

R.194.459

FACULTAD DE MEDICINA. HOSPITAL CLINICO. UNIVERSIDAD DE BARCELONA
BARCELONA
DEPARTAMENTO DE OBSTETRICIA Y GINECOLOGIA
(Prof. J.González-Merlo)



" ESTUDIO INMUNITARIO
EN EL
CANCER GINECOLOGICO "

Tesis para aspirar al Grado
de Doctor por:

Octubre, 1.978

D. JUAN BALASCH CORTINA

3.2.1.- Regresiones espontáneas.

Se describen casos de regresión espontánea de tumores humanos, de extensión parcial o completa, temporal o permanentemente, que sugieren una reacción inmunitaria por parte del organismo.

STEWART (1952) ha definido la regresión espontánea del cáncer como la desaparición parcial o completa de un tumor maligno en ausencia de todo tratamiento o en presencia de una terapéutica que se considera inadecuada para ejercer una influencia apreciable sobre la enfermedad neoplásica. Esta definición aceptada también por BOYD (1957) no implica que la regresión espontánea sea sinónima de curación puesto que en algunos casos el tumor que sufrió una aparente regresión en un área determinada, reapareció en un momento ulterior o floreció en otra parte del cuerpo.

Según EVERSON (1956) y EVERSON y COLLE (1966) la evidencia clínica de la regresión espontánea puede referirse al tumor primitivo o a las metástasis. De este modo tendríamos:

- 1- Regresión del tumor primitivo.
- 2- Regresión de un tumor metastásico:

- a) con confirmación histológica de su malignidad.
 - b) sin confirmación histológica de la misma (en este caso la validez de la regresión espontánea es discutible, aunque la naturaleza del tumor primitivo pueda haberse confirmado histológicamente).
- 3- Regresión de supuestas metástasis diagnosticadas radiológicamente sin confirmación histológica ni de las metástasis ni del tumor primitivo, en cuyo caso la validez de la observación es aún más discutible.

En una revisión de casos de regresión espontánea de cáncer publicados en la literatura mundial entre 1900 y 1965, u obtenidos por comunicación personal hasta 1970, EVERSON (EVERSON y COLLE, 1966; EVERSON, 1970) considera que sólo 176 estaban lo suficientemente documentados, incluida la confirmación histológica de malignidad, para ser considerados como ejemplos de regresión espontánea. De estos 176 casos más del 50% estaban constituidos por hipernefromas (el más frecuente), neuroblastoma, melanoma maligno y coriocarcinoma. En algunos tipos de tumores como el neuroblastoma se observan en ocasiones fenómenos de diferenciación espontánea; sin embargo EVERSON y COLLE (1966) señalan que sólo se detectó este hecho en cinco de las

veintinueve regresiones de neuroblastomas recogidas.

Entre los posibles factores responsables de la regresión espontánea del cáncer están:

a) influencias endocrinas. Puede sospecharse una dependencia hormonal de las remisiones en algunas neoplasias como las de mama, endometrio, neuroblastoma, pero en otros cánceres no se puede concebir esta posibilidad.

b) infecciones inespecíficas intercurrentes. Se describen mejorías en el índice de supervivencia de pacientes con cáncer de pulmón que desarrollaron infecciones inespecíficas o un empiema en el período postoperatorio; estos procesos actuarían estimulando las reacciones inmunitarias frente al tumor residual. La supervivencia a los 5 años en el grupo de pacientes que desarrolló un empiema fué del 50%, cifra notoriamente más elevada que el 18% del grupo en que no se presentó dicha complicación (PATTILLO, 1976b) Esta acción beneficiosa pueda quizás explicarse por la activación macrofágica y linfocitaria inducida por los antígenos y toxinas bacterianas que origina una "destrucción inespecífica" de las células tumorales residuales.

c) reacciones inmunológicas.

d) interferencia con la nutrición de la neoplasia.

e) sensibilidad inesperada a una terapéutica habitualmente insuficiente.

f) diagnóstico histológico incorrecto de malignidad.

No obstante hoy por hoy la invocación de estos factores sigue siendo hipotética al menos en parte, permaneciendo aún desconocido el mecanismo único o múltiple, de la regresión espontánea de los tumores.

Ahora bien, la inmunidad puede jugar un importante papel. Se describen casos de regresión de cánceres cutáneos primarios y metastásicos (STJERNSWARD y LEVINE, 1971) tras la sensibilización del paciente al dinitroclorobenceno (DNCB) y aplicación local de esta sustancia en el área tumoral. El DNCB es un hapteno que se sabe sensibiliza alrededor de un 90% de la población normal y que se emplea en el estudio de la hipersensibilidad cutánea retardada; en los individuos sensibilizados induce una marcada infiltración de células mononucleares en el lugar de la aplicación. El problema estriba en saber si la aparente destrucción de las células tumorales es debida a un mecanismo inmunológico específico o es simplemente el resultado de una acción antitumoral devida a la presencia de un gran número de células mononucleaa

res secundaria al estímulo inflamatorio. RATNER (1968) en un estudio sobre micosis fungoide comprobó que podía con seguirse una regresión de las lesiones con DNCB pero no por medio de reacciones inflamatorias aplicando lauril-sulfato sódico. A su vez KLEIN (1969) consiguió inducir la regresión de tumores cutáneos mediante la transferencia de leucocitos obtenidos de donadores sensibilizados al DNCB, lo cual sugiere un mecanismo inmunológico específico celular-mediado.

WEINTRAUB y LAGASSE (1973) consiguieron la regresión de lesiones vulvares de tipo Bowenoides en dos pacientes, una de las cuales no había respondido al tratamiento tópico con 5-FU, mediante la sensibilización al DNCB y el empleo de esta sustancia en forma de pomada sobre las lesiones vulvares. En ambos casos una biopsia practicada a los seis meses de finalizar el tratamiento revelaba únicamente la existencia de acantosis y fibrosis subepitelial sin presencia de atipias. Los autores aconsejan este tipo de terapéutica en pacientes jóvenes con procesos vulvares localizados de este tipo antes de recurrir a la cirugía.

3.2.2.- Observaciones clínicas sobre el desarrollo y curso de las neoplasias.

Existen variaciones muy importantes en la duración de la fase premaligna (precancerosa) según diferentes individuos. Por otra parte hay muchos casos de pacientes que sobreviven largos períodos de tiempo con un equilibrio biológico respecto a su cáncer que permite sospechar un control probablemente de origen inmunológico.

A este respecto es interesante el caso descrito por CHEUNG y cols. (1973) acerca de la prolongada supervivencia en una paciente de 22 años de edad que presentaba un cisto-adenocarcinoma seroso papilar del ovario y que no aceptó ser intervenida quirúrgicamente cuando se le diagnosticó la existencia de una tumoración pelviana. Diez años más tarde se descubrió la presencia de una masa pélvica bilateral con calcificaciones a rayos X. Siendo imposible la extirpación quirúrgica se procedió a irradiar la masa tumoral. Pasados otros 18 meses se apreció la existencia de adenopatías supraclaviculares cuyo exámen histopatológico reveló que se trataba de metástasis de un cistoadenocarcinoma seroso papilar del ovario. La paciente falleció dos años después y en la autopsia se descubrieron numerosas metástasis de características parecidas a

las diagnosticadas previamente y con sustitución en algunos puntos del tejido metastásico por granulomas calcificados o de tipo sarcoideo. Ante esta prolongada supervivencia los autores plantean la cuestión de un posible factor inmunológico en el desarrollo de estas lesiones "protectoras" frente a la agresión tumoral.

Vemos pues casos de algunos carcinomas que tras un largo período de latencia desarrollan de forma inesperada metástasis múltiples, lo que puede sugerir la existencia de una reacción inmunitaria capaz de controlar la tumoración primitiva y que en un momento determinado, quizás por una inmunosupresión escapa a su control.

3.2.3.- Descubrimientos inesperados en autopsias.

Para algunos tipos de neoplasia la prevalencia post-mortem descubierta en el momento de la autopsia es mucho más elevada que el promedio de su incidencia clínica (CURRIE, 1973). Por ejemplo, el neuroblastoma acusa de forma espectacular este fenómeno con una proporción entre incidencia post-mortem y enfermedad clínicamente detectable de 40/1. Algo parecido ocurre con los carcinomas prostáticos y tiroideos.

En un estudio posterior, SUEN y cols. (1974) hallan 324 cánceres incidentales entre 3535 autopsias realizadas en pacientes mayores de 65 años, siendo la prostática la más frecuente de dichas neoplasias. Señalan los autores que la incidencia de estas neoplasias inesperadas aumenta con la edad, hecho que ha sido indicado también por otros autores (Mc KEOWN, 1956; HOWELL y PIGGOT, 1958; BERG y cols., 1971).

Estos hallazgos implicarían que en personas aparentemente sanas y normales se desarrollan y regresan continuamente neoplasias malignas, lo cual parecería confirmar la teoría de la "surveillance inmunológica".

Por otra parte apoya también esta teoría el que se halle una mayor frecuencia de neoplasias al

avanzar la edad dado que si bien el sistema linforetico- lar actúa a lo largo de toda la vida del individuo, su función es más débil precisamente en los dos períodos de máxima aparición de las neoplasias, es decir, la infancia, cuando el sistema inmunitario es inmaduro y la vejez, cuando dicho sistema entra en decadencia. Existen datos que apoyan la disminución de la capacidad inmunológica en el hombre con el paso de los años (GIANNINI y SLOAN, 1957; LITWIN y SINGER, 1965; CAMMARATA y cols., 1967; PISCIOTTA y cols., 1967; GATTI y GOOD, 1970). Sin embargo no resulta fácil relacionar exactamente la edad, la depresión inmunitaria y el cáncer ya que contrariamente a lo que hemos citado en cuanto a la incidencia de tumores primarios inesperados, diversos autores (ONUIGBO, 1962; ARONSON y cols., 1964; VIADANA y cols., 1973; SUEN y cols., 1974) señalan que las neoplasias tienden a ser menos agresivas y más localizadas y metastatizan menos cuanto mayor es la edad del individuo. Ello se ha comprobado entre otros, para el cáncer de mama y de pulmón y para las metástasis cerebrales.

3.2.4.- Aparición y desaparición de focos tumorales.

En algunos casos de melanoma maligno con afectación cutánea múltiple se observa un comportamiento muy diferente para cada foco tumoral de modo que mientras unos se desarrollan, otros regresan completamente (BODENHAM, 1968). En los puntos de regresión puede comprobarse la existencia de un infiltrado linfomonocitario lo que puede indicar una participación del huésped en el proceso.

3.2.5.- Respuesta a la quimioterapia.

En ocasiones se observan regresiones tumorales dramáticas tras la administración de citostáticos a dosis de las que no cabría esperar una acción tan eficaz. Esto se comprueba especialmente en casos de linfoma de Burkitt o coriocarcinomas, dos neoplasias para las que existen muchas razones que hacen suponer una influencia de la inmunidad en su historia natural.

3.2.6.- Déficits inmunitarios y cáncer humano.

Si las reacciones inmunológicas del huésped son las responsables de la inhibición del desarrollo tumoral, es decir, si la "surveillance inmunológica" es un fenómeno cierto, los pacientes que presentan un déficit de su status inmunitario deberían padecer una mayor incidencia de procesos malignos que los que tienen un sistema inmunocompetente normal. Y así es. Estas inmunodeficiencias pueden ser congénitas, yatrógenas y adquiridas.

3.2.6.1.- Déficits inmunológicos congénitos.

Muchos niños que presentan síndromes inmunodeficitarios sobreviven actualmente gracias a terapéuticas y a tratamientos antibióticos adecuados; con ello se hace cada vez más evidente que ciertos grupos de estos niños están mucho más predispuestos a padecer enfermedades malignas.

Uno de los datos más convincentes en favor de la asociación oncogénesis-inmunidad lo constituye el

hecho de que la incidencia de neoplasias malignas en estos pacientes con inmunodeficiencias primarias es unas 10.000 veces mayor que en la población general de la misma edad (GATTI y GOOD, 1971). Cada una de la mayoría de estas anomalías inmunológicas primarias se asocia a una constelación de neoplasias que si bien coinciden en parte, son interesantes desde el punto de vista de los mecanismos oncogénéticos. Los más frecuentes suelen ser los tumores del sistema linforeticular que constituyen una de las causas de muerte más importantes de estos enfermos.

