 73,3%. Ambos receptores positivos en un 44,4% y -- ambos negativos en 33,3%. Encontramos un 25,7% de discordancia, repartidos en fenotipos RE+ RPg- o RE- RPg+. Este último fenotipo lo encontramos con menor frecuencia.

Cuando analizamos los datos de la literatura, los resultados en cuánto a distribución de fenotipos, resultan similares en casi todas las series publicadas.

FISHER (102) hace la distribución en mujeres de menos de 50 años y más de 50 años, y sus resultados también coinciden con los nuestros, exceptuando el grupos con RE- RPg+. El encuentra en este fenotipo una incidencia mayor (12%) que la mayoría de autores, que encuentran tan sólo de un 3-5%. En nuestro estudio encontramos un 6,7% de los tumores con este fenotipo.

De acuerdo con el concepto actual de que los RPg son el producto final de la estimulación estrogénica, estos -- hallazgos de discordancia encontrados podrían atribuirse a errores metodológicos. Sin embargo, la presencia constante en todas las series, de algunos pacientes con tal discordancia en sus tumores, hace pensar que no son errores técnicos, sino que pueden existir otras razones que lo expliquen.

OSBORNE (101) analiza los datos de varias institu-- ciones en cuánto a fenotipos de RE y RPg y los correlaciona con la respuesta tumoral a un tratamiento endocrino. Comprueba que aquellos tumores RE- RPg- son normalmente hormonoindependientes y responden infrecuentemente a la terapeútica endocrina.

Una alta proporción de respuestas (77%) se observa en los tumores RE+ RPg+ comprobando la validez de la hipótesis de que los RPg+ son un marcador de la dependencia endocrina.

Sin embargo, el grupo RE+ RPg- a los que cabría suponer que ninguna pacientes respondiese, lo hacen en un 28%. Varias posibilidades se han dado para explicar este fenómeno. En las pacientes postmenopaúsicas que la cantidad de estrógenos circulantes fuese insuficiente para sintetizar el receptor de progesterona. DEGENSHEIN (220) estudia el efecto del tratamiento durante tres días antes de la biopsia con DES y encuentra que tumores que tenían este fenotipo pasan a ser RE+ RPg+.

SAEZ (111) sugiere que los niveles circulantes de estrógenos en las pacientes postmenopaúsicas son suficientes - para estimular los RE y RPg cuando los receptores de estrógeno son funcionales, y que los niveles de estrógenos circulantes, de origen adrenal, en las pacientes postmenopaúsicas son similares al estradiol circulante durante la fase folicu-- lar del ciclo menstrual en las pacientes premenopaúsicas.

El mismo analiza la causa de este fenotipo RE+ RPg- en las pacientes premenopaúsicas y observa que los altos niveles de progesterona endógena durante la fase luteínica del ciclo menstrual podrían enmascarar los sitios receptores o inhibir la síntesis de RPg resultando un ensayo RPg falsamente negativo.

MARTIN y cols (113) encuentran que en el grupo de edad de 50-60 años tiene una alta incidencia de RE+ RPg- y observa que es el grupo perimenopaúsico. Es bien conocido que -

el estado endocrino muestra apreciables variaciones de los niveles de estrógeno y progesterona durante este período, resultado de una inadecuada función del cuerpo lúteo, y piensa que un tumor que contiene RE y no RPg puede no ser debido a la desdiferenciación del tumor, sino a cambios en el estado hormonal del huésped.

Cuando se analiza el fenotipo RE- RPg+ que aparece con mayor frecuencia en pacientes premenopaúsicas, también se ha comprobado que el índice de respuestas es de un 53%. Un trabajo reciente de HORWITZ (230) sobre una línea celular --- (T 47D) obtenida de cáncer de mama humano, sugiere que estos tumores pueden carecer de RE citoplásmico, pero si contener RE nucleares, responsables de la síntesis de RPg. Si esto fuese así, estaríamos ante la presencia de un tipo particular de tumores hormonodependientes.

Otras hipótesis se han dado para explicar la ausencia de RE citoplásmicos en presencia de RPg; por ejemplo, la saturación de los RE citoplaśmicos por las tasas elevadas de estrógenos circulantes en el caso de mujeres premenopaúsicas.

Tras el análisis de todos estos fenotipos discordantes que aparecen en la mayoría de las series también se puede pensar que la hipótesis de que los RPg son la expresión de un mecanismo intacto de los RE, sea imperfecta y la síntesis de RPg pueda no estar tan intimamente ligada al proceso de crecimiento tumoral y no ser un predictor seguro en todos los -- casos de la hormonodependencia de un tumor.

Relación entre níveles de RE y Frecuencia de aparición de RPg.-

La distribución de RPg positivos con respecto a los niveles de RE en nuestro estudio sugieren que entre ambos receptores existen interrelaciones. La frecuencia de encontrar RPg positivos aumenta conforme los níveles de RE se elevan. Cuando éstos fueron mayores de 100 fmoles/mg. se encontraron RPg positivos en un 85,7%. En cambio cuando el nivel de RE fué menor de 3 fmoles/mg., tan sólo se encontraron 13% de los tumores - con RPg positivos.

Con estos resultados vemos que la probabilidad de encontrar RPg positivos incrementa, según aumenta el nivel de RE.

Estos hallazgos parecen corraborar la hipótesis de que la producción de RPg en las células de cáncer de mama es el producto final de una cadena de pasos bioquímicos regulados por los estrógenos, y por tanto RPg podría ser un marcador de un sistema funcionalmente intacto de RE.

Se puede plantear la cuestión de que si ambas determinaciones son necesarias para indicar la hormonodependencia de un tumor, o si con sólo los niveles cuantitativos de RE es suficiente, ya que los RPg pueden ser un marcador de aquellos tumores con contenido alto de RE.

McGUIRE y cols. (96) realizan un ensayo con 65 - pacientes conociendo los niveles de RE y RPg y observan que

los RPg positivos son un mejor discrimiante para la respuesta objetiva que si se utilizan sólo los valores cuantitativos de RE. Ochenta por cien de las pacientes con RE+ RPg+ respondieron - objetivamente a la terapeútica hormonal, en contraste a sóla-- mente 63% de aquellas pacientes en que el contenido de RE fué más de 100 fmoles/mg. Lo cuál es un argumento a favor de la medida de ambos receptores.

RE y RPg según el estado menopaúsico.

En nuestro estudio los tumores de las pacientes pre-menopaúsicas contenían bajos niveles de RE en contraste con los tumores de las pacientes postmenopaúsicas. Y la misma relación encontramos cuando analizamos la distribución de RE positivos en ambos grupos.

La frecuencia de tumores RPg positivos fue similar en ambos grupos menopaúsicos. Los niveles de RPg fueron ligera mente superiores en la premenopausia, aunque estas diferencias no fueron significativas.

Nuestros resultados coinciden con la mayoría de los publicados por otros autores, cuando analizan el estado meno-- paúsico, sin dependencia de la edad.

Aunque son pocos los autores que han estudiado los niveles de RPg en relación con el estado menopaúsico, la mayo-ría no encuentran que exista relación con él, cuando se estudia

independiente de la edad (101-103, 105).

SAEZ (231) encuentra una frecuencia de RE y RPg aproximadamente igual en pre y postmenopaúsicas. No obstante señala que el contenido de Re es mucho más alto en las mujeres postmenopaúsicas.

Como los RPg pueden ser considerados como un marcador de la acción estrógenica estos resultados en cuánto a distribución de RE y RPg podrían indicar que la expresión de la acción estrogénica, como es la síntesis de RPg en estos dos grupos es idéntica, pero que la aparición de RE en el citosol de las pacientes premenopaúsicas es menor.

Esta hipótesis es corroborada por los hallazgos de DeSOMBRE (232) que muestra que en pacientes premenopaúsicas con bajas concentraciones de RE, el índice de respuesta a una terapeútica endocrina es más elevado que en postmenopaúsicas.

Incidencia y niveles de RE y RPg en relación con la edad.

En nuestro estudio cuando la edad de las pacientes se correlacionó con el porcentaje de RE positivos se encontró que aumentaba con la edad. En cambio, no se encontró ninguna relación en cuánto a la incidencia de RPg positivos en los distintos grupos de edad.

La proporción de tumores con niveles de RE mayores de 10 fmoles/mg. ó más aumenta en cada década de vida, desde

las mujeres más jóvenes a las de más edad. En cuánto a los valores de RPg. estos permanecen más o menos estables en todas las décadas de vida, exceptuando el grupo de pacientes de menos de 40 años, que pensamos que no es valorable, dado el escaso número que comprende.

Estos hallazgos indican que la expresión de un tumor en cuanto a RE se correlaciona con la edad y que las pacientes de mayor edad tienen más alto contenido de RE, estando nuestros resultados de acuerdo con los hallazgos de otros autores (101-102, 105,113-114).

ELWOD y GODOLPHIN (238) encuentran sin embargo - una disminución de RE en el grupo de pacientes de más de 75 años, lo que no ha sido observado por el resto de investigadores.

La mayoría de estudios previos han comunicado que las mujeres postmenopaúsicas tienen altas concentraciones de RE en comparación con las mujeres premenopaúsicas. Sin embargo, las relaciones entre edad y niveles de RE no están tan claras.

BIRD y cols (234) observan que la proporción de -- muestras positivas no incrementa con la edad, pero si la media en cuánto a contenido de RE.

LESSER y cols (235) señalan un significativo incremento de RE con la edad entre mujeres postmenopaúsicas pero no entre pacientes premenopaúsicas.

Además existen discrepancias o controversias sobre

cuál es la causa que puede producir las diferencias observadas en cuanto a distribución de RE y RPg entre las pacientes pre y postmenopaúsicas y entre las pacientes con diferente edad.