Los pacientes que presentan una agammaglobulinemia infantil tipo Bruton (ligada al cromosoma X) carecen de células plasmáticas e inmunidad humoral. No fabrican anticuerpos frente a la inmunización con antígeno diftérico, tetánico o tífico, y los niveles de inmunoglobulinas son extraordinariamente bajos. Por el contrario estos niños son capaces de rechazar injertos cutáneos y presentan reacciones de hipersensibilidad cutánea retardada correctas. Su inmunidad de tipo celular está intacta y cuando sus linfocitos son estimulados in vitro con fitohemaglutinina, la respuesta obtenida es normal. Padecen principalmente infecciones por gérmenes pió-

genos encapsulados tales como el neumococo, Haemophilus influenzae, estreptococo, meningococo y Pseudomona aeruginosa.

Estos niños presentan fundamentalmente neoplasias del sistema linfoideo hematopoyético, habiéndose descrito casos de leucemias y linfomas (PAGE y cols., 1963; REISMAN y cols., 1964; GATTI y GOOD, 1971). Esto concuerda con los trabajos de GORER y AMOS (1956) que señalaban que la respuesta inmune humoral parece ser de importancia primordial en la defensa frente a ciertos tipos de leucemia en el ratón, sugiriendo que la leucemogénesis requiere no sólo un órgano adecuado para la diferenciación y expansión de clonos malignos, sino también una respuesta humoral inmune deficitaria. Presentan de forma global un 5% de neoplasias.

La antitesis inmunológica de la agammaglobulinemia infantil tipo Bruton la constituye el síndrome de Di George en el cual permanece intacta la inmunidad humoral mientras no existe inmunidad de tipo celular. La falta de desarrollo de la tercera o cuarta bolsas faríngeas conduce a la formación de un timo extremadamente pequeño o a la ausencia del mismo en estos pacientes. Las células plasmáticas se hallan en proporción normal mien-

tras que los linfocitos pequeños faltan con frecuencia totalmente. Los homoinjertos cutáneos no son rechazados, no hay respuesta de hipersensibilidad cutánea retardada y los linfocitos periféricos no responden a la fitohemaglutinina. Estos niños carecen también de glándulas paratiroides y sufren de tetania neonatal con frecuencia. Mueren en etapas precoces de la vida por su hipoparatiroidismo o por infecciones intercurrentes. Hasta el momento no se ha descrito la existencia de neoplasias en estos pacientes.

En los enfermos afectados de una inmunodeficiencia combinada grave (denominada anteriormente agammaglobulinemia de tipo suizo) falta tanto la inmunidad humoral como la celular y en consecuencia se presentan gran número de infecciones tanto bacterianas, como víricas, por hongos y protozoarias. Fallecen también precozmente y raramente sobreviven al primer año de vida sin tratamiento. Los trasplantes de médula ósea han permitido recientemente que estos niños tengan una vida sana y normal gracias a que con ello se reconstituyen ambos tipos de inmunidad. Pero a pesar de la rareza de esta enfermedad y de las muertes precoces por infección se han descrito algunos casos de neoplasias (incidencia aproximada de un 5%) asociadas a la misma, como leucemia aguda (KADOWAKI y cols., 1965),

linfosarcoma (LAMVIK y MOE, 1969) y Hodgkin (Von BERMUTH y cols., 1970).

En los pacientes afectos de un síndrome de Wiskott-Aldrich, si bien pueden presentarse neoplasias no linfoideas, también la mayoría de tumores que padecen son de origen linforeticular (COLEMAN y cols., 1961; AMIET, 1963; PEARSON y cols., 1966; RADL y cols., 1967; BRAND y MARINKOVICH, 1969; OPPENHEIM y cols., 1970) y en conjunto la frecuencia de aparición de neoplasias es del 10%. Estos niños sufren infecciones bacterianas recidivantes graves, eczema y trombocitopenia. Raramente sobreviven más allá de la pubertad. Desde el punto de vista inmunológico presentan unos niveles de IgM muy bajos, la IgG es generalmente normal y la IgA puede ser normal si bien con frecuencia está bastante elevada, así como la IgE que en muchos de estos pacientes se halla a unos niveles muy por encima de la normalidad. La inmunidad de tipo celular se mantiene intacta en las fases iniciales de la enfermedad pero con el tiempo estos enfermos se hacen anérgicos a los tests cutáneos de hipersensibilidad cutánea retardada y hay una disminución de la respuesta in vitro de los linfocitos a mitógenos como la fitohemaglutinina. La formación de anticuerpos frente a diversos estímulos antigénicos es normal si bien lo característico de esta inmunode-

ficiencia es una respuesta pobre o ausente a los antígenos de tipo polisacárido. Mueren precozmente debido a infecciones masivas, hemorragias intensas secundarias a la trombocitopenia o a neoplasias. Aproximadamente uno de cada diez de estos niños fallece con un cáncer y es muy posible que con los mejores cuidados pediátricos generales de que disponemos actualmente esta incidencia aumente.

Un hecho importante a destacar en esta enfermedad es la existencia de voluminosas adenopatías que persisten durante años. En los pocos casos en que se han biopsiado estos nódulos linfáticos la histología revela casi siempre la existencia de una estimulación antigénica crónica sin signos sospechosos de malignidad. Sin embargo en ocasiones estos niños han desarrollado neoplasias linforeticulares como por ejemplo de tipo sarcomatoso.

La estimulación antigénica crónica seguida del desarrollo de una neoplasia maligna se ha observado también en algunos pacientes afectados de la denominada forma "variante común" de inmunodeficiencia (denominada anteriormente hipogammaglobulinemia de tipo adquirido, hipo o disgammaglobulinemia esporádica). Se describen casos de leucemia (HUDSON y WILSON, 1960) de linfoma (FUDENBERG y SOLOMON, 1961), de adenocarcinoma gástrico (HUIZEN-

GA y cols., 1961), de linfosarcoma (GREEN y cols., 1966; DOUGLAS y cols., 1970), de reticulosis maligna (PELKONEN y cols., 1963), de cáncer rectosigmoideo (HERMANS y cols., 1966) e incluso de mama (HART y GOOD, 1971).

En estos pacientes se hallan con frecuencia linfadenopatías intestinales junto a infecciones por *Giarda lamblia* y algunos de estos pacientes son los que han desarrollado posteriormente carcinomas gástricos o rectales (HERMANS y cols., 1966). También se han descrito casos de linfomas foliculares benignos (MARTIN y cols., 1956; WOLF, 1962; WOLF y cols., 1963). En la familia de uno de los pacientes con este trastorno inmunitario asociado a una hiperplasia linfoidea crónica, varias personas fallecieron de lupus eritematoso sistémico (en una de las cuales se descubrió un timoma postmortem) una murió de Hodgkin, otras dos presentaban una trombocitopenia idiopática, algunas sufrían una artritis reumatoide, ilitis regional o un eritema multiforme y tres miembros más de la familia padecían fiebres de origen desconocido. Y en otras tres personas se descubrieron diferentes formas de la denominada disgammaglobulinemia (WOLF, 1962; WOLF y cols., 1963).

Los pacientes con esta forma "variante co-

mún" de déficit inmunitario constituyen el grupo más numeroso dentro del capítulo de las inmunodeficiencias congénitas y de ahí su nombre. Sin embargo no es grupo totalmente homogéneo y posiblemente incluye algunos tipos de déficits inmunológicos todavía no clasificados. En general los niveles de inmunoglobulinas son muy bajos y la inmunidad de tipo celular se mantiene normal hasta estadios avanzados de la enfermedad. A la larga, la mayoría de pacientes pierden la capacidad de manifestar respuestas cutáneas de hipersensibilidad y el tests de transformación linfocítica con fitohemaglutinina está también disminuido. Es en este período cuando se observa con más frecuencia la hiperplasia linfoidea.

De forma general podemos decir que en este tipo de inmunodeficiencia el tipo de neoplasia más frecuente lo constituyen los tumores linfoides, pero tanto estos como los ~~no~~ linfoides son mucho más frecuentes en estos pacientes (10% de casos) que en la población general.

En casos de déficits de inmunoglobulina A aislados o asociados a otros trastornos inmunológicos, se ha descrito la existencia de adenocarcinomas gástricos (HERMANS y cols., 1966; HAERER y cols., 1969; FRASER y RANKIN, 1970). HAMOUDI y cols. (1974) describen un caso excep

cional de aparición de neoplasias primarias múltiples en una chica joven que presentaba un déficit de IgA. A los 10 años de edad se le diagnosticó la existencia de múltiples pólipos adenomatosos en el colon que fueron extirpados quirúrgicamente, presentando uno de ellos una transformación maligna. En los ocho años siguientes presentó un timoma maligno, un carcinoma escamoso celular del cuero cabelludo, un adenocarcinoma de colon que recidivó y un tumor coroideo del ojo. Falleció a los 20 años de edad por un astrocitoma maligno del cerebro. Una hermana de esta paciente murió a los 16 años de edad debido a un linfoma linfocítico bien diferenciado con invasión de las meninges. La primera paciente presentaba unos niveles séricos de IgA inferiores a un 20% de la normalidad y en su hermana esta inmunoglobulina estaba totalmente ausente.

Se ha señalado también que los pacientes con un déficit selectivo de IgA padecen infecciones recidivantes del tracto respiratorio superior, celiacía, hiperesplenismo y trombocitopenia, enfermedades granulomatosas crónicas, retraso mental y estatural, hiperplasia nodular intestinal, nefritis crónica y procesos autoinmunes como enfermedades del colágeno, tiroiditis y anemia perniciosa (HOBBS, 1968; STOCKER, y cols., 1968; TOMASI, 1968; AMMANN y HONG, 1971).

No está totalmente clara la relación entre el déficit de IgA y todos estos trastornos ya que por otra parte existen casos de déficit de IgA accidentales, en personas por lo demás totalmente normales.

Sin embargo se sabe que la inmunoglobulina A es la predominante en la secreción intestinal (BULL y TOMASI, 1968; PLAUT y KEONIL, 1969) y se cree que está producida principalmente en el intestino delgado (AMMAN y HONG, 1971) lo cual podría explicar la rareza de neoplasias en esta zona. Las inmunoglobulinas intestinales, al igual que las células linfoides de las placas de Peyer, podrían tener un papel protector frente a las infecciones entéricas y frente a las neoplasias digestivas producidas por agentes oncógenos de la dieta o procedentes del metabolismo de las bacterias intestinales.

La ataxia telangiectásica es una enfermedad que se inicia con una ataxia incluso ya en el primer año de vida apareciendo algunos años más tarde telangiectasias en ojos y orejas. Existe un defecto anatómico del timo con déficit de la inmunidad celular junto a bajos niveles de IgA. Como mínimo un 10% de estos pacientes fallecen debido a un cáncer, pero la incidencia real debe ser más elevada dado que aproximadamente en el 35% de casos

en los que se realizó autopsia pudo evidenciarse la existencia de una neoplasia (GOOD,1974). El tipo de neoplasia que se presenta con más frecuencia son las del sistema linforetico, pero pueden hallarse tumores de otras localizaciones incluyendo tejidos de tipo epitelial. Se describen los casos de seis familias en que más de un hermano con ataxia-telangiectásica presentaron el mismo tipo de cáncer (HECHT,1966; AMMANN y cols. 1969;CASTAIGNE y cols., 1969; HAERER y cols., 1969; LAMPERT, 1969;SZANTO 1971) dándose incluso un caso de aparición de adenocarcinoma gástrico en dos hermanas de 19 y 21 años de edad. En ninguna de estas familias apareció neoplasia alguna en los otros hermanos no afectados de ataxia-telangiectásica.

3.2.6.2.- Déficits inmunológicos yatrogénicos.

Las alteraciones inmunitarias de tipo yatrogénico que se desarrollan durante el tratamiento de una serie de enfermedades, se asocian también a una elevada incidencia de neoplasias. PENN (1969,1970,1971,1972,1974a,1974b, 1975,1976) se ha ocupado ampliamente de este tema y estableció un Registro de Tumores en Denver a partir de 1968 para el control de estos casos.

Estas neoplasias pueden aparecer en tres tipos de pacientes: 1) enfermos que reciben algún órgano en trasplante y que son sometidos a tratamientos inmunosupresores, 2) pacientes con una serie de enfermedades no malignas y que reciben terapéuticas inmunosupresoras, y 3) pacientes afectados de una neoplasia y sometidos por ello a tratamiento citostático.

a) Inmunosupresión y cáncer en trasplantados.