Diversos autores (111,114) sugieren que las diferencias observadas en cuánto a distribución de RE y RPg entre pre y postmenopaúsicas puede meramente reflejar diferencias en las fluctuaciones hormonales. Y que el contenido de receptores esteroideos en un cáncer de mama podría ser modulado por las hormonas circulantes.

Otros (112,233) en cambio, opinan que el porcentaje superior de RE que se observa en las postmenopaúsicas se debe a su mayor edad.

Una de las explicaciones que se han dado de porqué las pacientes más jóvenes tienen valores más bajos de RE, es - que las pacientes premenopaúsicas tienen altos niveles de estrógenos circulantes que podrían unirse al receptor haciendo que éstos no fueran medibles por las técnicas de rutina. Apoyando esta hipotesis SARRIF (151) observa que aquellos tumores - - - RE- RPg+ tratándolos con dextrano se transforman en RE+ RPg+.

Diversos autores (75,114) observan que altos niveles de hormona endógena dá lugar a bajos níveles de RE.

NAGAI (236) en cambio, encuentra que los niveles de estradiol en el citosol no se correlaciona con los niveles de estrógeno en plasma. FISHAMAN y cols (237) midiendo simultáneamente RE y níveles de estradiol en el citosol no encuentran relación entre altos níveles de estrógeno y contenido ba

jo de RE.

Este último autor concluye que la presencia de estrógenos endógenos no dá lugar a la aparición de RE falsos negativos.

Por otra parte SAEZ (231) sugiere que los altos niveles de progesterona endógena en las pacientes premenopaúsicas pueden limitar la estimulación y la síntesis de RE y observa - que las principales diferencias en cuánto a contenido de receptores observadas entre pacientes jóvenes y mayores, está en relación a los receptores de estrógeno, y lo atribuye a que después de la menopausia el nivel medio de estrógenos plasmáticos es similar al estradiol durante la fase folicular, y se piensa que es suficiente para estimular directa o indirectamente a los RE. Pero esta estimulación no se evita ni frena por el efecto de la progesterona, ya que los níveles plasmáticos de ésta permanecen bajos, y concluye que esta es la razón por la que se observa mayor nivel de RE en las pacientes postmenopaúsicas.

HOLDAWAY y cols (238) sugieren que el incremento de RE positivos con la edad podrían resultan de un proceso de "homeostasis" en el que los receptores aumentan ante la deficiencia de estrógenos.

Otros autores opinan que el porcentaje de RE superior que se observa en las postmenopaúsicas se debe a su mayor edad, y no al estado menopaúsico.

ELWOOD y GODOLPHIN (238) y CLARK (112,233) sugie

ren que las diferencias en cuánto a contenido de Re en los diferentes grupos de edad, no es probable que se deban a - simples diferencias en la concentración de estradiol circulan te o en tejido y a su efecto de saturación de receptores.

Estos autores en su estudio, analizan el estado menopaúsico y edad de las pacientes conjuntamente para deter minar su influencia en cuánto a la posibilidad de encontrar receptores y estudiar cuál de los dos factores influye en el es tado del receptor en el tumor.

Sus datos demuestran que no existen diferencias en cuanto a contenido de RE entre pre y postmenopaúsicas de la misma edad; esto podría ser un argumento en contra de lo ante rior.

ALLEGRA (239) y MARTIN (113) en un estudio similar al que realizan los autores anteriores, encuentran que la edad no tiene efecto dentro de las categorías menopaúsicas. Sin embar go el tamaño de la muestra en ambos estudios fue pequeña para valorar tales comparaciones entre pre y postmenopaúsicas de la misma edad.

FISHER (133) encuentra una fuere correlación entre los RE y la edad, y una débil correlación con el estado meno- paúsico en un grupo de 178 pacientes.

BERTUZZI y cols (240) encuentran que la actividad proliferativa de los tumores de pacientes con el mismo estado menopaúsico fue más alta en los tumores RE negativos que en

los RE positivos.

La actividad proliferativa decrece desde la premenopausia hasta la postmenopausia en ambos RE positivos y RE negativos.

MEYER y cols (137) han sugerido que un tipo de cáncer de mama, caracterizado por rápida proliferación y bajo contenido de RE ocurre predominantemente en mujeres jóvenes; por el contrario en las mujeres mayores es más frecuente la existencia de tumores con una pequeña proliferación celular y alto -- contenido de RE.

Con lo cual estos podrían ser otros de los factores que contribuyen a la relación inversa existente entre receptores de estrógenos y edad de las pacientes. La edad puede jugar un papel determinante en la proliferación celular del cáncer de mama.

Existen pocos trabajos que investiguen las relaciones entre RPg y edad de las pacientes y todos ellos concluyen que no existen relaciones entre ellos.

CLARK (112) coincide con todos los autores, cuando analiza por separado la edad y los RPg no encontrando ninguna relación entre ellos. Sin embargo, cuando compara mujeres pre y postmenopaúsicas de la misma edad, encuentra un mayor porcentaje de RPg positivos en las pacientes premenopaúsicas, así como un mayor nivel de receptor, y además dentro de este grupo de pacientes encuentra que aumentan con la edad. La explicación

para este incremento de los RPg en las mujeres premenopaú-sicas por encima de los 40 años no está claro. Pero estos -- autores concluyen que no es probable que la relación observada sea simplemente el resultado de la diferencia en la concentración de progesterona circulante y la consiguiente saturación de los sitios del receptor.

RE y RPg según la fase del ciclo menstrual.

SAEZ (231) sugiere que en mujeres premenopaúsicas los altos niveles de progesterona pueden inhibir los RPg, y que la concentración de RPg en mujeres premenopaúsicas puede depender de la fase del ciclo en que se encuentren en el momento en que se obtiene la biopsia.

Nosotros en nuestro estudio investigamos las relaciones entre la fase del ciclo menstrual en que se encontraban las pacientes en el momento de la mastectomía y el porcentaje de Re y RPg encontrado en sus tumores.

Los valores de RE y RPg positivos no variaron significativamente en ninguno de los períodos considerados. Pero se encontró un mayor porcentaje de RPg positivos en aquellas pacientes que fueron intervenidas en los primeros días del ciclo menstrual. Este porcentaje de positividad fue disminuyendo en las siguientes fases del ciclo. Pero las diferencias no son significativas.

Esto puede indicar que los RPg incrementan de --

acuerdo al aumento de niveles de estrógeno, que en los primeros días del ciclo menstrual son más elevados.

En nuestro estudio, los resultados en cuánto a diferencias de RPg positivos en los diversos períodos del ciclo menstrual no se encuentran tan claramente distribuídos como ha señalado SAEZ (231).

Este mismo autor, cuando determina los niveles de progesterona en plasma, encuentra que los RPg disminuyen cuando los niveles de progesterona se encuentran elevados. También observa que los niveles de estrógeno en pacientes premenopaúsicas pueden influir en la positividad de RPg y que a menor nivel de estradiol, menor proporción de RPg positivos.

RE y RPg en relación con el tamaño tumoral

Al igual que la mayoría de autores (121-124), no encontramos diferencias significativas en cuánto a tamaño tumoral y contenido de receptores. Si bien en nuestro estudio, sin ser significativo, observamos una ligera disminución de receptores en aquellos tumores mayores de 5 cm. sobre todo en cuánto a contenido de RPg.

Por el contrario, algunos autores (112, 120, 238) encuentran una tendencia en los tumores grandes a ser RE y RPg negativos. Esto podría explicarse porque los tumores grandes pueden estar necrosados y la toma de biopsia, carecer de receptores o ser indicativo de enfermedad más agresiva, o lo que es lo mismo, de un tumor más indiferenciado o con mayor fracción de crecimiento.

RE y RPg en relación con el número de ganglios infiltrados.

El estado de los ganglios axilares tiene un alto - valor predictivo para el intervalo libre de enfermedad y la - supervivencia del paciente con cáncer de mama, por lo que - podría pensarse que existieran correlaciones entre ambos RE y RPg y el estado de los ganglios axilares.

Nuestras observaciones son que ni RE ni RPg se - relacionan con el número de ganglios axilares positivos. Es-- tos resultados también han sido aportados por otros investiga dores (102, 112, 241), por lo que se puede concluir que:

1º) El contenido de receptores en el tumor no es predictivo -- del grado de afectación axilar.

2º) Que el número de ganglios infiltrados no predice el estado de receptor en el tumor.

Por tanto, al ser según el resultado de grandes se ries, estas dos variables pronósticas independientes, se podría sugerir que, tanto el estado de los ganglios axilares como el contenido de RE y RPg en un tumor, podrían utilizarse en com binación para estratificar a las pacientes en los ensayos clí- nicos.

Variación intratumoral en el contenido de RE.

La causa por la que un cierto número de pacien- tes RE positivos fracasen al tratamiento, así como el que --- ciertos tumores RE negativos respondan al mismo, no está --- aclarada. Según la experiencia de distintos autores, una ex-

plicación a estos hechos estaría en la variabilidad en el contenido celular de receptores en las diversas partes de un mismo tumor y, es por lo que nosotros, hemos investigado la variación intratumoral en contenido de receptores de estrógeno en un grupo de tumores de mama.

Nuestros resultados apoyan el concepto de que los tumores de mama son heterogéneos en cuánto a su contenido de células RE positivas y negativas a la vez.

La determinación de RE en cortes histológicos utilizando técnicas de histoquimia e inmunocitoquimia, sugieren que la mayoría de tumores están compuestos por elementos no tumorales y células tumorales RE positivas y RE negativas simultánealmente (242-243).

Existen estudios que han intentado correlacionar la variabilidad en el contenido de receptores hormonales en distintas partes de un mismo tumor con la diferente composición celular de las porciones estudiadas, sobre todo, en lo que se refiere a densidad de células tumorales, esclerosis e infiltrado linfocitario (145, 244). Otros autores (133, 146), sugieren que la presencia o ausencia de RE no está relacionada con el número de células tumorales en la muestra estudiada, ya que observan a pesar de existir una homogeneidad en el contenido de la celularidad tumoral de las muestras, una elevada variación regional en cuánto al contenido de receptores hormonales.