Las neoplasias pueden hallarse en tres grupos de pacientes receptores de algún órgano trasplantado: 1) pacientes en los que el cáncer surgió "de novo" en algún momento después del trasplante, 2) aquellos en los que el cáncer fué implantado accidentalmente con el órgano trasplantado, y 3) enfermos que presentan una neoplasia antes

del trasplante.

Hay una incidencia del 5-6% de cánceres "de novo" en pacientes sometidos a tratamientos inmunosupresores por haber sido trasplantados y que se hallaban aparentemente libres de toda neoplasia antes del trasplante y en el momento del mismo (PENN, 1976). Esta frecuencia es aproximadamente unas 100 veces superior que la observada en la población general de la misma edad.

En 1974 (b) PENN señalaba que se habían registrado 190 cánceres "de novo" en 182 enfermos trasplantados (180 de riñón y 2 de corazón). Ciento veintitrés de estos pacientes (67%) presentaban 129 tipos de neoplasias epiteliales, mientras que en otros 60 enfermos (33%) se hallaron 61 tumores de tipo mesenquimatoso (uno de los pacientes presentó primero un cáncer epitelial y posteriormente desarrolló otro mesenquimatoso).

La mayoría de neoplasias aparecieron en personas jóvenes (promedio de 38, oscilando entre los 8 y 70 años) estando el 57% de los pacientes por debajo de los 40 años de edad. La media de tiempo en que tardaron en aparecer los tumores fué de 28 meses tras el trasplante, siendo de 32 para las lesiones epiteliales y de 20 para las mesenquimatosas.

Los cánceres cutáneos (57 casos) constituyen el tipo de neoplasia epitelial más frecuente, seguida del cáncer labial (16 casos) y de cuello uterino (15 casos). Las lesiones cutáneas con frecuencia era múltiples y en ocasiones extensas áreas de piel habían sufrido una transformación claramente maligna o presentaban un cáncer intraepitelial (enfermedad de Bowen). La presentación de las neoplasias cutáneas llamó la atención a los cirujanos que realizan trasplantes en Australia donde la intensa radiación solar y la constitución genética de la población hacen que este cáncer sea relativamente común. Así WALDER y cols. (1971) hallaron 7 cánceres cutáneos entre 51 trasplantados de riñón (14%), y afirman que bajo la influencia de la inmunosupresión la hiperqueratosis cutánea evoluciona más rápidamente a carcinoma escamoso-celular y las neoplasias cutáneas tienden a ser múltiples. MARSHALL señalaba en 1973 que el cáncer de piel era el tipo más frecuente de neoplasia en el registro de trasplantes de Australia y Nueva Zelanda.

Entre las neoplasias mesenquimatosas el tipo más frecuente lo constituyeron los linfomas sólidos (53 casos), de los cuales la mayoría (38) eran sarcomas reticulocelulares.

Es de destacar también el considerable número de neoplasias del tracto digestivo registradas (74 en total; 38 de ellas de tipo epitelial y 36 mesenquimatosas).

En 1975 PENN señalaba que se habían descrito ya doscientos cincuenta y seis cánceres en 249 pacientes trasplantados.

Han sido descritos por lo menos 46 casos de pacientes receptores de riñones en los que se trasplantó un cáncer de manera accidental. Los donadores presentaban la neoplasia ya en el momento del trasplante o se evidenció su presencia varios meses más tarde. En ninguno de los casos el órgano trasplantado presentaba macroscópicamente signos de afectación neoplásica; sin embargo en algunas ocasiones una autopsia cuidadosa llevada a cabo tras la extirpación del órgano del donador, reveló la existencia de cáncer en el riñón contralateral y esto condujo en algunos casos a la extracción del trasplante (PENN, 1970, 1974).

Treinta de estos receptores no presentaron signos de afectación neoplásica ni en el momento de la autopsia ni durante los controles practicados que oscilaron entre 1 y 36 meses. Posiblemente los injertos no presentaban cáncer o las células neoplásicas trasplantadas

no consiguieron implantarse y desarrollarse en el huésped. En otros cuatro pacientes pudo detectarse la neoplasia en los riñones cuando se extirparon estos en los primeros 16 días tras el trasplante. En dos receptores más tanto el riñón como las estructuras vecinas estaban afectadas, mientras que en otros diez había además signos de afectación neoplásica a distancia. Siete de estas diez personas fallecieron de su cáncer trasplantado y en una séptima las metástasis contribuyeron sin duda a su muerte. En los tres pacientes restantes se interrumpió el tratamiento inmunosupresor; presumiblemente se recuperaron las defensas inmunitarias del huésped y los cánceres fueron aparentemente rechazados y desaparecieron (WILSON y cols., 1968; ZUKOSKI y cols., 1970; LANARI y cols., 1972).

En 1976 PENN señalaba que constaban en el Tumor Registry de Denver 101 casos de pacientes que presentaron un cáncer en los 5 años anteriores al trasplante.

En 70 de estos receptores (69%) el trasplante se llevó a cabo específicamente para el tratamiento del cáncer de uno o ambos riñones (42 casos), carcinoma primitivo o metastásico del hígado (26 casos), cáncer de laringe (1 caso) y tumor desmoide recidivante de intestino delgado (1 caso). Cuando se realizó el trasplante la neopla-

sia parecía estar bien localizada y resecable por lo que se esperaba conseguir la "curación", excepto en dos casos. Uno se trataba de un paciente con un carcinoma de vías biliares en el que se practicó un trasplante hepático paliativo y en otro caso de trasplante renal no pudo extirparse completamente el tumor.

En 31 de los 101 pacientes (31%) los cánceres eran independientes del trasplante renal e implicaban la piel, tiroides, paratiroides, testículos, vejiga urinaria, bronquio, mama, cuello uterino, intestino delgado y colon. Un paciente presentaba además una leucemia linfática crónica en remisión y otros dos se hallaban afectados de mieloma múltiple, uno de los cuales estaba también en fase de regresión.

Prácticamente todos los pacientes recibieron tratamiento inmunosupresor prolongado con azatioprina (Imuran) y prednisona. Además algunos enfermos fueron sometidos durante cortos períodos de tiempo (días o semanas) a tratamientos con globulina antilinfocítica, actinomicina D, ciclofosfamida y otras drogas similares.

De los 101 pacientes, 57 (56%) no presentaron signos de recidiva del tumor primitivo en controles que oscilaron entre 2 1/2 y 101 meses. En 3 (3%) el

cáncer originario se mantuvo sin variaciones y cuatro de los receptores (4%), 3 de los cuales habían presentado un carcinoma renal preexistente y otro un carcinoma ureteral, desarrollaron tumores "de novo" (cáncer bronquial; reticulomasarcoma cerebral; leiomiomasarcoma gástrico; carcinoma cutáneo) de un tipo completamente diferente al de su neoplasia primitiva. En 2 de ellos la nueva neoplasia contribuyó a su muerte.

En treinta y ocho pacientes (38%) se presentaron recidivas o metástasis entre 2 1/2 y 83 (media de 12) meses tras el trasplante. En algunos de los 15 pacientes sometidos a trasplante hepático las metástasis aparecieron al poco tiempo y crecieron a un ritmo espectacular, siendo el propio homoinjerto asiento de metástasis masivas (STARZL y cols., 1971a, 1971b). De los 12 enfermos sometidos a trasplante renal por neoplasias del tracto urinario, se presentaron metástasis múltiples en 11 de ellos y en el otro hubo una recidiva local. El paciente sometido a trasplante laríngeo falleció de una recidiva local a los 10 meses.

De los 31 pacientes en los que los cánceres eran incidentales en relación al trasplante, 10 de ellos presentaron recidivas o nuevas neoplasias.

b) Cáncer en pacientes bajo tratamiento inmunosupresor por enfermedades no malignas.

En 1972 PENN y STARZL recogían 30 casos de pacientes que tras haber sido sometidos a terapéuticas inmunosupresoras por enfermedades diversas no neoplásicas, habían desarrollado un cáncer. En 1974 (PENN) se señalaban ya 46 neoplasias en 45 de estos pacientes. Entre las enfermedades tratadas con agentes inmunosupresores se incluyen procesos renales crónicos como el síndrome nefrótico, psoriasis, lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, colitis ulcerosa, dermatomiositis y crioglobulinemia. Las drogas usadas fueron diversas tales como metotrexate, azatioprina, ciclofosfamida, clorambucil, prednisona y otras. Y entre los tipos de neoplasia que aparecieron las más frecuentes fueron las del sistema linforetico, describiéndose casos poco corrientes como el desarrollo de un linfoma cerebral en un paciente tratado con azatioprina por un lupus eritematoso sistémico (LIPSMEYER, 1972) y un reticulosarcoma vulvar que apareció en una mujer de 34 años bajo tratamiento con prednisolona y azatioprina por una dermatomiositis (SNEDDON y WISHART, 1972).

Resulta difícil hacer una evaluación de estos casos individuales y sería necesario poder comparar estos grupos de pacientes tratados mediante inmunosupresores con otros individuos control sanos y de edad parecida. PARSONS y cols. (1974) hallaron que 8 de 28 pacien-

tes (29%) que presentaban una artritis reumatoide tratada con estas drogas y habían fallecido, presentaban cáncer, en comparación con sólo el 6% de los enfermos que no recibieron este tipo de terapéutica. Es aún más destacable el hecho de que 7 de estos 8 pacientes presentaron una neoplasia de tipo linfoproliferativo, cifra significativamente superior a la esperada en el resto de la población.

c) Pacientes cancerosos tratados con quimioterápicos antineoplásicos.

El incremento del número de supervivientes a largo plazo en algunos tipos de cáncer como por ejemplo el tumor de Wilms, leucemia linfocítica aguda y enfermedad de Hodgkin, justifican la utilización de terapéuticas antineoplásicas agresivas. Sin embargo si bien se conocen los efectos secundarios inmediatos de estos tipos de tratamiento, las consecuencias a largo plazo no están aún bien definidas. Una de estas últimas la constituye el desarrollo de una neoplasia secundaria como consecuencia del tratamiento anticanceroso.

Por otra parte se ha comprobado la aparición de una posible lesión precancerosa, la displasia epitelial, en los pacientes tratados con drogas anticancer

cerosas (WESTON y GUIN, 1955; KOSS y cols., 1965; MIN y GYORKE, 1968; SCHRAMM, 1970; BOWENSIMPKINS y HULL, 1974).

Tras excluir aquellos tipos de cáncer como los linfomas o algunos tipos de leucemia que pueden sufrir una conversión a otro tipo de neoplasia similar, PENN señalaba recientemente (1976) que se habían descrito 166 nuevos cánceres en 160 pacientes neoplásicos sometidos por ello a tratamiento citostático.

La mayoría de estos 160 pacientes recibieron tratamiento para neoplasias que normalmente responden bien a los citostáticos, especialmente linfomas, leucemias y otros trastornos hematológicos malignos. En la mayoría de casos se utilizó más de un quimioterápico y el tipo de neoplasia que se desarrolló con más frecuencia fueron diferentes formas de leucemia (72 casos-43%), seguida de los linfomas sólidos (34 casos-20%) y carcinomas de vejiga urinaria (18 casos-11%).

Los tumores secundarios aparecieron entre 1 mes y 11 años (media de 3,5) tras el inicio de la quimioterapia, y a pesar de las modificaciones introducidas en el régimen quimioterápico a fin de tratar los nuevos cánceres, así como los primitivos si aún existían, la mayoría de pacientes no respondieron al tratamiento y fallecieron poco tiempo después de aparecer la neoplasia

secundaria.

La posibilidad de que se desarrolle una nueva neoplasia secundaria al tratamiento citostático se explicaría según HARRIS (1976) porque estas drogas, de forma parecida a lo que ocurre con los carcinógenos químicos, lesionan las células al inducir alteraciones en las macromoléculas celulares incluido el DNA. En el paciente canceroso esta lesión se produce tanto en las células neoplásicas como en las normales. Puede ser que el daño celular resulte letal, lo cual es la consecuencia deseable para las células neoplásicas. Otra posibilidad es que haya un proceso reparador que conduzca de nuevo a las células no-neoplásicas a su estado normal. Pero si no tiene lugar esta reparación, existe la posibilidad de una mutación y/o transformación maligna, de modo que estas nuevas células neoplásicas pueden progresar entonces hasta manifestarse clínicamente si las defensas del huésped son inadecuadas.

Si bien se ha comprobado (PENN, 1973) que los quimioterápicos antineoplásicos pueden producir roturas cromosómicas, alteraciones nucleares, displasias citológicas y efectos teratogénicos en el hombre, hasta el momento sólo se ha comprobado una acción oncogénica directa para la clornaphacina, cuya administración va seguida con frecuencia de la aparición de un cáncer vesical (VIDE-

BAEK, 1964; THIEDE y CHRISTENSEN, 1969; LAURSEN, 1970). Esta sustancia es metabolizada a beta-naftilamina que se excreta por la orina y que se sabe produce cáncer de vejiga urinaria en los trabajadores de anilinas.

Además de esta posible acción oncogénica directa los quimioterápicos e inmunosupresores pueden potenciar los efectos de carcinógenos ambientales tales como el tabaco, radiaciones y luz ultravioleta. Es también posible que su capacidad inmunosupresora pueda ser la responsable de su potencial oncogénico. Uno de estos mecanismos patogénicos se basaría en permitir el crecimiento y desarrollo de virus oncógenos; sabemos que las infecciones víricas son frecuentes en enfermos sometidos a tratamientos inmunosupresores o citostáticos (ARMSTRONG, 1973; COLEMAN y cols., 1973; STEVENS, 1973) y algunos de estos virus son precisamente aquellos considerados como potencialmente oncogénicos en el hombre (Epstein-Barr, herpes hominis II, polioma virus). Otra posibilidad patogénica sería la de producir una depresión de la función de "surveillance inmunológica" del sistema linforeticular. Normalmente esta capacidad del sistema inmunitario destruye, o al menos controla en su crecimiento, a las células del organismo que continuamente están sufriendo mutaciones y algunas de las

cuales son potencialmente malignas. Los tratamientos inmunosupresores pueden deprimir esta función, permitiendo con ello el desarrollo de las neoplasias. Pero la inmunosupresión podría no sólo permitir el desarrollo de nuevos cánceres sino que actuaría también adversamente sobre las neoplasias preexistentes al alterar, en caso de que existiera, el equilibrio entre los linfocitos sensibilizados que tienen a destruir las células malignas y los anticuerpos favorecedores que tienden a protegerlas, de modo que una depresión de la inmunidad celular favorecería un mayor crecimiento y diseminación de las neoplasias.

Pero además hay que tener en cuenta otros factores dependientes del huésped y que determinan en parte la susceptibilidad de las células del mismo a una sustancia o carcinógeno determinado. Así por ejemplo muchos carcinógenos químicos y drogas antineoplásicas requieren para su actuación ser activadas por enzimas microsomales. Estudios llevados a cabo en gemelos han demostrado que las variaciones individuales existentes en el metabolismo de las drogas en el hombre, son mayores que las variaciones debidas a factores exógenos (VESSEL y cols., 1971). Por tanto factores genéticos que controlan estos aspectos del

metabolismo puede explicar sobre una base farmacológica, que ciertos individuos sean especialmente susceptibles a la carcinogenicidad de los quimioterápicos antineoplásicos al inducir su activación metabólica. La edad es otro factor a tener en cuenta. Para una dosis total determinada se ha comprobado que la edad de la primera exposición a los carcinógenos químicos constituye un importante factor de riesgo en estudios experimentales y en algunas investigaciones epidemiológicas en el hombre. Así por ejemplo los individuos jóvenes presentan un riesgo más elevado de padecer un carcinoma bronquial por tabaco que los más viejos (HAMMOND, 1966) y lo mismo ocurre con el cáncer de vejiga; el riesgo es tanto mayor cuanto más precozmente ha empezado a trabajar el individuo en ciertas ocupaciones industriales que se sabe favorecen el cáncer vesical (HOOVER y COLE, 1973). Por tanto las consecuencias de la quimioterapia en los niños pueden ser importantes en caso de mostrarse especialmente susceptibles a la carcinogenicidad de los fármacos antineoplásicos.

El problema se complica aún más si se tiene en cuenta que otros procedimientos terapéuticos como la radioterapia que se utilizan conjuntamente con los citostáticos en el tratamiento de las neoplasias, pueden ser también oncogénicos (ARSENEAU y cols., 1972; CASTRO y

cols., 1973). En las series del National Cancer Institute la incidencia de neoplasias secundarias en los pacientes tratados con radiación más quimioterapia fué unas 24 veces superior a la esperada normalmente (PENN, 1976). El melfalán, la ciclofosfamida y el busulfán son agentes alquilantes que fueron de los fármacos más utilizados en dichas series, y los tres poseen capacidad mutagénica y son carcinógenos en animales de laboratorio (KOLLER, 1957; WALPOLE, 1958). En cambio la actinomicina D disminuye el riesgo de aparición de cánceres secundarios en niños debido al tratamiento radioterápico (D'ANGIO, 1976). La radioterapia por otra parte puede deteriorar también la resistencia inmunitaria del huésped frente a la neoplasia (WODRUFF, 1964; STJERNWARD y cols., 1972; MEYER y cols., 1973).

Todas estas observaciones e incluso datos contradictorios acerca de la posible acción cancerígena de las terapéuticas antineoplásicas, indican la necesidad de llevar a cabo un cuidadoso control y seguimiento de los supervivientes a largo plazo que han recibido este tipo de tratamiento y el empleo creciente de los quimioterápicos inmunosupresores en una serie cada vez más

numerosa de enfermedades no neoplásicas (procesos autoinmunes) exige la puesta en marcha de investigaciones encaminadas a determinar este riesgo potencial en el hombre. Si además la depresión del sistema inmunitario facilita el desarrollo de las neoplasias, el estudio inmunológico del paciente canceroso y una inmunoterapia adecuadas pueden mostrarse de gran utilidad.

3.2.6.3.- Déficits inmunológicos adquiridos.

Este grupo estaría constituido por aquellos casos de aparición de más de un tumor maligno histopatológicamente diferentes en un mismo paciente. Existen actualmente en cientos de publicaciones más de 30.000 casos aportados de neoplasias malignas primarias múltiples (MOERTEL, 1977), si bien este fenómeno fué descrito ya por primera vez en 1889 por BILLROTH.

No se dispone de una explicación totalmente convincente acerca de los mecanismos de aparición de los cánceres multicéntricos pero entre las causas posibles, tales como las genéticas o hereditarias (LYNCH y cols., 1977), entran en consideración también las inmunitarias. Existen datos que apoyan esta última posibilidad. En primer lugar sabemos hoy que para la mayoría de neoplasias existe un déficit en la función inmunitaria del enfermo. Por otra parte rara vez es posible trasplantar con éxito un tumor maligno de una persona a otro individuo sano (SOUTHAM, 1957, 1958, 1964); las células neoplásicas son reconocidas como extrañas por el sistema inmunitario del huésped y son rápidamente destruidas. Sin embargo antes hemos visto como en casos de terapéuticas inmunosupresoras, las células malignas transferidas pue-

den fácilmente implantarse, invadir y metastatizar ampliamente. Pero además se observa que cuanto más inmunosupresor ha sido un tratamiento, la incidencia de tumores pluricéntricos se eleva. Así por ejemplo en la revisión de PEREZ-TORRUBIA y cols. (1975) sobre 5.329 casos de enfermos oncológicos, 207 han presentado otra u otras neoplasias con distinta localización y anatomía patológica, lo que representa un 3,08%. Estos 207 casos se distribuyeron de manera diferente según el tipo de terapéutica (y acción inmunosupresora de la misma) que fué aplicada a la primera tumoración:

- sólo cirugía: el 18,34% presentaron posteriormente otro tipo de tumor.
- sólo radioterapia: el 18,33%.
- cirugía más radioterapia: el 23%.
- cirugía más radioterapia más quimioterapia: el 40,33%.

3.2.6.4.- Inmunodeficiencias y cáncer ginecológico.

Se ha descrito la aparición de neoplasias ginecológicas malignas en pacientes sometidas a inmunosupresión por trasplante renal, en mujeres no trasplantadas pero que recibían este tipo de terapéutica por hallarse afectas de enfermedades autoinmunes y en enfermas bajo tratamiento citostático por cáncer. Se describen además casos de aparición de nuevas neoplasias primarias en pacientes que presentaban originalmente un carcinoma de cuello uterino.

El tipo de lesión que con más frecuencia se asocia a la inmunosupresión es el carcinoma in situ del cérvix (PRITZKER y cols., 1970; PENN y STARZL, 1972). De 18 casos de cáncer de cérvix aportados al Transplant Tumor Registry de Denver hasta marzo de 1974, 16 eran lesiones preinvasivas (PORRECO y cols., 1975). Todas las pacientes habían sido sometidas a trasplante renal y se les administraba prednisona y azatioprina; cuatro de ellas habían recibido además globulina antilinfocítica. El diagnóstico se realizó al practicar colpocitologías de control rutinarias. La edad de las pacientes oscilaba entre los 22 y 50 años (media de 36) y el tiempo promedio que transcurrió desde el momento del trasplante hasta llegar

al diagnóstico fué de 38 meses (oscilando desde 6 a 97). Una de las dos pacientes con un carcinoma invasivo falleció debido a las metástasis que se produjeron, mientras que otras tres muertes fueron debidas a una complicación infecciosa en un caso y al rechazo del homoinjerto en otros dos. Tras un cálculo estadístico algo complejo los autores llegan a la conclusión de que el riesgo de que se presente un carcinoma preinvasivo del cérvix en pacientes sometidas a trasplante renal, es unas 14 veces superior que en otras mujeres de la misma edad, y aconsejan un control ginecológico riguroso de estas enfermas.

Se ha observado también este tipo de lesión cervical en pacientes con lupus eritematoso sistémico tratado con azatioprina y prednisona (NAJARIAN, 1970) y en casos de psoriasis (ROENIGK y cols., 1969) y enfermedad trofoblástica (ROSS, 1971) tratados con metotrexate. El busulfán (GURELI y cols., 1963; KOSS y cols., 1965) y la ciclofosfamida (HILLEMANS y WAGNER, 1960) pueden asociarse también a la aparición de displasias cervicales. Para la azatioprina se ha descrito la aparición de esta lesión tras sólo 12 días de tratamiento (GUPTA y cols., 1969).

BOWEN-SIMPKINS y HULL (1975) describen el

caso de una paciente de 26 años de edad que seis años antes había sido sometida a trasplante renal y recibía tratamiento con azatioprina. La práctica de una colpocitología rutinaria permitió diagnosticar la existencia de múltiples focos neoplásicos preinvasivos en vagina además del cérvix. En una mujer de sólo 43 años de edad se diagnosticó un reticulosarcoma de vulva tras cinco meses de tratamiento con azatioprina por dermatomiositis (WISHART, 1973). PENN (1974a) describe la aparición de un cáncer de ovario en una chica de 16 años que había sido sometida a trasplante renal y KIM y WILLIAMS (1972) aportan un caso de carcinoma endometroide de útero y ovarios en una paciente de este mismo tipo. También tras un trasplante renal se ha señalado la aparición de un cáncer de endometrio (MAKOWSKI, 1977) pero en relación a este tipo de neoplasia más interesante es el caso descrito por HODGKINSON y WILLIAMS (1977) acerca de una mujer de 43 años de edad amenorreica desde hacía 20, y en la que se desarrolló un carcinoma de endometrio tras 16 meses de tratamiento con prednisona y 14 con azatioprina debido a una poliomiocitis-esclerodermia.

En la serie recogida por PENN (1976) de 166 nuevos cánceres aparecidos en pacientes neoplásicos bajo tratamiento citostático se describen 3 carcinomas

de cuello uterino, 3 neoplasias mamarias, 1 cáncer de vulva y 1 carcinoma de ovario. En la mayoría de estos casos el tumor primitivo era del sistema linforetico, utilizándose para su tratamiento quimioterápicos diversos como busulfán, melfalán, clorambucil, ciclofosfamida, 5-FU, etc. Como con otras neoplasias es posible que estas drogas, mientras que por un lado controlan la neoplasia originaria, por otra parte pueden contribuir al desarrollo del cáncer ginecológico secundario. Así por ejemplo GREENSPAN y TUNG (1974) señalan una incidencia de aparición de cánceres secundarios del 15% en pacientes con carcinoma ovárico en estadio III que alcanzaron y mantuvieron una regresión completa de su neoplasia tras más de 5 años de quimioterapia intensiva.

MOULD y BARRET (1976) hallan una incidencia de un 2,6% de aparición de nuevas neoplasias primarias en mujeres afectas originariamente de cáncer de cuello uterino desde estadio I al IV. De un total de 4.502 pacientes estudiadas se hallaron 116 nuevos cánceres en 113 pacientes, siendo los más frecuentes los de pulmón, mama, colon y recto. Esta incidencia es inferior a la de otros autores (4,1% de ARNESON y SCHELLHAS, 1970), y por otra parte existen opiniones contradictorias acerca de si la radio

terapia por cáncer de cérvix juega algún papel en la aparición de la neoplasia secundaria.