No existe acuerdo según los datos de la literatura sobre que porción de un mismo tumor es más rica en RE, el centro o la periferia. DAVIS (146) encuentra un mayor contenido en RE

en el centro del tumor que en la periferia, mientras que SILFVERSWARD (145) encuentra valores de RE progresivamente mayores desde el centro a la periferia. Las piezas tumorales estudiadas en ambos trabajos difieren en el tamaño tumoral. El segundo autor utiliza tumores de gran tamaño en los que encuentra esclerosis central en un 50% de las muestras, pudiendo ser ésta la razón de tal discordia.

Ha sido valorado también el hecho de que las variaciones cuantitativas en varias muestras de un mismo tumor sean secundarias a un error metodológico. El nivel de variación intraensayo en la técnica utilizada no justifica la existencia de resultados tan dispares para un mismo tumor, llegando incluso en algunos casos a modificar cualitativamente la clasificación de un tumor en RE positivo o negativo.

En nuestro caso, en los tumores con RE postivos en ambas muestras las variaciones de nivel de los mismos, sólo llegó a ser llamativo en dos pacientes. Otros autores han encontrado diferencias más llamativas en un mayor porcentaje de tumores, llegando hasta un 40% (143, 245).

Aunque la discordancia hallada en nuestro estudio es globalmente de un 27,5% al estudiar dos áreas de un mismo tumor, es de destacar que tan sólo en un 6,9% encontramos una discordancia mayor entre las muestras. Esto viene a significar que en más del 90% de los casos podemos tener la seguridad de que el estudio de una sólo muestra puede considerarse válido para determinar el estado del receptor y definir o no el tumor como hormonodependiente.

Aunque la determinación de receptores en distintos lugares del tumor permita una aproximación más excata a las características hormonales del mismo, no existe aún una clara evidencia de su utilidad clínica .

RE y RPg en relación a la progresión de enfermedad.

En nuestro estudio, un grupo de 137 pacientes con estadio I, II y III de cáncer de mama, tras la mastectomía, entraron en protocolo de tratamiento adyuvante con quimioterapia ± hormonoterapia. En todas ellas se conocía el estado de RE y RPg en sus tumores.

Tras un seguimiento medio de 19 meses, se observó que en 11 pacientes se había producido progresión de enfermedad. Analizando en que grupo en cuánto al estado de RE y RPg se había producido las recaídas, se observó que:

En el grupo con RE negativos, la recaída se observó en un 12,24% de las pacientes, en cambio en aquel con RE positivos se produjo en un 5,6%. Aunque estas diferencias no son significativas, se observa la mayor tendencia a recaer en el grupo con RE negativos.

Cuando analizamos a las pacientes en función del estado de RPg en sus tumores, observamos que las recaídas se produjeron con mayor frecuencia en el grupo RPg negativo, 14,7% en contraste al 2,6% que se observaron en el grupo con RPg positivo

Estas diferencias si que resultaron estadísticamente significativas.

Si analizamos conjuntamente ambos receptores en un mismo tumor y la frecuencia de recaídas, observamos que éstas se produjeron fundamentalmente en los fenotivos RE y RPG negativos y en REnegativos y RPg negativos.

Además, las pacientes que recayeron en el grupo con ambos receptores negativos, la recaída se produjo mucho más -- precozmente que en aquellas pacientes que también recayeron pero que eran receptor positivo.

Por tanto, a pesar del corto tiempo de seguimiento y, aunque no podemos sacar conclusiones a este respecto, es de señalar que en el grupo de pacientes con receptores de progesterona negativos, registró la mayor frecuencia de recaídas.

La mayorías de autores han demostrado que las pacientes con RE positivos tienen un mayor intervalo libre de enfermedad ysupervivencia que auqellas con tumores que carecen de los mismos.

VALAGUSA (200) demuestra que pacientes con ganglios negativos y RE negativos tienen un intervalo libre de enfermedad similar a pacientes con ganglios positivos.

Existen controversias en cuánto a que los RE son indicadores pronósticos dela recaída durante los primeros años tras la mastectomía, pero que éstos pierden esta cualidad posteriormente.

BERTUZZI y cols (246) encuentran que los RPg fueron un mejor discriminador de la recurrencia para pacientes con ganglios negativos que los RE.

PICHON y cols. (201) han demostrado que en el carcinoma localizado de mama, los RPg positivos son un factor de buen pronóstico, aún en los casos que presenten factores desfavorables, tales como gnaglios axilares afectos, premenopausia,etc.

CLARCK y cols. (203) observan que en pacientes con estadio II de cáncer de mama que recibieron terapeútica adyuvante la existencia de RPg fué más importante que la de RE como predictora de una mayor supervivencia libre de enfermedad. Analizando diferentes factores pronósticos, tales como tamaño tumoral, afectación axilar y tratamiento recibido, sólamente el número de ganglios positivos y la presencia de RPg, fueron significativos en la predicción de un mayor intervalo libre de enfermedad.

No obstante, se requieren largos períodos de seguimiento, para definir mejor la superioridad de los RPg sobre los RE en cuanto a su influencia en el pronóstico de esta enfermedad, y sólamente diseñando ensayos clínicos prospectivos que incluyan ambos RE y RPg. podrá ser posible evaluar la utilidad de estos dos importantes factores pronósticos.

C O N C L U S I O N E S

CONCLUSIONES.

1ª.- El coeficiente de variación observado en nuestra técnica es bajo. Por ello, y a pesar de una mayor variabilidad en los estudios de tejido pulverizado comparado con los realizados en citosol, como otros autores han apuntado, creemos que permite adoptar dicha técnica como procedimiento rutinario de determinación de receptores de estrógeno y progesterona en tejido tumoral de mama.

2ª.- La crioconservación de la muestra no introduce diferencias significativas en la determinación de receptores hormonales. Las variaciones inter-ensayo observadas en diferentes condiciones no repercuten de forma significativa en el coeficiente de variación de la técnica. La conservación, tanto a -80ºC como a -190ºC, del pulverizado no permite observar diferencias significativas durante períodos de 60 días al menos, siendo además, una fuente de tejido homogéneo y un control positivo eventual durante dicho período de tiempo.

3ª.- El ensayo monopuntual constituye una aproximación adecuada en muestras pequeñas. No obstante, debe recomendarse el empleo de la técnica standard y reservar la determina

ción de receptores en concentración única cuando no es posible la obtención de un especimen adecuado.

4ª.- La frecuencia de receptores hormonales en los tumores localmente avanzados e inflamatorios estudiados, es baja, debido, quizás, a ciertas características biológicas, como su gran indiferenciación y fracción de crecimiento elevada, que explicarían su agresividad clínica.

5ª.- La presencia de receptores en las metástasis es ligeramente inferior a la encontrada en los tumores localizados. Tanto si se debe a una evolución natural del tumor, como si es consecuencia de una selección clonal condicionada por un determinado tipo de tratamiento, debemos aconsejar la determinación de receptores hormonales en las metástasis por su reconocido valor pronóstico y por que permite individualizar la terapeútica a emplear en un paciente concreto.

6ª.- La incidencia y distribución de RE y RPg encontradas en nuestras pacientes portadoras de tumores localizados de mama coinciden con los resultados obtenidos por -- otros investigadores siendo, en nuestro caso del 61,8% y 50,1% RE y RPg positivos respectivamente.

7ª.- Hemos encontrado una relación directa entre los niveles de RE y la positividad de RPg. Nuestros resultados sustentan, pues, la hipótesis, según la cual los RPg son sin-

tetizados bajo la influencia de una estimulación estrogénica, sugiriendo una íntima relación entre el comportamiento biológico de uno y otro.

8ª.- Del mismo modo que otros autores, hemos encontrado una frecuencia y niveles de RE superiores en pacientes postmenopaúsicas, si bien éstos también aumentan con la edad, independiente del estado menstrual de la paciente, mientras que los receptores de RPg no han mostrado estas diferenicias. Aunque existe una tendencia a la disminución de los niveles de RPg durante la fase luteínica del ciclo menstrual, según nuestro trabajo, ésta no ha sido significativa y no ha existido diferencia en absoluto cuando se han estudiado los RE. Por ello, no nos es posible apoyar una teoría basada en el estado menstrual que explique la presencia de receptores dependiendo de un cierto clima hormonal. Así podríamos suponer que la evolución y características de un determinado tumor depende más de fáctores biológicos, como la edad o el grado de diferenciación tumoral o fracción de crecimiento, que de un determinado ambiente hormonal.

9ª.- No existe relación entre el estado hormonal de un determinado tumor en cuánto a su tamaño y extensión ganglionar. Pensamos que todos ellos son factores pronósticos independientes y como tales deben ser considerados a la hora de estratificar a las pacientes para estudios prospectivos.

10ª.- Nuestros resultados apoyan el concepto que los tumores de mama son heterogéneos en cuánto a su contenido de células RE positivas y negativas a la vez. Y esto podría explicarnos porqué algunos tumores considerados por el análisis de receptores hormonodependientes, se comportan de forma distinta a la esperada de acuerdo a su situación hormonal.

11ª.- La ausencia de receptores de progesterona en las neoplasias de mama de nuestro estudio, se asocia de forma significativa con un aumento de las recaídas y, probablemente con una disminución en el intervalo libre de enfermedad. Aunque esta tendencia se ha observado también para los RE, ésta no ha resultado ser significativa.

Por tanto, la determinación de receptores hormonales de estrógeno y progesterona en las pacientes portadoras de neoplasias de mama constituye una técnica reproducible, segura y de gran utilidad clínica, por lo que supone de factor pronóstico, como indicación de una determinada terapeútica hormonal o no, y en el diseño de protocolos de estudios prospectivos y estratificados que deseen contemplar con rigor todos aquellos factores de importancia clínica a la hora de diseñar un determinado esquema terapeútico.