3.2.7.- Evidencia histológica.

La experiencia ha demostrado que la evolución de una neoplasia maligna viene determinada en gran parte por la localización anatómica y tipo histológico tumorales. Sin embargo para algunos tipos de cáncer existen variaciones en su comportamiento biológico, de manera que si bien el grado histológico tiene un valor pronóstico no es infrecuente observar como tumores del mismo tipo y grado se comportan de manera diferente en huéspedes distintos. Ello se explica porque el curso evolutivo de un proceso canceroso no depende simplemente de la malignidad tumoral intrínseca, sino que es el resultado de una interacción competitiva entre la agresión neoplásica y la resistencia del huésped.

Hace ya años (GOLDMANN, 1907; MURPHY, 1926) que se sugirió la posibilidad de que factores dependientes



del huésped, posiblemente de naturaleza inmunológica y expresados histológicamente, pueden jugar un papel en el pronóstico del cáncer. Y en efecto parece ser así; en diferentes tipos de neoplasias malignas puede comprobarse una infiltración tumoral por linfocitos, macrófagos y células plasmáticas y una reacción histiocitaria en los ganglios linfáticos. Ello es característico de una respuesta inmunitaria dado que todas estas células participan como sabemos en el rechazo de tejidos alogénicos y diversos estudios experimentales han demostrado una relación entre la presencia de linfocitos en los ganglios de drenaje tumorales o de un aloinjerto y la inmunidad celular mediada (SCOTHORNE y MCGREGOR, 1955; BLACK y SPEER, 1959; GOWANS, 1959; MATTHEIEM, 1962; ALEXANDER y FAIRLEY, 1967; BAILIF y JONES, 1969).

Además existen datos en favor de que las neoplasias que presentan estas infiltraciones celulares tienen un mejor pronóstico; sin embargo en casos avanzados desaparecen. Ello indica que si bien son involucradas reacciones inmunitarias, luego, al avanzar el crecimiento tumoral son dominadas. Así por ejemplo EDWARDS y cols. (1971) comprueban la existencia de cambios morfológicos específicos en los nódulos linfáticos regionales

durante el desarrollo de adenocarcinomas en roedores. Al principio existe una respuesta inmunoblástica caracterizada por la proliferación de linfocitos pequeños en el cortex y zona paracortical, seguido de una migración de células plasmáticas a la medular y un aumento del tamaño y actividad mitótica de los centros germinales. Finalmente, en los estadios terminales del desarrollo tumoral, desaparecen las células linfoides y se produce una destrucción y hialinización de las áreas cortical y paracortical ganglionares. Estos cambios morfológicos están directamente relacionados con el curso clínico del desarrollo tumoral en el huésped; y no sólo en tumores experimentales sino también para diferentes tipos de neoplasias humanas. BLACK y cols. (1971) comprobaron que la infiltración histiocitaria se asociaba a una menor incidencia de metástasis ganglionares linfáticas y a una mayor supervivencia tanto en el carcinoma gástrico como mamario. De forma similar esta relación entre infiltración ganglionar linfo-histiocitaria y significación pronóstica ha sido comprobada por otros autores para el cáncer de laringe (MALICKA, 1971), de mama (ANASTASSIADES y PRYCE, 1966; HAMLIN, 1968; SILVERBERG y cols., 1970; BLACK, 1973; TSAKRAKLIDES y cols., 1974) y cuello uterino (TSAKRAKLIDES y cols., 1973; Van NAGELL y cols., 1977).

También tienen valor las características histológicas del tumor primario. ELSTON (1969) halla una estrecha correlación entre la infiltración celular y pronóstico en el coriocarcinoma. Hallazgos similares se han comprobado en casos de melanoma maligno (THOMPSON, 1972), neuroblastoma (LAUDER y AHERNE, 1972), carcinoma mamario (BLACK y cols., 1975), enfermedad de Hodgkin (LUKES, 1964) y tumores testiculares (DIXON y MOORE, 1953).

Parece existir por tanto una relación entre la presencia de células inmunocompetentes en los tejidos tumorales y el pronóstico del cáncer. Pero es interesante además destacar el hecho comprobado mediante trabajos retrospectivos de que también el número total de linfocitos circulantes en sangre periférica antes del tratamiento posee un valor pronóstico y constituyen un índice de la inmunocompetencia del huésped. Aquel sería peor para los pacientes con una linfocitopenia y ello ha sido comprobado para neoplasias como el carcinoma mamario (PAPATESTAS y cols., 1974, 1976), bronquial (KRANT y cols., 1968), de cérvix uterino (RIESCO, 1970) y de ovario (WOLFF, y OLIVEIRA, 1975).

Finalmente cabe preguntarse, ¿ son inmunológicas todas estas reacciones ?.

Ante los datos de experimentación y hechos clínicos expuestos hasta aquí hay que pensar si todas estas reacciones son realmente inmunológicas y corresponden en su totalidad a una manifestación de la resistencia del huésped. A este propósito debe señalarse que no pueden excluirse a priori los mecanismos no inmunológicos. Existe por ejemplo el fenómeno de la inhibición allogénica o la inhibición de contacto que no representan fenómenos de verdadera resistencia. Sin embargo, existe indudablemente un potente componente inmunológico a pesar de que en clínica humana los fenómenos pueden ser algo diferentes de lo que ocurre en los modelos experimentales de iso-injertos. Representan unas potencialidades biológicas dignas de una cuidadosa investigación.

3.3.- Mecanismos efectores en inmunidad tumoral.

Hemos visto anteriormente como diversos tipos de tumores de experimentación animal manifiestan neoantígenos capaces de introducir una respuesta inmunitaria. Esto se ha demostrado especialmente en los estudios de trasplante en los que se comprueba un rechazo tumoral cuando el huésped ha sido inmunizado previamente frente al tumor. Se ha observado también en estos sistemas experimentales que animales portadores de un tumor que no se halla bajo el control inmunológico del huésped, pueden sin embargo rechazar el implante de dosis limitadas de células del mismo tumor en otra localización. Estos estudios sobre "inmunidad concomitante" indican, paradójicamente, que el huésped es capaz de manifestar reacciones de rechazo tumoral incluso cuando el tumor inmunizante este desarrollándose de forma progresiva. Observaciones de este tipo señalan las limitaciones de los mecanismos defensivos del huésped al comprobarse que pequeñas cantidades de células tumorales pueden ser rechazadas mientras que una masa tumoral importante no se afecta.

Por razones éticas obvias no es posible la evaluación de la inmunidad frente a las células neoplásicas trasplantadas en el hombre, aunque como ya se

citó anteriormente se ha comprobado que los autoinjertos tumorales humanos no prenden fácilmente y son necesarias cantidades considerables de células para conseguir un crecimiento limitado de las mismas (SOUTHAM, 1965).

La posibilidad de disponer de tumores trasplantables en animales singénicos ha permitido valorar los respectivos papeles de la inmunidad celular y humoral en el rechace tumoral (HELLSTROM y HELLSTROM, 1974). Dichos estudios han establecido que, en general, la inmunidad celular-mediada es de importancia primordial dado que con frecuencia es posible transferir la resistencia antitumoral desde un huésped inmune a otros huéspedes normales compatibles a través de las células linfoides. Estas células pueden obtenerse de diferentes puntos como los ganglios linfáticos, bazo, exudados peritoneales y conducto torácico, pero como veremos posteriormente todavía es incierta la naturaleza de las poblaciones celulares efectoras. La transferencia de la inmunidad tumoral es posible no sólo por medio de células linfoides obtenidas a partir de animales inmunizados específicamente frente a un tumor, sino también con células de huéspedes portadores del tumor (DECKERS y cols., 1971).

El papel de los anticuerpos tumorales específicos en el rechace tumoral es más problemático. Los

estudios iniciales en que se intentó transferir pasivamente la inmunidad frente a células tumorales transplantadas mediante suero de dadores tumor-inmunes, llevaron a una serie de resultados contradictorios: algunos autores describieron un efecto favorable sobre el crecimiento tumoral, otros una débil inhibición del mismo y otros no evidenciaron ningún tipo de acción. Estos hallazgos iniciales llevaron a la opinión general de que los anticuerpos tumor-especificos no juegan ningún papel importante en el rechace tumoral e incluso puede favorecer el desarrollo del tumor actuando de forma antagónica. Este criterio debe de sostenerse actualmente de forma más moderada a la luz de trabajos recientes que demuestran que el suero "desbloqueante" puede ser útil en el tratamiento de los tumores por polioma, y que las células tumorales son destruidas in vitro por efectores celulares no sensibilizados en presencia de anticuerpos específicos (anticuerpos celular-dependientes), (HELLSTROM y HELLSTROM, 1974).

Gracias a las técnicas in vitro introducidas por estos autores se ha conseguido una mejor y más precisa evaluación del papel de las respuestas celular y humoral en la citotoxicidad tumoral. Sin embargo no es posible extrapolar totalmente los hechos observados in vitro con lo

acontecido in vivo. Así por ejemplo en algunos animales portadores de un tumor, los hallazgos obtenidos al estudiar la inmunidad celular y humoral por técnicas in vitro pueden estar en relación con las especificidades antigénicas conocidas de aquel tumor. Pero está claro que los antígenos tumorales detectados en la mayoría de las neoplasias humanas difieren en términos de su especificidad de los antígenos asociados a los tumores animales ya sean químico o viroinducidos. Ya se señaló anteriormente que los antígenos de las neoplasias inducidas por agentes químicos son característicos para cada tumor individual; en cambio la mayoría de tumores viroinducidos muestran especificidades relacionadas con el virus oncogénico particular. En el hombre, los estudios in vitro de citotoxicidad linfocitaria indican que las neoplasias humanas tienden a expresar antígenos que son característicos para el tipo histológico tumoral (HELLSTROM y HELLSTROM,1974). Así los linfocitos de un paciente con carcinoma de colon reaccionan con células tumorales del propio paciente y con células cancerosas alogénicas, pero no con las procedentes de otra persona. Pero a pesar de todo, hay que decir que el desarrollo de las técnicas in vitro han constituido un importante avance en el estudio de la inmunología tumoral.

3.3.1.- Mecanismos de destrucción de la célula tumoral.

La descripción de los mecanismos efectores implicados en la eliminación inmunológica de las células tumorales, así como el conocimiento de los factores séricos que pueden modificar la inmunidad celular, se basan en el desarrollo de técnicas in vitro (HELLSTROM y HELLSTROM, 1974).

La técnica de inhibición de colonias introducida por I.HELLSTROM en 1967 constituyó el primer método lo suficientemente preciso y sensible para cuantificar los efectos de las células linfoides inmunes sobre las células tumorales en cultivo. Las células diana se siembran en placas de Petri y posteriormente se añadan las células linfoides; se cultiva la placa durante 3-7 días y se tienen y cuentan las colonias de células tumorales. La proporción de células diana "muertas" se calcula comparando la disminución en el número de colonias que se han desarrollado tras la exposición a los linfocitos sensibilizados, con las colonias existentes en una placa control. Esta prueba fué modificada posteriormente dando paso al test de microcitotoxicidad en el que se incuban las células tumorales con las células efectoras durante 36-72 horas; al cabo de este período de tiempo se hace un recuento de las

células supervivientes. Existen otras variantes técnicas como el empleo de células tumorales marcadas con isótopos radioactivos (Cr^{51}), utilizándose la liberación de isótopo como índice de destrucción celular. Estas pruebas con Cr^{51} son más breves que las de citotoxicidad pero existen discordancias considerables en los resultados obtenidos con las mismas, especialmente en relación al posible papel de los factores séricos inhibidores. No existe una explicación convincente para este hecho pero puede influir los diferentes períodos de incubación. Con la prueba de liberación de Cr^{51} (cuyo período de incubación es sólo de algunas horas ya que de lo contrario se produciría una liberación espontánea de elemento radioactivo a partir de las células viables) se valora principalmente la acción citotóxica de las células efectoras presentes en la muestra, mientras que posiblemente el mayor período de incubación del test de microcitotoxicidad puede permitir la activación in vitro de las células efectoras cuando entran en contacto con el tumor; es decir, que con este último tipo de prueba se valoran conjuntamente los procesos de activación y citotoxicidad.

A partir de estos estudios in vitro han sido descritos diferentes mecanismos inmunológicos de destrucción celular tumoral. Estos son:

1) Acción citotóxica directa de linfocitos T (timo-dependientes) sensibilizados (WAGNER y cols., 1973) y potenciación de la misma por los macrófagos armados (EVANS y ALEXANDER, 1972; LOHMANN-MATTHES y FISHER, 1973).

2) Destrucción por células efectoras no sensibilizadas, a través de la unión de anticuerpos a la célula diana (Mac LENNAN, 1972; FORMAN y MOLLER, 1973).

3) Citotoxicidad por anticuerpos complemento-dependientes (DEICHMAN, 1969; PASTERNAK, 1969; BALDWIN, 1973).

El principal problema que se presenta al intentar aumentar la respuesta inmune del huésped frente al tumor, estriba en determinar la importancia relativa de cada uno de los posibles mecanismos inmunológicos. Con demasiada frecuencia, una maniobra encaminada a potenciar un mecanismo determinado puede neutralizar e incluso ir en detrimento de otros.

3.3.1.1.- Linfocitos T.

En todas las especies de mamíferos en las que se ha examinado adecuadamente se comprueba la existencia de dos sub-poblaciones de linfocitos circulantes. Estos dos tipos celulares pueden distinguirse tanto por criterios funcionales como por diferencias en sus características de superficie. Todos los linfocitos derivan de una stem-cell de la médula ósea; una porción sustancial de los linfocitos aquí originados penetran en el timo donde entran en rápida proliferación y sufren una serie de modificaciones tanto en su capacidad funcional como en sus propiedades de superficie. Una vez procesadas por el timo estas células son conocidas como linfocitos T o timo-dependientes. Los linfocitos que no han sido procesados se denominan linfocitos B o bursa-equivalentes o derivados de la médula ósea (el equivalente de la Bursa en los mamíferos es aún motivo de controversia y algunos inmunólogos consideran a los linfocitos B como derivados de la médula ósea).

Se ha afirmado que el rechazo de aloinjertos y la resistencia frente a tumores singénicos son fenómenos timo-dependientes. En otras palabras, el linfocito T juega un importante papel en el desarrollo de la inmunidad celular-mediada. La inmunidad humoral es un mecanismo

primariamente dependiente de las células B. Todo esto constituye una simplificación del problema; en el brazo aferente de la respuesta inmune frente a diversos antígenos existe una cooperación entre los linfocitos B y T. Aunque estudios en animales con práctica de timectomía indican que las células T juegan un papel central en los procesos inmunitarios frente a aloinjertos y tumores, no nos informan acerca de su misión en el brazo eferente de la respuesta inmune.¿ Son capaces los linfocitos T específicamente sensibilizados de destruir las células diana adecuadas in vitro?. Si lo consiguen in vitro,¿ es ello posible in vivo?. Durante mucho tiempo se ha considerado que las células T constituyen el principal mecanismo efector en inmunidad celular. Existen estudios que restan fuerza a esta afirmación. Así por ejemplo si bien CEROTTINI y cols.(1970) han demostrado que la actividad citotóxica específica de los linfocitos del ratón alo-inmune puede ser abolida mediante tratamiento del animal con suero antilinfocítico, GRANT y cols. (1973) han confirmado este hallazgo utilizando un sistema inmuno-experimental similar pero han señalado además que esta población de células T citotóxicas constituye únicamente una faceta pasajera del brazo eferente; pueden actuar al mismo tiempo otros mecanismos citotóxicos celular-dependientes. En otras palabras, las células

T citotóxicas representan un componente más dentro de una compleja batería de efectores celulares y sólo actúan en fases precoces de la respuesta inmunitaria. En la resistencia frente a tumores singénicos el papel de los linfocitos T está aún menos claro. LAMON y cols. (1973) han estudiado los efectos citotóxicos de los linfocitos frente a células tumorales singénicas y atribuyen aquella acción a las células B dado que podían separarse las células citotóxicas al exponer las suspensiones celulares a columnas de anti-inmunoglobulinas. Sin embargo el antisuero anti-linfocito T produce también una pérdida de la actividad citotóxica, hecho que sugiere que las células T juegan algún papel en la inmunidad frente a tumores singénicos.

WOODRUFF y cols. (1973) han demostrado que el ratón con deplección de células T resiste la implantación de células tumorales singénicas, pero en cambio tiene disminuída su capacidad para el rechazo de aloinjertos, hecho que habla también en favor de un papel importante de las células T en la resistencia global del huésped. CURRIE y GAGE (1973) han estudiado los ganglios linfáticos regionales de ratas portadoras de un sarcoma y sólo detectaron células citotóxicas en estadios iniciales del desarrollo tumoral; estas células presentaban una acción

totalmente específica, eran altamente radio-sensibles y no se adherían a la fibra de nylon, propiedades que sugieren que estos efectores celulares son linfocitos T. Sin embargo las células citotóxicas que se hallan en la sangre periférica de pacientes con carcinoma vesical no parecen ser células T (O'TOOLE y cols., 1973), dado que se puede extraer la población citotóxica por paso a través de una columna de anti-inmunoglobulina. Pero si las células T no constituyen por sí mismas un efector celular importante, pueden estar implicadas en otros tipos de reacciones citotóxicas. GRANT y cols. (1973) han demostrado que las células T sensibilizadas son las responsables de la producción de factores citotóxicos que arman específicamente a los macrófagos. Mac LENNAN y cols. (1970) han demostrado que la producción de anticuerpos celular-dependientes es una reacción que implica al timo y que requiere en alguna forma la cooperación con las células T. Estos linfocitos T podrían muy bien ser los responsables de la producción de linfoquinas y tener una importante función en la resistencia del huésped sin ser las responsables directas de la destrucción celular.

PLATA y cols. (1973) estudiando animales portadores de sarcomas inducidos por virus Moloney, halla-

ron que las células citotóxicas específicas del bazo del animal correspondían a linfocitos T, y no detectaron signos de acción citotóxica B. Estos resultados se contradicen con los de LAMON y cols. (1973) que llegan a resultados opuestos. El motivo de esta discrepancia radica en la metodología empleada por los dos grupos investigadores. Los primeros utilizaron la técnica de liberación de Cr^{51} , mientras que los segundos emplearon el test de microcitotoxicidad. Estos hechos señalan la importancia de la técnica empleada en inmunología tumoral y su influencia en la descripción y caracterización del fenómeno estudiado.

3.3.1.2.- Macrófagos.

Inicialmente se atribuyó un papel específico a los macrófagos en la destrucción de las células tumorales dado que se podía transferir pasivamente la inmunidad a receptores animales singénicos mediante la administración de las células de exudado peritoneal de huéspedes tumor-inmunes y ello se comprobó para diversos tipos de neoplasias animales. Este aspecto de la actividad macrofágica ha podido ser comprobado posteriormente mediante técnicas in vitro.

Los macrófagos citotóxicos pueden obtenerse a partir de huéspedes inmunizados (exudado peritoneal) o pueden producirse por contacto con células linfoides inmunes en cultivo. Pero además EVANS y ALEXANDER (1972) han demostrado que estas células linfoides inmunes cuando están en cultivo con células diana liberan un factor sobrenadante que es también capaz de "armar" específicamente a los macrófagos. Cuando un macrófago armado halla la célula diana específica adecuada, se transforma tanto morfológica como funcionalmente y estos macrófagos armados son hiperactivos. Se ha demostrado que esta "activación" macrofágica puede conseguirse también mediante antígenos no tumorales como la BCG.

Estos macrófagos "armados" presentan una acción citotóxica tumoral inespecífica y pueden actuar in vitro sobre diferentes tipos de células neoplásicas.

3.3.1.3.- Citotoxicidad por anticuerpos.

Los anticuerpos frente a antígenos de las células diana pueden presentar una acción citotóxica a través de dos mecanismos: 1º) gracias a la porción Fc de su molécula ("Fracción cristalizable" de la molécula de inmunoglobulina); no tiene actividad de anticuerpo pero puede proporcionar el punto de unión adecuado a una célula efectora no sensibilizada con un receptor Fc. De esta manera la célula diana, es destruída. 2º) a través de la fijación del complemento; las células tumorales pueden en ocasiones ser rápidamente destruídas por anticuerpos en presencia de complemento.

a) Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos. La destrucción de la célula tumoral por células linfoides normales en presencia de anticuerpos es-

pecíficos se ha implicado en diversos sistemas tumorales (McC LENNAN, 1972; FORMAN y MOLLER, 1973; HAKALA y LANGE, 1974). El efecto citotóxico se manifiesta únicamente si el anticuerpo presenta una porción Fc intacta a través de la cual se unen las células efectora y diana (FORMAN y MOLLER, 1973). Existen todavía controversias acerca de la naturaleza de la célula efectora implicada, pero actualmente se cree que la denominada citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo es efectuada por una célula con capacidad de ligera adherencia al vidrio y con receptores para Fc, llamada "célula K" (ROITT, 1977); si bien morfológicamente se asemeja a un linfocito pequeño no se sabe con certeza cual es la línea original de la célula K.

b) Citotoxicidad complemento dependiente.

La susceptibilidad tumoral a la acción citolítica de anticuerpos en presencia de complemento varía de un tipo celular a otro; así por ejemplo las células del linfoma y leucemia son muy sensibles al tratamiento con antisuero citotóxico, mientras que las sarcomatosas son notablemente resistentes. Estos anticuerpos citolíticos tumor-específicos podrían constituir una importante forma de resistencia humoral del huésped, pero en general no se pueden detectar en los animales portadores de un tumor a excepción de

los casos citados antes. En los linfomas inducidos por oncornavirus, que son altamente inmunogénicos, dichos anticuerpos son detectables en estadios precoces del desarrollo tumoral. En cambio en los sarcomas quimioinducidos nunca se hallan mientras el tumor está in situ; pero tras la amputación tumoral pueden aparecer estos anticuerpos en el suero.

En las neoplasias humanas se ha descrito la existencia de anticuerpos citolíticos complemento-dependientes en pacientes con melanoma maligno localizado (LEWIS y cols., 1969); al progresar la enfermedad dichos anticuerpos desaparecen del suero. MORTON y MALGREN (1970) los han detectado en pacientes con sarcomas y CURRIE (1973) ha demostrado que tras la inmunización con células tumorales irradiadas en pacientes con melanomas malignos o hipernefomas diseminados, aparecen anticuerpos circulantes que bajo condiciones especiales in vitro son capaces de lisar las células tumorales diana específicas.

Como regla general podemos decir que los anticuerpos tumor-específicos se desarrollan en las fases precoces de la enfermedad y tras la extirpación del tumor y que dichos anticuerpos pueden presentar una acción citolítica bajo una serie de condiciones artificiales.

3.3.2.- Factores séricos capaces de modificar la inmunidad celular antitumoral.

La primera demostración de que el suero de animales portadores de un tumor puede interferir con la inmunidad celular fué llevada a cabo por HELLSTROM y HELLSTROM, en 1969; estos autores comprobaron que el pretratamiento de las células del sarcoma de Moloney mediante suero inactivado por el calor procedente de animales portadores del tumor, evitaba su destrucción por los linfocitos inmunes específicos. Esta actividad bloqueante del suero se demostró posteriormente para una serie de tumores animales tanto viro como quimio-inducidos y en diversos tipos de neoplasias humanas (HELLSTROM y HELLSTROM, 1974).

Originalmente se postuló que el factor sérico bloqueante que protegía a las células tumorales del ataque linfocítico era un anticuerpo que interaccionaba con los antígenos de la superficie de la célula tumoral de forma análoga a lo que ocurre con los anticuerpos "favorecedores" que cubren los aloinjertos. Apoyaba esta teoría el hecho de que la capacidad bloqueante del suero de ratones portadores de sarcomas inducidos por virus Moloney podía ser absorbida sobre células tumorales intactas; además se detectó esta actividad bloqueante en la fracción inmunoglo

bulínica 7S del suero (HELLSTROM y HELLSTROM, 1969; BALDWIN y cols., 1973 a). Pero la hipótesis de que la actividad bloqueante del suero era imputable a un anticuerpo no pudo ser sostenida al demostrarse tanto en estudios experimentales como en tumores humanos que dicha actividad desaparecía rápidamente tras la extirpación completa del tumor (BALDWIN y cols., 1973 b). Y no sólo desaparecía el bloqueo de la citotoxicidad celular-mediada, sino que además se comprobó que el suero de animales o humanos que habían quedado libres de enfermedad neoplásica, neutralizaba la acción bloqueante del suero de portadores del tumor. Este efecto "desbloqueante" se comprobó en el suero de ratones con sarcoma de Moloney en fase de regresión (HELLSTROM y HELLSTROM, 1970b) y en animales a los que se extirpaba el tumor quirúrgicamente (BALDWIN y cols. 1974). Y el suero de pacientes cancerosos clínicamente libres de enfermedad presentaba una acción "desbloqueante" cuando se mezclaba con suero de enfermos portadores de neoplasia (HELLSTROM y HELLSTROM, 1974). En todos estos estudios la acción "desbloqueante" mostraba especificidades comparables a las de los neoantígenos asociados con el tumor en cuestión. Así por ejemplo, el suero procedente de ratas, que habían sido sometidas a la resección quirúrgica de un hepatoma trasplantado, neutraliza la

acción bloqueante del suero de otras ratas portadoras del hepatoma, pero en cambio se mostraba ineficaz cuando se en frentaba a suero de ratas portadoras de un tumor inmunoló gicamente distinto (BALDWIN y cols.; 1974).