B I B L I O G R A F I A

BIBLIOGRAFIA.

1.-Cooper AP.Lectures on the Principles and Practice of Surgery. 8ªedición. London:John Thomas Cox, 1835.

2.-Beatson GT.On the treatment of inoperable cases of carcinoma of the mamma:suggestions for a new method of treatment, with illustrative cases. Lancet 1896; ii:104-107.

3.-Ellis S, Noda G, Simpson ME. Observations on stability of growth hormone. J Biol Chem 1956; 218:115-122.

4.-Huggins C, Clark PJ. Quantitative studies of prostatic secretion: effect of castration and of estrogen injection on the normal and on the hyperplastic prostate glands of dogs. J Exp Med 1940; 72:742-762.

5.-Huggins C, Bergenstal DM. Inhibition of human mammary and prostatic cancers by adrenalectomy. Cancer Res 1952; 12:134-141.

6.-Huggins C. Endocrine-induced regression of cancers. Science 1967;156:1050-1054.

7.-Luft R, Olivecrona H. Experiences with hypophysectomy in man. J Neurosurg 1953; 10:301-316.

8.-Pearson OH, Ray BS. Hypophysectomy in the treatment of metastatic mammary cancer. Am J Surg 1960; 99:544-552.

9.-Glascock RF, Hoekstra WG. Selective accumulation of tritium labelled hexoestrol by the reproductive organs of immature female goats and sheep. Biochemistry J 1959; 72:673-682.

10.-Folca PJ, Glascock RF, Irvine WJ. Studies with tritium labelled hexoestrol in advanced breast cancer. Lancet 1961; ii:796-798.

11.-Jensen EV, Jacobson HI. Basic guide to the mechanism of estrogen action. Recent Prog Horm Res 1962; 18:387-414.

12.-Mobbs BG, Johnson IE. In vitro estrogen-binding by human breast carcinomas. Can Med Assoc J 1976; 1114:216-219.

13.-Jensen EV, De Sombre ER, Jungblut PW. Estrogen receptors in hormone responsive tissues and tumors. En: Wissler RW, Dao TL, Wood S Jr, ed. Endogenous Factors Influencing Host-Tumor Balance. Chicago:University of Chicago Press. 1967; 15-30.

14.-Terenius L. Selective retention of estrogen isomers in estrogen-dependent breast tumors of rats demonstrated by in vitro methods. Cancer Res 1968; 28:328-337.

15.-Toft DO, Gorski J. A receptor molucule for estrogens: isolation from the rat uterus and preliminary characterization. Proc Natl Acad Sci 1966; 55:1574-1581.

16.-Jensen EV, Suzuki T, Kawashima T et al. A two-step mechanism for the interaction of estradiol with rat uterus. Proc Natl Acad Sci 1968; 59:632-638.

17.-Gorski J, Toft D, Shyamala G, Smith D, Notides A. Hormone receptors: studies on the interaction of estrogen with the uterus. Recent Prog Horm Res 1968; 24:45-80.

18.-Stumpf WE. Subcellular distribution of 3H-estradiol in rat uterus by quantitative autoradiography - a comparison between 3H-estradiol and 3H-norethynodrel. Endocrinology 1968; 83:777-782.

19.-Erdos T. Properties of a uterine oestradiol receptor. Biochem Biophys Res Commun 1968; 32:338-343.

20.-Jensen EV, Numata M, Brecher PI, De Sombre ER. Hormone-receptor interaction as a guide to biochemical mechanism. Biochem Soc Symp 1971; 32:13-159.

21.-Milgrom E, Atger M, Baulieu EE. Acidophilic activation of steroid hormone receptors. Biochemistry 1973; 12:5198-5205

22.-Milgrom E, Perrot M, Atger M, Baulieu EE. Progesterone in uterus and plasma. V. An assay of the progesterone cytostol receptor of the guinea pig uterus. Endocrinology 1972; 90(4):1064-1070.

23.-Raynaud JP. Receptors in breast cancer: an introduction. En Gurpide E ed. Biochemical Actions of Progesterone and Progestins. New York: NY Academy of Science. 1977;87-89.

24.-Philibert D, Raynaud JP. Progesterone binding in the immature mouse and rat uterus. Steroids 1973; 22:89-98

25.-Horwitz KB, McGuire WL. Specific progesterone receptors in human breast cancer. Steroids 1975; 25(4):497-505.

26.-Zondek B. The biosynthesis of estrogens. Nature 1934; 133:494-495.

27.-West CD, Damast BL, Sarro SD, Pearson OH. The intermediate steps in the biosynthesis of androgens from estrogens. J Biol Chem 1956; 218:409-412.

28.-Siiteri PK. The isolation of urinary estrogens and determination of theyr specific activities following the administration of radioactive precursors to humans. Steroids 1963; 2:687-712.

29.-Mc-Donald PC, Rombaut RP, Siiteri PK. Plasma precursors of estrogen I. Extent of conversion of plasma delta-4-androstenedione to estrone in normal males and nonpregnant normal, castrate and adrenalectomized females. J Clin Endocr 1967; 27:1103-1111.

30.-Longcope C, Kato T, Horton R. Conversion of blood androgens to estrogens in normal adult men and women. J Clin Invest 1969; 48:2191-2201.

31.-Longcope C. Metabolic clearence and blood production rates of estrogens in postmenopausal women. Am J Obst Gynecol 1971; III:778-781.

32.-Judd HL, Lucas WE, Yen SS. Effect of oophorectomy on circulating testosterone and androstenedione levels in patients with endometrial cancer. Am J Obstet Gynecol 1974; 118:793-798.

33.-Grodin JM, Siiteri PK, Mac Donald PC. Source of estrogen production in postmenopausal women. J Am Endocrinol Metab 1973; 36:207.

34.-Hemsell DL, Grodin JM, Brenner PF, Siiteri PK, Mac Donald PC. Plasma precursors of estrogen II. Correlation of the extent of conversion of plasma androstenedione to estrone with age. J Clin Endocrinol Metab 1974; 38:476-479.

35.-Chopra IJ, Tulchinsky D. Status of estrogen-androgen balance in hyperthyroid men with Graves' disease. J Clin Endocrinol Metab 1974; 38:269-277.

36.-Nimrod A, Ryan KJ. Aromatizacion of androgen by human abdominal and breast fat tissue. J Clin Endocrinol Metab 1975; 40:367-372.

37.-Li K, Chandra DP, Foo T, Adams JB, McDonald C. Esteroid metabolism by human mammary carcinoma. Steroids 1976; 28:561-574.

38.-Lippman ME, Eil C. Steroid therapy of cancer. En Chabner B ed. The Clinical Pharmacology of Antineoplastic drugs. Philadelphia: WB Saunders. 1982.

39.-Clark JH, Peck EJ. Steroid hormone receptors: basic principles and measurement. En Schrader WT, O'Malley BW, ed. Laboratory Methods Manual for Hormone Action and Molecular Endocrinology. Houston: Houston Biological Associates. 1981; 1-56.

40.-Westphal U. How are steroids transported in the blood before they enter target cells?. En Wittliff JL, Dapunt O, ed. Steroid Receptors and Hormone-dependent neoplasia. New York: Masson. 1980; 1-17.

41.-Gurpide E, Welch M. Dynamics of uptake of estrogens and androgens by human endometrium. J Biol Chem 1969; 244:5159-5167.

42.-Zanker KS, Prokscha GW, Blumel G. Plasma membrane-integrated estrogen receptors in breast tissue: possible modulator molecules for intracellular hormone level. J Cancer Res Clin Oncol 1981; 100:135-148.

43.-Wittliff JL, Fisher B, Durant JR. Establishment of uniformity in steroid receptor analises used in cooperative trials of breast cancer treatment. En Henningsen B, Linder F, Steichele C, ed. Recent Results in Cancer Research. Endocrine Treatment of Breast Cancer. New York: Springer-Verlag 1980; 71:198-202.

44.-Baulieu EE. Aspects of steroid hormone-target cell interactions. En Leavitt WW, Clark JH, ed. Advances in Experimental Medicine and Biology. Steroid Hormone Receptor Syistems. New York: Plenum Press. 1979; 117:377-398.

45.-Scatchard G. The attraction of proteins for small molecules and ions. Ann NY Acad Sci 1949;51:660-672.

46.-Hawkins RA, Roberts MM, Forrest AP. Estrogen receptors and breast cancer: current status. Br J Surg 1980; 67:153-169.

47.-Sherman MR, Tuazon FB, Miller LK. Estrogen receptor cleavage and plasminogen activation by enzymes in human breast tumor cytosol. Endocrinology 1980; 106:1066-1715.

48.-Wittliff JL, Savlov ED. Biochemical basis for the selection of hormonal manipulation in the patient with breast carcinoma. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1978; 4:463-467.

49.-Notides AC, Lerner N, Hamilton DE. Positive cooperativity of the estrogen receptor. Proc Natl Acad Sci USA 1981; 78(8):4926-4930.

50.-Thampan TN, Clark JH. An oestrogen receptor activation protein in rat uterine cytosol. Nature 1981; 290:152-154.

51.-Weichman BM, Notides AC. Estrogen receptor activation and the dissociation kinetics of estradiol, estriol and estrone. Endocrinologica 1980; 106:434-439.

52.-Sherman MR, Pickering LA, Rollwagen FM, Miller LK. Meroreceptors: proteolytic fragments of receptors containing the steroid-binding site. Fed Proc 1978; 37:167-173.

53.-Puca GA, Nola E, Sica V, Bresciani F. Estrogen-binding protein of calf uterus. Interrelationship between various forms and identification of a receptor-transforming factor. Biochemistry 1972; 11:4157-4165.

54.-Tilzer LL, McFarland RT,Plapp FV et al. Different ionic forms of estrogen receptor in rat uterus and human breast carcinoma. Cancer Res 1981; 41:1058-1063.

55.-Puca GA, Sica V, Nola E. Identification of a high affinity nuclear acceptor site for estrogen receptor of a calf uterus. Proc Natl Acad Sci USA 1974; 71:979-983.

56.-Kallos J, Fasy T, Hollander VP. Assessment of estrogen receptor-histone interactions. Proc Natl Acad Sci 1981; 78(5):2874-2878.

57.-Payvar F, Wrange O, Carlstedt-Duke J et al. Purified glucocorticoid receptors bind selectively in vitro to a cloned DNA fragment whose transcription is regulated by glucocorticoids in vivo. Proc Natl Acad Sci USA 1981; 78(11):6628-6632.

58.-Mulvihill E, LePennec JP, Chambon P. Chicken oviduct progesterone receptor: location of specific regions of high-affinity binding in cloned DNA fragments of hormone-responsive genes. Cell 1982; 24:621-632.

59.-Clark JH, Hardin JW, McCormack SA. Estrogen receptor binding and the simulation of normal and abnormal growth. En Wittliff JL, Dapunt O, ed. Steroid Receptors and Hormone-Dependent Neoplasia. New York:Masson. 1980; 19-27.

60.-Spelsberg TC, Steggles AW, O'Malley BW. Progesterone binding components of chick oviduct. III. Chromatin acceptor sites. J Biol Chem 1971; 246:4188-4197.

61.-Chan L, O'Malley B. Mechanism of action of the sex steroid hormones. Part I. N Engl J Med 1976; 294(24):1322-1328.

62.-Bailly A, Sallas N, Milgrom E. A low molecular weight inhibitor of steroid receptor activation. J Biol Chem 1977; 252(3):858-863.

63.-Clark JH, Markaverich B, Upchurch S et al. Nuclear binding of the estrogen receptor: heterogeneity of sites and uterotropic response. En Leavitt WW, Clark J, ed. Advances in Experimental Medicine and Biology. Steroid Hormone Receptor Systems. New York: Plenum Press. 1979; 117: 17-46.

64.-Means AR, Hamilton TH. Early estrogen action: concomitant stimulations within 2 minutes of nuclear RNA synthesis and uptake of RNA precursor by the uterus. Proc Natl Acad Sci USA 1966; 56:1594-1598.

65.-Harris SE, Rosen JM, Means AR, O'Malley BW. Use of a specific probe for ovalbumin messenger RNA to quantitate estrogen-induced gene transcripts. Biochemistry 1975; 14:2072-2081.

66.-Palmiter RD. Regulation of protein synthesis in chick oviduct. I. Independent regulation of ovalbumin, conalbumin, ovomucoid and lysozyme induction. J Biol Chem 1972; 247:6450-6461.

67.-Notides A, Gorski J. Estrogen-induced synthesis of a specific uterine protein. Proc Natl Acad Sci USA 1966; 56:230-235.

68.-Kaye AM, Reiss N, Iacobelli S et al. The "estrogen-induced protein" in normal and neoplasic cells. En Iacobelli S, King RJ, Lindner HR, Lippman ME, ed. Hormones and cancer. New York:Raven Press. 1980; 41-52.

69.-Horwitz KB, McGuire WL. Studies on mechanisms of estrogen and antiestrogen action in human breast cancer. En Henningsen B, Linder F, Steichele C, ed. Recent Results in Cancer Research-Endocrine Treatment of Breast Cancer. Vol 71 New York: Springer-Verlag. 1980; 45-58.

70.-Anderson WA, Kang YH, DeSombre ER. Endogenous peroxidase: specific marker enzyme for tissues displaying growth dependency on estrogen. J Cell Biol 1975; 64:668-681.

71.-De Sombre ER, Anderson WA, Kang Y. Identification, subcellular localization, and estrogen regulation of peroxidase in 7,12 dimethylbenzanthracene-induced rat mammary tumors. Cancer Res 1975; 35:172-179.

72.-Duffy MJ, Duffy G. Peroxidase activity as a possible marker for a functional oestradiol receptor in human breast tumors. Biochem Soc Trans 1977; 5:1738-1739.

73.-Lippman ME, Bolan G, Monaco ME. Model Systems for the study of estrogen action in tissue culture. J Steroid Biochem 1976; 7:1045-1051.

74.-Vic P, Derocq D, Rochefort H. Effect of estradiol on the ultrastructure of the MCF-7 human breast cancer cells in culture. Cancer Res 1982; 42:667-673.

75.-Horwitz KB, MacGuire WL. Estrogen control of progesterone receptor in human breast cancer. Correlation with nuclear processing of estrogen receptors. J Biol Chem 1978; 253:2223-2228.

76.-Kasid A, Strobl JS, Greene GL, Lippman ME. Characteristics of a new nuclear form of oestradiol receptor in MCF-7 breast cancer cells. Nature 1982.

77.-Auricchio F, Migliaccio A, Rotondi A. Inactivation of estrogen receptor in vitro by nuclear dephosphorilation. Biochem J 1981; 194:569-574.

78.-Toft DO, O'Malley BW. Target tissue receptors for progesterone: the influence of estrogen. Endocrinology 1972;90:1041-1045.

79.-Keightley DD. The binding of progesterone R-5020 and Org-2058 to progesterone receptor. Eur J Cancer 1979; 15:785-790.

80.-Mohla S, Anderson WA. Role of steroid hormones in mammary cancer . En Sharma RK, Criss WE, ed. Endocrine Control in Neoplasia. New York:Raven Press. 1978; 315-332.

81.-O'Malley BW, Schrader WT. The receptors of steroid hormones. Sci Am 1976; 234:32-43.

82.-Huggins C, Yang NC. Induction and extinction of mammary cancer. Science 1962; 137:257-262.

83.-Muggia FM, Cassileth PA, Ochoa M et al. Treatment of breast cancer with medroxyprogesterone acetate. Ann Intern Med 1968;68:328-337.

84.-McGuire WL, Carbone PP, Sears ME, Escher GC. estrogen receptors in human breast cancer: an overview. En McGuire WL, ed. Estrogen Receptors in Human Breast Cancer. New York:Raven Press. 1975; 1-7.

85.-Korenman SG, Dukes BA. Specific estrogen binding by the cytoplasm of human breast carcinoma. J Clin Endocrinol Metab 1970; 30:639-645.

86.-Steggles AW, King RJ. The use of protamine to study (6,7-3H)oestradiol-17Betabinding in rat uterus. Biochem J 1970; 118:695-701.

87.-Chamness GC, McGuire WL. Methods for analyzing steroid receptors in human breast cancer. En McGuire WL, ed. Breast Cancer 3. Advances in Research and Treatment. New York:Plenum Press. 1979; 149-197.

88.-Castaneda E, Liao S. The use of anti-steroid antibodies in the characterization of steroid receptors. J Biol Chem 1975; 250:883-888.

89.-Nenci I, Beccati MD, Piffanelli A, Lanza G. Detection and dynamic localization of estradiol-receptor complexes in intact target cells by immunofluorescence techniques. J Steroid Biochem 1976; 7:505-510.

90.-Mercer WD, Lippman M, Wahl TM et al. The use of immunocytochemical techniques for the detection of steroid hormones in breast cancer cells. Cancer 1980; 46:2859-2868.

91.-Ghosh L, Ghosh BC, Das Gupta. Immunocytological localization of estrogen in human mammary carcinoma cells by horseradish peroxidase complex. J Surg Oncol 1978; 10:221-224.

92.-Pertschuck LP, Tobin EH, Gaetjens E et al. Histochemical assay of steroid hormone receptors. En Bresciani F ed. Perspectives in Steroid Receptor Research. New York:Raven Press. 1980; 299-307.

93.-Fisher B, Gunduz S, Zheng S, Saffer EA. Fluoresceinated estrone binding by human and mouse breast cancer cells. Cancer Res 1982; 42:540-549.

94.-DeSombre ER, Greene Gl, Jensen EV. New methods for estrogen receptor assay. En Clinical Applications in Oncology (Special Report of Symposium held in San Diego 1981, NSABP). New York:McGraw-Hill. 1981; 42-47.

95.-Smith RG. Quality control in steroid hormone receptor assays. Cancer 1980; 46:2946-2949.

96.-McGuire WL, Osborne CK, Clark GM, Knight WA. Steroid hormone receptors and carcinoma of the breast. Am J Physiol. 1982; 243:99-102.

97.-Horwitz KB, McGuire WL, Pearson OH, Segaloff A. Predicting response to endocrine therapy in human breast cancer: a hypothesis. Science 1975; 189:726-727.

98.-McGuire WL, Horwitz KB, Pearson OH, et al. Current status of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. Cancer 1977; 39:2934-2947.

99.-McGuire WL. Steroid receptors in human breast cancer. Cancer Res 1978; 38:4289-4291.

100.-Young PCM, Einhorn LH, Ehrlich CE, et al. Progesterone receptor (PgR) as a marker of hormone responsive human breast tumor. Proc Am Assoc Can Res 1978; 19:204.

101.-Osborne CK, Yochmowitz MG, Knight WA, et al. The value of estrogen and progesterone receptors in treatment of breast cancer . Cancer 1980; 46:2884-2888.

102.-Fisher B, Wickerham DL, Brown A, Redmond CK. Breast cancer estrogen and progesterone receptor values: their distribution, degree of concordance, and relation to number of positive axillary nodes. J Clin Oncol 1983; 1:227-241.

103.-Heuson JC, Paridaens R, Leclercq G. Relation entre les recepteurs d'oestrogenes et de progesterone et la response a l'hormonotherapie. Pathol Biol 1983; 10:793-800.

104.-McGuire WL. Hormone receptors: their role in predicting prognosis and response to endocrine therapy. Semin Oncol 1978; 5:428-433.