La manera más sencilla de interpretar el fenómeno de desbloqueo es la de una neutralización del factor bloqueante existente en el suero por un anticuerpo, sugiriendo la implicación de complejos antígeno-anticuerpo tumor-específicos en la reacción de bloqueo. Sobre esta base, la rápida desaparición de la capacidad bloqueante del suero tras la extirpación del tumor, representaría la eliminación de los inmuno-complejos circulantes tras la ablación del tumor (fuente de los antígenos tumorales).

La implicación de los complejos inmunes en las reacciones del bloqueo se ve apoyada por los estudios que demuestran que el factor bloqueante del suero obtenido de animales o humanos portadores de un tumor puede ser absorbido sobre células tumorales viables y separado mediante ultrafiltración en dos fracciones de elevado y bajo peso molecular. Ninguna de estas fracciones por sí sola muestra capacidad bloqueante cuando se mezcla con células tumorales durante un corto período de tiempo y luego es extraída previamente a la adición de linfocitos sensibilizados; pero dicha capacidad se recupera cuando

ambas fracciones son recombinadas de nuevo (SJOGREN y cols. 1971c, 1972). En estos estudios se ha supuesto que las fracciones de elevado peso molecular contienen el anticuerpo y que el antígeno tumoral se halla en las de bajo peso. Una prueba directa de que los complejos antígeno-anticuerpo es pecíficos participan en las reacciones de bloqueo se basa en los estudios realizados en el hepatoma trasplantado en la rata (BALDWIN y cols., 1972a. El suero procedente de ratas en las que se extirpó quirúrgicamente un hepatoma injertado en crecimiento, contiene anticuerpos tumor-específicos demostrables por su citotoxicidad complemento dependiente para las células del hepatoma; dicho suero carece de acción bloqueante. Pero si se adiciona al antígeno tumor-asociado del hepatoma (purificado tras la solubilización con papaína de la membrana celular) se forman los in muno-complejos y aparece la acción bloqueante.

No se conoce aún con detalle el mecanismo de bloqueo por los inmuno-complejos tumor-específicos; el simple enmascaramiento del antígeno de la superficie celular tumoral evitando así el reconocimiento por parte de los linfocitos sensibilizados, es una explicación in suficiente. Es posible que la fracción antigénica del complejo inmune pueda jugar un papel más específico in hi biendo directamente al linfocito sensibilizado. Existen

estudios en los que se demuestra que la citotoxicidad de las células de los ganglios linfáticos en la rata inmunizada frente al hepatoma, queda inhibida específicamente tras una breve exposición al antígeno tumoral específico solubilizado (BALDWIN y cols. 1973 c).

La posibilidad de que el antígeno tumoral circulante pueda jugar un papel importante, quizás el principal, en las modificaciones de la inmunidad celular, se basa además en los estudios en que se demuestra que la citotoxicidad in vitro de los linfocitos de sangre periférica de pacientes afectados de un melanoma o un cáncer de colon puede ser inhibida de forma específica por contacto con el antígeno tumoral adecuado. En los pacientes con melanoma maligno ampliamente diseminado los linfocitos periféricos mostraron inicialmente una escasa citotoxicidad para las células del melanoma in vitro, pero la reactividad reapareció tras repetidos lavados de los linfocitos (CURRIE, 1973). El hecho de que esta capacidad del linfocito pueda ser inhibida de nuevo mediante la incubación con el suero del paciente, sugiere que el lavado eliminó un factor inhibidor.

Es interesante el hecho de que los linfocitos de pacientes con melanoma maligno en fases precoces o localizadas de la enfermedad sean activamente citotóxicos

in vitro. Lo mismo ha sido señalado en enfermos con ciertos tipos de sarcoma y carcinomas; ello sugiere que la citototoxicidad in vitro se pierde progresivamente a medida que la enfermedad avanza o recidiva. En otras palabras, se dispone de datos que sugieren que la capacidad citotóxica del linfocito puede variar según el estadio de la enfermedad. Esto parece estar relacionado a su vez con la cantidad de antígeno tumoral (libre o en forma de complejos antígeno-anticuerpo) existente en el organismo. Hallazgos recientes apoyan esta hipótesis (JOSE y SESHADRI, 1974).

La inmunidad celular en los individuos portadores de un tumor puede verse pues modificada de diferentes maneras. Puede producirse un bloqueo de las células tumorales por anticuerpos o inmunocomplejos, mientras que por otra parte la inhibición de las células efectoras (por ejemplo por interacción con el antígeno tumoral o los complejos inmunes) conducirá además a una pérdua de la inmunidad celular.

La valoración del papel de los factores séricos bloqueantes en inmunidad tumoral deriva aún en gran parte de los estudios in vitro, pero existen algunos

datos a favor de que estos factores pueden actuar también in vivo. Así por ejemplo WITZ (1973) comprueba la existencia de inmunoglobulinas unidas a las células tumorales en el ratón, y SJOGREN y cols. (1972) consiguen separar factor bloqueante a partir de tumores humanos frescos. Más importante para el huésped puede ser la producción de factores inhibidores del linfocito en las zonas que rodean al tumor de manera que se presente una anergia linfocítica local. Así en casos de carcinoma de colon se ha dado la paradoja de que mientras los linfocitos de sangre periférica se mostraban citotóxicos para las células tumorales, las células de los ganglios linfáticos regionales carecían de esta capacidad (NIND y cols., 1973).

El hecho de que la actividad bloqueante del suero de las ratas portadoras de un tumor por polioma pueda ser neutralizada por la administración del denominado suero "desbloqueante" indica también la importancia de los factores séricos bloqueantes/inhibidores. Esta antisuero "desbloqueante" procedente de ratas en las que se ha extirpado el tumor o de conejos inmunizados frente al mismo, contiene anticuerpos tumor-específicos citotóxicos para las células tumorales en presencia de complemento. La inyección de suero "desbloqueante" en ratas portadoras del tumor produce también una significativa inhibición del

crecimiento tumoral (BANSAL y SJOGREN,1972) y comprobándose además que puede modificar el grado de metastatización de los tumores primarios por polioma (BANSAL y SJOGREN,1973). Debe señalarse sin embargo que pueden producirse diversos tipos de respuesta tras la administración de este antisuero, incluyendo la destrucción de las células tumorales mediada por anticuerpos, por lo que no puede comprobarse una relación causal entre la pérdida de actividad bloqueante del suero y la regresión tumoral. No existen estudios clínicos suficientes en este sentido pero se ha demostrado en algunas situaciones que la presencia o ausencia de factores séricos bloqueantes puede tener una significación pronóstica. Por ejemplo HELLSROM y HELLSTROM (1974) hallan que en un grupo de pacientes en los que se estudió la actividad bloqueante del suero entre 1 y 3 meses tras la cirugía (cuando todos estaban clínicamente libres de neoplasia), 13 de los 14 en que se detectó dicha actividad presentaron una recidiva tumoral dentro del primer año tras la intervención, mientras que sólo recidivaron 3 de los 23 en que el resultado fue negativo.

3.4.- "Escape" del tumor a los mecanismos inmunológicos de control.

La aceptación de que los mecanismos inmunológicos antitumorales forman parte de la resistencia del huésped frente a la neoplasia, implica por un lado la aceptación de la antigenicidad tumoral y por otro la existencia de una respuesta del huésped no como un simple epifenómeno sino como una reacción de tipo específico.

Y todo ello nos enfrenta a un problema crucial en el terreno de la inmunología tumoral: ¿cómo consigue el clono celular maligno desarrollarse, sobrevivir y crecer progresivamente a despecho de esta respuesta inmune específica y potencialmente citocida?. Esta aparente paradoja inmunológica constituye el punto central de las actuales especulaciones acerca de la biología del desarrollo tumoral. Sólo cuando se descubra la forma en que las células neoplásicas escapan al control del huésped será posible establecer unos protocolos inmunoterápicos adecuados.

El desarrollo de un tumor parecería ser el resultado de un equilibrio entre las fuerzas que favorecen y que inhiben el crecimiento de las células tumorales. En el estado actual de nuestros conocimientos están

poco definidos los diversos aspectos del balance inmunológico existente entre el huésped y el tumor, postulándose incluso que algunos de ellos puedan tener un efecto protector más que destructor sobre la neoplasia. Existe una situación similar en muchos aspectos a la observada en el caso de los tumores malignos y en la que se da muy posiblemente esta acción protectora inmunológica: la gestación. La mujer ha de albergar, proteger y nutrir a un feto antigénicamente "extraño" y los mecanismos que actúan protegiendo a este semi-aloinjerto fetal están tan oscuros como los responsables del escape tumoral. Quizás exista un mismo fenómeno capaz de aclarar ambas situaciones. CURRIE (1969), revisando los posibles factores favorecedores de la supervivencia de los fetos de los mamíferos, ha señalado que el embarazo constituye el mejor experimento que la naturaleza nos ofrece en el terreno de la inmunología del trasplante para llegar a comprender la paradoja inmunológica implícita en el desarrollo de las neoplasias malignas.

Existen diversas vías posibles de escape tumoral que no tienen porque necesitar la existencia de una respuesta inmune específica protectora. Este concepto de inmunidad protectora puede ser el reflejo de nuestra ignorancia acerca de los mecanismos de escape; si a

pesar de existir tal tipo de respuesta el tumor sigue creciendo, puede ser simplemente por que aquella es ineficaz. A continuación se señalan algunos de estos hipotéticos mecanismos de escape.

Una primera posibilidad sería la existencia de un huésped inmunológicamente incompetente, de forma permanente o transitoria en el período de desarrollo tumoral. El huésped no reconoce los antígenos tumorales o carece de capacidad inmunitaria de rechazo. Ello sugiere la cuestión de que es lo que permite a los individuos normales reconocer como extrañas a las células tumorales. Una de las explicaciones propuestas es la de la "surveillance inmunológica", es decir, un mecanismo probablemente mediado por células linfoides circulantes y por el cual un huésped puede reconocer la antigenicidad de las células tumorales (que están surgiendo continuamente por procesos mutacionales) y destruirlas. La aparición de un tumor sería así el resultado del escape de un clono de células mutantes a la surveillance. Existen datos que hablan en favor de que son los linfocitos T los implicados en el mecanismo de supervisión inmunológica; hemos visto anteriormente como la timectomía neonatal y el tratamiento con suero antilinfocítico favorece la aparición de neoplasias en los animales, los estados de inmunodeficiencia tanto congénitos como ad-

quiridos se acompañan de una mayor incidencia de neoplasias en el hombre, y las personas ancianas que presentan una inmunocompetencia relativa en comparación con los jóvenes (WALDORF y cols., 1968) especialmente en relación a la inmunidad celular mediada por linfocitos T, se ven afectadas con más frecuencia de cáncer. Si bien todos estos datos son circunstanciales, en conjunto sugieren que un fallo en el mecanismo de surveillance puede ser el responsable de la aparición de la neoplasia.

Una segunda explicación a la posibilidad de que aparezca una neoplasia maligna es que el huésped presente una tolerancia inmunológica frente a los antígenos tumorales. Tolerancia significa que el huésped no puede responder dado que no reconoce al antígeno como extraño. Experimentalmente podemos introducir un antígeno en fases precoces del desarrollo del embrión cuando todavía no es inmunocompetente y posteriormente aquel antígeno no será reconocido como extraño por el sistema inmunitario maduro. El polioma virus en roedores o el de la leucosis en pollos introducidos en animales sin capacidad de respuesta inmunitaria dan lugar al desarrollo de tumores, mientras que en animales adultos inmunocompetentes se produce un rechazo precoz del virus (KLEIN, 1966b) No

existen datos acerca de si la tolerancia puede preceder o no al desarrollo de tumores humanos.