105.-King RJB. Analysis of estradiol and progesterone receptors in early and advanced breast tumors. Cancer 1980; 46:2818-2821.

106.-Vihko R, Isotalo R. Estrogen and progesterone receptors in breast cancer. Acta Obstet Gynecol Scand Suppl 1981; 101:29-35.

107.-Allegra JC, Lippman ME, Thompson EB, Simon R, Barlock A, Green L. Estrogen receptors status: an important variable in predicting response to endocrine therapy in metastatic breast cancer. Europ J Cancer 1980; 16:323-331.

108.-Pasholf T, Mouridsen HT, Daehnfeldt JL. Adjuvant endocrine therapy of breast cancer-a controlled clinical trial of oestrogen and antioestrogen: preliminary results of the Copenhagen breast cancer trials. En Henningsen B, Linder F, Steichele C, ed. Recent Results in Cancer Research. Endocrine Treatment of Breast Cancer. 1980; 185-189.

109.-Matsumoto K, Sugano H. Human breast cancer and hormone receptors. En Sharma RK, Criss WE, ed. Hormone Receptors and Breast Cancer. New york:Raven Press. 1978; 43-58.

110.-Sakai F, Saez S. Existence of receptors bound to endogenous estradiol in breast cancers of premenopausal and postmenopausal women. Steroids 1976; 27:99-110.

111.-Saez S, Martin MP, Chauvet CD. Estradiol and progesterone receptor levels in human breast adenocarcinoma in relation to plasma estrogen and progesterone levels. Cancer Res 1978; 38:3468-3473.

112.-Clark GM, Osborne CK, McGuire WL. Correlations between estrogen receptor, progesterone receptor, amd patient characteristics in human breast cancer. J Clin Oncol 1984; 2:1102-1109.

113.-Martin PM, Rolland PH, Jacquemier J, Rolland AM, Toga M. Multiple steroid receptors in human breast cancer. Cancer Chemother Pharmacol 1979; 2:107-113.

114.-Vihko R, Janne O, Kontula K, Syrjälä P. Female sex steroid receptor status in primary and metastatic breast carcinoma and its relationship to serum steroid and peptide hormone levels. Int J Cancer 1980; 26:13-21.

115.-Stewart JF, King RJ, Sexton SA, et al. Oestrogen receptors, sites of metastatic disease and survival in recurrent breast cancer. Europ J Cancer 1980; 17(4):499-453.

116.-Singhakowinta A, Saunders DE, Brooks SC, Samal B, Vaitkevicius VK. Clinical application of estrogen receptor in breast cancer. Cancer 1980; 46:2932-2938.

117.Legha SS, Buzdar A, Smith T, Swenerton K, Hortobagyi G, Blumeschein G. Response to hormonal therapy as a prognostic factor for metastatic breas cancer treated with combination chemotherapy. Cancer 1980; 46:438-445.

118.-De la Monte SM, Hutchins GM, Moore GW. Receptores de estrógenos y de progesterona en la predicción de la conducta metástasica del carcinoma de mama. Am J Med 1984; 76:11-17.

119.-Kiang DT, Kennedy BJ, Snover. Biological and histological characteristics of simultaneous bilateral breast cancer. Lancet 1980; ii:1105-1107.

120.-Millis RR. Correlation of hormone receptors with pathological features in human breast cancer. Cancer 1980; 46:2869-2871.

121.-Hahnel R. Vivian A. Biochemical and clinical experience with the estimation of estrogen receptors in human breast carcinoma. En McGuire WL, Carbone PP, Vollmer EP, ed. Estrogen receptor in human breast cancer. New York:Raven Press 1975; 205-235.

122.-Bishop HM, Blamey RW, Elston CW, et al. Relationship of oestrogen-receptor status to survival in breast cancer. Lancet 1979; ii:283-284.

123.-Roberts AN, Hahnel R. Oestrogen receptor assay and morphology of breast cancer. Pathology 1981; 13:317-325.

124.-Leake RE, Laing L, Calmon KC, et al. Destrogen-receptor status and endocrine therapy of breast cancer: response rates and status stability. Br J Cancer 1981; 43:59-66.

125.-Heuson JC, LeClercq G, Longeval E, et al. Estrogen receptors: prognostic significance in breast cancer. En McGuire WL, Carbone PP, Vollmer EP, ed. Estrogen Receptors in Human Breast Cancer. New York:Raven Press. 1975; 57-72.

126.-Hawkins RA, Hill A, Freedman B, Gore SM, Roberts MM, Forrest AP. Reproductibility of measurements of oestrogen-receptor concentration in breast cancer. Br J Cancer 1977; 36:355-361.

127.-Howat JMT, Barnes DM, Harris M, Swindell R. The association of cytosol oestrogen and progesterone receptors with histological features of breast cancer and early recurrence of disease. Br J Cancer 1983; 47:629-640.

128.-Andry G, Mattheiem W, Suciu S, et al. Estrogen receptors and distribution of prognostic factors in primary breast cancer Recent Results Cancer Res 1984; 91:141-144.

129.-McCarty KS, Barton TK, Fetter BF, et al. Correlation of estrogen and progesterone receptors with histologic differentiation in mammary carcinoma. Cancer 1980; 46:2851-2858.

130.-Antoniades K, Spector H. Correlation of estrogen levels with histology and cytomorphology in human mammary cancer. Am J Clin Pathol 1979; 71:497-498.

131.-Rasmussen BB, Rose C, Thorpe SM, et al. Histopathological characteristics and oestrogen receptor content in primary breast carcinoma. Virchows Arch (A) 1981; 390:347-351.

132.-Rosen RR, Menendez-Botet CJ, Senie RT, et al. Estrogen receptor protein (ERP) and the histopathology of human mammary carcinoma. En McGuire W, ed. Hormones, Receptors and breast cancer. New York:Raven Press. 1978; 71-83.

133.-Fisher ER, Redmond CK, Lin H, et al. Correlation of estrogen receptor and pathologic characteristics of invasive breast cancer. Cancer 1980; 45:349-353.

134.-Chabon AB, Goldberg JD, Venet L. Carcinoma of the breast: interrelationships among histopathologic features, estrogen receptor activity, and age of the patient. Hum Pathol 1982; 14:368-372.

135.-Masters JRW, Hawkins RA, Sangter K, et al. Oestrogen receptors cellularity, elastosis and menstrual status in human breast cancer. Eur J Cancer 1978; 14:303-307.

136.-Rolland PH, Jacquemier J, Martin PM. Histological differentiation in human breast cancer is related to steroid receptors and stromal elastosis. Cancer Chemother Pharmacol 1980; 5:73-77.

137.-Meyer JS, Rao BR, Stevens SC, White WL. Low incidence of estrogen receptor in breast carcinomas with rapids rates of cellular replication. Cancer 1977; 40:2290-2298.

138.-Silvestrini R, Daidone MG, Bertuzzi A, Di Fronzo G. Relationship between estrogen receptors and cellular proliferation . Recent Results in Cancer Research. Vol 91. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg 1984.

139.-Kute TE, Muss HB, Anderson D, et al. Relationship of steroid receptor, cell kinectics, and clinical status in patients with breast cancer. Cancer Res 1981; 41:3524-3529.

140.-Delarue JC, May-Levin F, Mouriesse H, Contesso G, Sancho-Garnier H. Oestrogen and progesterone cytosolic receptors in clinically inflamatory tumors of the human breast. Br J Cancer 1981; 44:911-916.

141.-Contesso G, May-Levin F, Delarue JC, Mouriesse H, Sancho-Garnier H, Lemaout M. Inflamatory tumors of the human breast: Determination of estrogen and progesterone receptors. Rcents Results in Cancer Research. Vol 91. Springer-Verlag Berlin-Heidelberg 1984.

142.-Rubens RA, King RJB, Sexton S, Minton MJ, Hayward JL. Oestrogen receptors and response to cytotoxic chemotherapy in advanced breast cancer. Cancer Chemother Pharmacol 1980; 4:43-45.

143.-Straus MJ, Moran RE, Muler RE, Waitz HH. Estrogen receptor heterogeneity and the relationship between estrogen receptor and the tritiated thymidine labeling index in human breast cancer. Oncology 1982, 39:197-200.

144.-Hull DF, Clark GM, Osborne CK, Chamness GC, Knight WA, McGuire WL. Multiple estrogen receptor assays in human breast cancer. Cancer Res 1983; 43:413-416.

145.-Silfversward C, Skoog L, Humls S, Gustafsson SA, Nordenskojd B. Intratumoral variation of cytoplasmic and nuclear estrogen receptor concentrations in human mammary carcinoma. Eur J Cancer 1980; 16:59-65.

146.-Davis BW, Zava DT, Locher GW, Goldhirsch A, Hartmann WH. Receptor heterogeneity of human breast cancer as measured by multiple intratumoral assay of estrogen and progesterone receptor. Eur J Cancer Clin Oncol 1984; 29:375-382.

147.-McDonald I. Endocrine ablation in disseminated mammary carcinoma. Sug Gynecol Obstet 1962; 115:215-222.

148.-American Medical Association Council on Drugs. Andogens and estrogens in the treatment of disseminated mammary carcinoma. JAMA 1960; 172:1271-1283.

149.-De Sombre ER, Carbone PP, Jensen EV, et al. Special report: steroid receptors in breast cancer. N Engl J Med 1979; 301:1011-1012.

150.-McGuire WL, Clark GM. Progesterone receptors and human breast cancer; "wassink lecture" presented al the 3rd EORTC Breast Cancer Working Conference. Eur J Cancer Clin Oncol 1983; 19:1681-1685.

151.-Sariff AM, Durant JR. Evidence that estrogen receptor negative, progesterone receptor positive breast and ovarian carcinomas contain estrogen receptor. Cancer 1981; 48:1216-1220.

152.-Dao TL. Ablation therapy for hormone dependent tumors. Annu Rev Med 1972; 21:1-18.

153.-Kaufman RJ. Advanced breast cancer. Additive hormonal therapy. Cancer 1981; 47:2398-2403.

154.-King RJB, Stewart JF, Millis RR, Rubens RD, Hayward JL. Quantitative comparison of estradiol and progesterone receptor contents of primary and metastatic human breast tumors in relation to response to endocrine treatment. Breast Cancer Res Treat 1982; 2:339-346.

155.-Lunan CB, Klopper A. Antiestrogens. A review. Clin Endocrinol (Oxf) 1975; 4:551-572.

156.-Lippman M, Bolan G, Huff K. The effects of estrogens and antiestrogens on hormonoresponsive human breast cancer in long-term tissue culture. Cancer Res 1976; 36:4595-4601.

157.-Eckert RL, Katzenellenbogen BS. Effects of estrogens and antiestrogens on estrogen receptor dynamics and the induction of progesterone receptor in MCF-7 human breast cancer cells. Cancer Res 1982; 42:139-144.

158.-Rorke EA, Katzenellenbogen BS. Antitumor activities and estrogen receptor interactions of the metabolites of the antiestrogens CI628 and V23,469 in the 7,12-dimethylbenz(a)-anthracene-induced rat mammary tumor system. Cancer Res 1981; 41:1257-1262.

159.-Lippman ME, Bolan G. Oestrogen-responsive human breast cancer in long term tissue culture. Nature 1975; 256:592-593.

160.-Cole MP, Jones CTA, Todd IDH. The treatment of advanced carcinoma of the breast with the antiestrogenic agent Tamoxifen (ICI, 46, 474), a series of 96 patients. Advances in antimicrobial and antineoplastic chemotherapy 1971; 2:529-533.

161.-Ward HWC. Antiestrogenic therapy for breast cancer: a trial of Tamoxifen at two dose levels. Brit Med J 1973; 1:13-17.

162.-Bloom ND, Fishman JH. Tamoxifen treatment failures in hormonally responsive breast cancers. Correlation with steroid receptors. Cancer 1983; 51:1190-1194.

163.-Westerberg H, Nordenskjold B, Wrange O, et al. Effect of antiestrogen therapy on human mammary carcinomas with different estrogen receptor contents. Eur J Cancer 1978; 14:619-622.

164.-Pritchard KI, Thomson DB, Myers RE, Sutherland DJA, Mobbs BG, Meakin JW. Tamoxifen therapy in premenopausak patients with metastatic breast cancer. Cancer Treat Rep 1980; 64:787-796.

165.-Manni A, Trujillo J, Marshall JS, Pearson OH. Antiestrogen induced remissions in stage iv breast cancer. Cancer Treat Rep 1976; 60: 1445-1449.

166.-Legha SS, Davis HL, Muggia FM. Hormonal therapy of breast cancer: new approaches and concepts. Ann Intern Med 1978; 88: 69-77.

167.-Bratherton DG, Brown CH, Buchanan R, et al. A comparison of two doses of tamoxifen (Nolvadex*) in postmenopausal women with advanced breast cancer: 10mg bd versus 20mg bd. Br J Cancer 1984; 50:199-205.

168.-Mattsson W. Current status of high dose progestin treatment in advanced breast cancer. Breast Cancer Res Treat 1983; 3:231-235.

169.-Bernardo-Strada MR, Imparato e, Aspesi G, Pavesi L, Robustelli della Cuna G. Il medrossiprogesterone acetato (MPA) ad alta dose per via orale nel trattamento delle fasi avanzate del cancro mammario ed endometriale. Minerva Med 1980; 2:1-6.

170.-Ganzina F. High dose medroxyprogesterone acetate (MPA) treatment in advanced breast cancer. A review. Tumori 1979; 65:563-568.

171.-De Lena M, Villa S, Di Fronzo G. Therapeutic activity of medroxyprogesterone acetate in metastatic breast cancer: a correlation between estrogen receptors and various dosages. Recent Results in Cancer Research Vol 91. Springer-Verlag Berlin-Heidelberg 1984.

172.-Griffiths GT, Hall TC, Saba Z, Barlow JJ, Nevinny HB. Preliminary trial of aminoglutethimide in breast cancer. Cancer 1973; 32:31-37.

173.-Santen RJ, Santner SJ, Tilsen-Mallet N, Rosen HR, Samojlik E, Velahvis JD. In vivo and in vitro pharmacological studies of aminoglutethimide as an aromatase inhibitor. Cancer Res 1982; 42:3353-3359.

174.-Santen RJ. Suppression of estrogens with aminoglutethimide and hydrocortisone (medical adrenalectomy) as treatment of advanced breast carcinoma: a review. Breast Cancer Res Treat 1981; 1:183-202.

175.-Misbin RJ. Aminoglutethimide for metastatic breast cancer. Ann Int Med 1977; 86:828-829.

176.-Lawrence BV, Lipton A, Harvey HA, et al. Influence of estrogen receptor status on response of metastatic breast cancer to aminoglutethimide therapy. Cancer 1980; 45:786-791.

177.-Gale KE. Treatment of advanced breast cancer with aminoglutethimide: a 14-year experience. Cancer Res 1982; 42:3389-3396.

178.-Stuart-Harris R, Dowsett M, Bozek T, et al. Low dose aminoglutethimide in treatment of advanced breast cancer. Lancet 1984; 15:604-607.

179.-Mouridsen HT, Ellemann K, Mattsson W, Palshof T, Daehnfeldt JL, Rose C. Therapeutic effect of tamoxifen versus tamoxifen combined with medroxiprogesterone acetate in advanced breast cancer in post-menopausal women. Cancer Treat Rep 1979; 63:171-175.

180.-Namer M, Lalane C, Baulieu E. Increase of progesterone receptor by tamoxifen as a hormonal challenge test in breast cancer. Cancer Res 1980; 40:1750-1752.

181.-Powles TJ, Ashley S, Ford HT, et al. Treatment of disseminated breast cancer with tamoxifen, aminoglutethimide, hydrocortisone, and danazol, used in combination or sequentially. Lancet 1984; 23:1369-1372.

182.-Pertschuk LP, Tobin EH, Brigati DJ, et al. Inmunofluorescent detection of estrogen receptors in breast cancer. Cancer 1978; 41:907-911.

183.-Gairard B, Calderoli H, Keiling R, et al. Cancer cell counts and validity of steroid receptor determinations in breast cancer. Cancer 1980; 45:792-794.

184.-Allegra JC, Barlock A, Huff KK, Lippmann ME. Changes in multiple or sequential estrogen receptors determinations in breast cancer. Cancer 1980; 45:792-794.

185.-McGuire WL. Round table on hormone receptors. UICC Int Symp on Map Genova 1982.

186.-Kiang DT, Kennedy BJ. Chemoendocrine therapy of advanced breast cancer. Breast Cancer Res Treat 1981; 1:105-109.

187.-Falkson G, Falkson HC, Glidewell O, Weinberg V, Leone L, Holland JF. Improved remission rates and remission duration in young women with metastatic breast cancer following combined oophorectomy and chemotherapy. Cancer 1979; 43:2215-2222.

188.-Pouillart P, Palangie T, Jouve H, Garcia-Giralt E, Asselain B, Magdelenat H,. Cancer mamario metastásico tratado simultáneamente con quimioterapia citotóxica y terapia hormonal: resultados preliminares de un ensayo randimizado. Simposio Internacional Niza 1980.

189.-Ahmann DL, O'Connell MJ, Hahn RG. An evaluation of early ordelayed adyuvant chemotherapy in premenopausal patients with advanced breast cancer undergoing oophorectomy. N Engl J Med 1977; 297:356-360.

190.-Glick JH, Creech RH, Torri S, et al. Tamoxifen plus sequential CMF chemotherapy versus tamoxifen alone in postmenopausal patients with advanced breast cancer, a randomized trial. Cancer 1980; 45:735-741.

191.-Weichselbaum RR, Hellman S, Piro AJ, Nove JJ, Little JR. Proliferation kinetics of a human breas cancer cell line in vitro following treatment with 17-Beta estradiol and 1-Beta-D arabinofuranosylcytosine. Cancer Res 1978; 38:2339-2342.

192.-Lippman ME, CassidY JC, Wesley M, Young RC. A randomized attemt to increase the efficacy of cytotoxic chemotherapy in metastatic breas cancer by hormonal synchronization. J Clin Oncol.

193.-Lippman ME, Buzdar A, Tormey DC, McGuire WL. Combining endocrine and chemotherapy - any true benefits?. Breast Cancer Res Treat 1984; 4:251-259.

194.-Allegra JC, Woodcock TM, Richman SP, Bland KI, Wittliff JL. A phase II trial of tamoxifen, premarin, methotrexate and 5-fluorouracil in metastatic breast cancer. Breast Cancer Res Treat 1982; 2:93-99.

195.-Palshof T, Mouridsen HT, Daehnfeldt JL. Adjuvant endocrine therapy of primary operable breast cancer. Report on the Copenhagen breast cancer trials. Eur J Cancer 1980; 16:183-187.

196.-Ribeiro G, Palmer MK. Adjuvant tamoxifen for operable carcinoma of the breast: report of clinical trial by the Christie Hospital and Holt Radium Institute. Br Med J 1983; 286:827-830.

197.-Baum M, Brinkley DM, Dossett JA, et al. Controlled trial of tamoxifen as adjuvant agent in management of early breast cancer. Lancet 1983; 5:257-261.

198.-Fisher B, Redmond C, Brown A, et al. Influence of tumor estrogen and progesterone receptor levels on the response to tamoxifen and chemotherapy in primary breast cancer. J Clin Oncol 1983; 1:227-241.

199.-Ludwig Breast Cancer Study Group. Ensayo aleatorio sobre quimioendocrinoterapia, endocrinoterapia y mastectomía exclusivamente en pacientes postmenopáusicas con carcinoma de mama operable y metástasis ganglionares axilares. Lancet 1984; 5:241-246.

200.-Valagussa P, Di Fronzo G, Bignami P, Buzzoni R, Bonadonna G, Veronesi V. Prognostic importance of estrogen receptors to select node negative patients for adjuvant chemotherapy. En Salmon E, Jones SE, ed. Adjuvant Therapy of cancer III. New York: Grune and Straton. 1981; 329-333.

201.-Pichon MF, Pallud C, Brunet M, Milgrom E. Relationship of presence of progesterone receptors to prognosis in early breast cancer. Cancer Res 1980; 40:3357-3360.

202.-Pouillart P, Madgelenat H, Jouve M, et al. Cancer mammaires métastasés: comparaison de la signification pronostique et de la sensibilité à la chimothérapie selon la présence de récepteur d'oestradiol et de progestérone. Bull Cancer 1982; 5:461-467.

203.-Clark GM, McGuire WL, Hubay CA, Pearson OH, Marshall JS. Progesterone receptors as a prognostic factor in stage II breast cancer. N Engl J Med 1983; 309:1343-1347.

204.-International Union Against Cancer. TNM Classification of malignant tumours. 4ª Edition 1984.

205.-Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem 1951; 193:265-270.

206.-Namkung PC, Petra PH. Measurement of progestrone receptors in human breast tumors: comparison of various methods of analysis. J Steroid Biochem 1981; 14:851-854.

207.-Powell B, Garola RE, Chamness Gc, McGuire WL. Measurement of progesterone receptor in human cancer biopsies. Cancer Res 1979; 39:1678-1682.

208.-Chester Z, Feherty P, Kellie AE, Ralphs DNL. Estrogen receptor in primary breast tumors in relation to the stage and progression of the disease. En Mc Guire WL, Carbone PP, Wollmer EP, ed. Estrogen Receptors in Human Breast Cancer. New York:Raven Press. 1975; 157-174.

209.-Anderson KM, Bonomi P, Marogil M, et al. Comparison of dextran-coated charcoal and sucrose density gradient analysis of estrogen and progesterone receptors in human breast cancer. Cancer Res 1980; 40:4127-4132.

210.-Pichon MF, Milgrom E. Characterization and assay of progesterone receptor in human mammary carcinoma. Cancer Res 1977; 37:464-471.

211.-Braunsberg H, Killen E, Richardson SG. The effects of thiols on oestradiol binding by components of human malignant breast tumors. Biochem J 1972; 130:38-43.

212.-Raam S, Gelman R, Faulkner J, White GM, Cohen JL. Quality control for estrogen receptor quantification by dextran-coated charcoal assay: a single laboratory's experience. Breast Cancer Res Treat 1982; 2:111-117.

213.-Nicolo G, Carbone A, Esposito M, Santi L. Sampling and storage of breast cancer tissue for steroid receptor assays . Recent Results in Cancer Research. Vol 91. Springer-Verlag Berlin-Heidelberg. 1984; 3-11.

214.-Leclercq G, Heuson JC, Schoenfeld R, et al. Estrogen receptors in human breast cancer. Eur J Cancer 1973; 9:665-673.

215.-Magdelenat H. estrogen and progestin receptors on drill biopsy samples of human mammary tumors. Recent Results in Cancer Research. Vol91. Springer Verlag Berlin-Heidelberg. 1984; 45-49.

216.-Silfversward C, Wallgren A, Nordenskjöld B, Humla S. Estrogen receptor analysis on fine needle aspirates from human breast carcinoma. Recent Results in Cancer Research. Vol 91. Springer-Verlag Berlin-Heidelberg. 1984; 41-44.

217.-Sundaram GS, Manimekalai S, Wenk RE, Goldstein PJ. Estrogen and progesterone receptor assays in human breast cancer. A brief review of the relevant terms, methods and clinical usefulness. Obstet Gynecol Surv 1984;39: 719-723.

218.-Koenders A, Benraad TJ. Standarization of steroid receptor anlysis in breast cancer biopsies: EORTC receptor group. Recent Results in Cancer Research. Vol 91. Springer-Verlag Berlin-Heidelberg. 1984; 129-135.

219.-Jordan VC, Zava DT, Eppenburger V, et al. Reliability of steroid hormone receptor assays: an internetional study. Eur J Cancer Clin Oncol 1983; 19:357-363.

220.-Namkung PC, Moe RE, Petra PH. Stability of estrogen receptors in frozen human breast tumor tussue. Cancer Res 1979, 39:1124-1125.

221.-Wittliff JL, Hilf R, Brooks WF, et al. Specific estrogen-binding capacity of the cytoplasmic receptor in normal and neoplastic breast tissues of humans. Cancer Res 1971; 32:1983-1992.

222.-Zava DT, Guelpa C. A quality control study to asses the interlaboratory variability of routine estrogen and progesterone receptor assays. Eur J Cancer Clin Oncol 1982; 18:713-721.

223.-Brown PW, Witorsch J, Banks WL, Lawrence W. Freezing and storage of breast cancer tissue for estrogen receptor protein assay. Arch Surg 1977; 112:183-185.

224.-Kantargian HM, Hortobagyi GN, Smith TL, et al. The management of locally advanced breast cancer: a combined modality approach. Eur J Cancer Clin Oncol 1984; 20(11):1353-1361.

225.-Bressot N, Veith F, Saussol J, et al. Pre-surgical radiotherapy decreases the concentrations of estrogen and progesterone receptors in human breast cancer: a 200 patient study. Breast Cancer Res Treat 1982; 2:177-183

226.-Piera JM, Gallen M, Biete A, y cols. Carcinoma de mama localmente avanzado (L.A): Dos entidades clínicas . Experiencia de 80 casos. Primer Congreso Nacional de Oncología Médica, Barcelona 1984.

227.-May-Levin F, Guerinot F, Contesso G, Delarue JC, Bohuon C. Etude des récepteurs cytosoliques oestrogènes et progestogènes dans les carcinomes mammaires. Int J Cancer 1977; 19:789-795.

228.-Thorpe SM, Rose C, Pedersen BW, Rasmussen BB. Estrogen and progesterone receptor profile patterns in primary breast cancer. Breast Cancer Res Treat 1983; 3:103-110.

229.-Degenshein GA, Bloom N, Tobin E. The value of progesterone receptor assays in the management of advanced breast cancer. Cancer 1980; 46:2789-2793.

230.-Horwitz KB. Is a function estrogen receptor always required for progesterone induction in breast cancer ? J Steroid Biochem 1981; 15:209-217.

231.-Saez S, Chouvet C. Influence of endogenous hormone levels on tumor estradiol and progesterone receptors. Recent Results in Cancer Research. Vol 91. Springer-Verlag Berlin-Heidelberg. 1984; 150-156.

232.-DeSombre ER, Greene GL, Jensen EV. Estrophilin and endocrine responsiveness of breast cancer. En McGuire WL, ed. Hormones, receptors, and breast cancer. New York:Raven Press. 1978; 1-14.

233.-Elwood JM, Godolphin W.Oestrogen receptors in breast tumors: Association with age, menopausal status and epidemiological and clinical features in 735 patients. Br J Cancer 1980; 42:635-644.

234.-Bird CE, Houghton B, Westenbrink B, et al. Estradiol receptor levels in human breast carcinomas. Can Med Assoc J 1981; 124:1010-1012.

235.-Lesser ML, Rosen PP, Seni RT, et al. Estrogen and progesterone receptors in breast carcinoma: correlations with epidemiology and pathology. Cancer 1981; 48:299-309.

236.-Nagai R, Kataoka M, Kobayashi S et al. Estrogen and progesterone receptors in human breast cancer with concomitant assay of plasma 17-Beta, estradiol, progesterone, and prolachin levels. Cancer Res 1979; 39:1835-1839.

237.-Fishman J, Nisselbaum JS, Menendez-Bonet CJ, et al. Estrogen and estradiol content in human breast tumors: relationship to estradiol receptor. J Steroid Biochem 1977; 8:893-896.

238.-Holdaway IM, Mountjoy KG. Progesterone and oestrogen receptors in human breast cancer. Aust NZ Med 1978; 8:630-638.

239.-Allegra JC, Lippman ME, Thompson EB, et al. Distribution, frequency, and quantitative analysis of estrogen, progesterone, androgen, and glucocorticoid receptors in human breast cancer. Cancer Res 1979; 39:1447-1454.

240.-Bertuzzi A, Daidone MG, DiFronzo G, et al. Relationship among estrogen receptors, proliferative activity and menopausal status in breast cancer. Breast Cancer Res Treat 1981; 1:253-262.

241.-Parl FF, Schmidt BP, Dupont WD, Wagner RK. Prognostic significance of estrogen receptor status in breast cancer in relation to tumor stage, axillary node metastasis, and histopathologic grading. Cancer 1984; 54:2337-2242.

242.-Walker RA, Cove DH, Howell A. Histologic detection of estrogen receptor in human breast carcinomas. Lancet 1980; i:171-173.

243.-Taylor CR, Cooper CL, Kurman RJ, Goebelsmann U, Markland FS. Detection of estrogen receptor in breast and endometrial carcinoma by the inmunoperoxidase technique. Cancer 1981; 47:2634-2640.

244.-Van Netten JP, Algard FT, Coy P, et al. Estrogen receptor assay on breast cancer microsamples: implications of percent carcinoma estimation. Cancer 1982; 49:2383-2388.

245.-Tilley WD, Keightley DD, Cant EL. Inter-site variation of estrogen receptors in human breast cancer. Br J Cancer 1978; 38:544-549.

246.-Bertuzzi A, Vezzoni P, Ronchi E. Prognostic importance of progesterone receptors alone or in combination with estrogen receptors in node-negative breast carcinoma. Proc AACR and ASCO 1981; 22:447-453.