En tercer lugar cabe la posibilidad de que la masa tumoral antigénica presente un crecimiento tan rápido que supere la capacidad del huésped para detener su desarrollo. En la experimentación animal se observa que los tumores inducidos que aparecen tras un corto período de latencia son fuertemente antigénicos, mientras que los que tienen un período de latencia largo poseen una capacidad antigénica débil. Teóricamente debería ocurrir que los tumores altamente antigénicos con un crecimiento lento sean rechazados y a la inversa, es lógico pensar que los tumores fuertemente antigénicos que consiguen desarrollarse deben ser aquellos que presentan un crecimiento demasiado rápido para el sistema inmunitario del huésped.

Las tres posibilidades anteriores se refieren a la inducción tumoral: como surge y comienza a desarrollarse. Existe un cuarto fenómeno que puede explicar porque una vez aparecido el tumor continúa desarrollándose en el huésped. Es el fenómeno de la facilitación tumoral que ya se comentó anteriormente (HUTCHIN, 1968). La facilitación se refiere a una acción favorecedora del crecimiento

tumoral, pero el fenómeno es aplicable también a los trasplantes donde hay una protección de la destrucción del injerto. En ocasiones el pretratamiento con células tumorales muertas aumenta paradójicamente la susceptibilidad del huésped a la inoculación con células viables del mismo tumor. Los anticuerpos generados en el huésped protegerían al tumor de la destrucción por parte de los linfocitos T y los macrófagos. Ya hemos expuesto antes que este factor bloqueante parece corresponder a un complejo antígeno-anticuerpo.

4.- APLICACION DEL ESTUDIO INMUNITARIO EN EL
DIAGNOSTICO Y PRONOSTICO DE LAS NEOPLASIAS.

El diagnóstico precoz del cáncer es una de las más urgentes necesidades de la Medicina. Asimismo la detección temprana de las recidivas y la monitorización de los efectos terapéuticos podrían mejorar los resultados obtenidos.

La principal contribución de los métodos inmunológicos en este sentido radica en la detección de productos tumorales ("biological markers" o "tumor marker substances"). Las células malignas sintetizan diversos tipos de macromoléculas, algunas de las cuales no pueden ser producidas por los tejidos normales. Estas sustancias pueden ser liberadas a la sangre o a otros líquidos corporales en donde es posible detectarlas por técnicas de radioinmunoanálisis.

Pero por otra parte hemos visto que la transformación maligna de la célula conlleva la aparición en su superficie de unos determinantes antigénicos nuevos capa-

ces de desencadenar una respuesta inmunitaria específica en el huésped portador de la neoplasia. La detección y estudio de esta reacción inmune de defensa frente al tumor puede constituir también una ayuda en el diagnóstico y pronóstico del cáncer.

El estudio de la función inmunitaria del paciente canceroso es importante además por otras razones. En primer lugar es esencial una valoración inmunológica cuando se intenta establecer cualquier tipo de inmunoterapia. En segundo lugar es útil para establecer los esquemas quimioterapéuticos; existen tumores como el coriocarcinoma para el que se ha comprobado que la resistencia a la quimioterapia se asocia a un déficit progresivo de la función inmunitaria y al recuperarse dicha función, la droga para la que se había desarrollado aparentemente la resistencia vuelve de nuevo a actuar de forma eficaz. La monitorización inmunológica durante el tratamiento citostático puede permitir el establecimiento de esquemas terapéuticos más selectivos que no depriman la inmunidad celular. Y por último una correcta valoración inmunitaria de los enfermos cancerosos puede aportar alguna luz acerca del problema de si el déficit inmunológico se produce en el transcurso de la enfermedad o bien la inmunodefici-

ciencia se produce precozmente pudiendo estar implicada como un elemento más en la etiología del proceso maligno. Los pacientes cancerosos casi invariablemente evidencian un déficit inmunológico en algún momento de su enfermedad. En los estadios iniciales la función inmunitaria suele esta relativamente intacta, pero en fases avanzadas suele mostrar profundas depresiones. Con ello cabe preguntarse, ¿este déficit inmunitario se desarrolla únicamente como consecuencia del progreso de la enfermedad o es que existen alteraciones muy sutiles de la función inmune que contribuyen al desarrollo del proceso ?. Puede haber una asociación entre una capacidad inmunitaria determinda genéticamente y el desarrollo de la neoplasia; ello parece bastante evidente en las situaciones comentadas anteriormente de inmunodeficiencias congénitas en los niños, pero defectos más sutiles y difícilmente detectables pueden también jugar algún papel en la patogenia de ciertas enfermedades malignas en la vida adulta.

Finalmente hay que tener en cuenta al realizar un estudio inmunitario en pacientes cancerosos, que dicha función puede verse también afectada por otros factores además de la propia enfermedad. Los citostáticos, la radioterapia y la propia cirugía pueden alterar la capacidad de respuesta inmunológica y no hay que olvidar la in

volución progresiva y fisiológica del sistema inmunitario al avanzar la edad, hecho que debe de tenerse en cuenta en el momento de elegir los sujetos control para cualquier tipo de investigación inmunológica en los enfermos cance
rosos.

Existen diferentes formas posibles de como la inmunología puede contribuir al diagnóstico y pronóstico del cáncer (ver tabla III).

La primera posibilidad radica en la detec
ción de antígenos tumorales en el paciente canceroso. Las células neoplásicas pueden contener antígenos que no son detectables o se hallan presentes en muy pequeñas cantidades en las células normales. La existencia de anticuerpos en el suero de los pacientes o en el suero de animales inmunizados frente a estos antígenos, puede teóricamente ser útil para la distinción entre células tumorales y células normales. Para ser útiles en el inmunodiagnóstico los antígenos tumorales deberían ser comunes a una serie de tumores, al menos los del mismo tipo histológico. Como hemos visto anteriormente los estudios con sistemas experimentales animales demuestran que los tumores inducidos por carcinógenos químicos presentan unos anti-

Tabla III.- Aplicaciones de la inmunología al diagnóstico y pronóstico del cáncer.

1. Detección de antígenos tumor-asociados, o antígenos asociados a virus o a ciertos órganos o tejidos.
 - a- en las células tumorales.
 - b- circulantes en el plasma o en otras secreciones.
2. Estudio de la inmunocompetencia de los pacientes cancerosos.
 - a- inmunidad humoral.
 - b- inmunidad celular.
 - a'- in vivo
 - b'- in vitro
3. Estudio de la respuesta inmunitaria frente a antígenos tumor asociados o asociados a virus.
 - a- inmunidad humoral.
 - b- inmunidad celular.
 - a'- in vivo
 - b'- in vitro

genos de trasplatación que son específicos para cada tipo de tumor y no se hallan en otros tumores inducidos por el mismo agente químico. Dichos antígenos no constituirían ninguna ayuda diagnóstica ya que los anticuerpos preparados frente a un tumor determinado no reaccionarán con ningún otro tipo de tumor.

Sin embargo se han detectado otros antígenos que son comunes para diferentes neoplasias y que pueden agruparse en tres apartados: a) antígenos asociados a virus: los tumores inducidos por el mismo virus, aún cuando sean morfológicamente distintos, comparten los mismos antígenos tumor-asociados. Esto es lo interesante desde el punto de vista diagnóstico. No está demostrado que los tumores humanos estén inducidos por virus pero algunos de estos y sus antígenos van íntimamente asociados a algunas neoplasias humanas. Así por ejemplo el virus de Epstein-Barr se asocia al linfoma de Burkitt y al carcinoma nasofaríngeo (OLD y cols., 1966; HENLE y cols., 1969, 1970), el virus del herpes simple al carcinoma de cérvix uterino y cánceres de cabeza y cuello (HOLLINSHEAD y TARRO 1973; HOLLINSHEAD y cols., 1973; ADAM y cols., 1974; NAHMIAS y cols., 1974) y el virus del tumor mamario del ratón tiene relación con el carcinoma de mama (BLACK y cols., 1974). Incluso sin ningún tipo de conexión etiológica, los

antígenos asociados a dichos virus podrían constituir úti les elementos diagnósticos. b) Antígenos fetales o carcinoembrionarios: los antígenos presentes en las células fe tales normales pueden hallarse también en diferentes tipos de células tumorales independientemente de su etiología (COGGIN y cols.,1970;BALDWIN y cols.,1972;TING y cols., 1972). Fueron STONEHILL y BENDICH (1970) quienes postularon que la transformación celular maligna se asocia invariablemente a la producción de macromoléculas normalmente sintetizadas por las células embrionarias. Denominaron a este fenómeno "expresión retrogenética". El hecho de que prácticamente todas las sustancias descritas hasta el mo mento y que pueden constituir una ayuda diagnóstica sean de origen embrionario ,confiere un considerable valor a esta hipótesis. c) Antígenos tisulares:los antígenos tisu lares normales pueden estar representados en grandes canti dades en las células tumorales y algunos de ellos pueden ser específicos para el órgano del cual deriva el tumor (CRISLER y cols.,1966; ROSE y BONSTEIN,1970; CHIU y cols., 1974). La pérdida de ciertos antígenos normales órgano específicos de las células tumorales, podría también ser de utilidad diagnóstica (NAIRN y cols.,1960;HIRAMOTO y cols., 1961; BURTIN y CLAUSELL, 1973).

La depresión de la inmunocompetencia del paciente canceroso puede tener también aplicación diagnóstica. Se ha señalado la disminución de la "surveillance" inmunológica como un factor importante en el desarrollo de un tumor (BURNET, 1957; THOMAS, 1959; HERBERMAN, 1974); y a la inversa, el desarrollo tumoral puede también originar una inmunosupresión (HERBERMAN, 1974). En cualquier caso la disminución de capacidad de respuesta inmunitaria en comparación con individuos normales o afectos de enfermedades benignas, puede tener implicaciones diagnósticas.

Los antígenos tumor-asociados pueden desencadenar una respuesta inmunitaria en el individuo portador del tumor. En ocasiones los antígenos pueden ser reconocidos por el huésped cuando se hallan en cantidades mínimas y cabría suponer por tanto que pueden detectarse reacciones inmunológicas frente a los mismos cuando el tumor es aún pequeño y localizado. Pueden estudiarse tanto la respuesta humoral como la celular, además de los factores séricos bloqueantes de las reacciones celulares inmunes.

4.1.- "Biological markers".

La puesta en marcha de adecuadas y sensibles técnicas de radioinmunoanálisis ha permitido la detección de sustancias producidas y liberadas por el tumor en los líquidos corporales. Estas sustancias son fundamentalmente de tres tipos: hormonas, isoenzimas y antígenos tumor-asociados, elementos que son detectados por su antigenicidad, que pueden ser producidos por los tejidos del tumor o ser consecuencia de una producción ectópica y que en ocasiones pueden ser característicos de los tejidos fetales. Pero estos dos últimos conceptos quizás deban ser modificados en el futuro ya que algunos productos tumorales podrían ser sintetizados normalmente, aunque en mínimas cantidades, por los tejidos que consideramos como fuente ectópica de los mismos; y de forma similar el concepto de antígeno embrionario no excluye la presencia de productos fetales en el adulto, si bien a unos niveles mucho más bajos.

Los antígenos circulantes potencialmente útiles en el inmunodiagnóstico del cáncer se exponen en la Tabla IV. Hasta el momento los más utilizados han sido el CEA y AFP y también la HCG (beta-subunidad).

TABLA IV.- Antígenos circulantes potencialmente útiles en el inmunodiagnóstico del cáncer.

1.- Antígenos fetales:

- a) antígeno carcinoembrionario (CEA y CEA-S)
- b) alfabeto-proteína (AFP)
- c) gammafetoproteínas
- d) antígeno pancreático oncofetal

2.- Hormonas:

- a) gonadotrofina coriónica humana (β HCG)
- b) lactógeno placentario (HPL)
- c) calcitonina
- d) prolactina
- e) parathormona
- f) ACTH

3.- Otros:

- a) isoenzima de Regan
- b) ferritina
- c) antígenos viro-asociados
- d) caseína

El antígeno carcinoembrionario no presenta la especificidad para las neoplasias gastrointestinales que GOLD y FREEDMAN quisieron atribuirle cuando lo describieron por vez primera en 1965. Estos autores daban un porcentaje de positividades superior al 90% para los tumores digestivos cifra que no ha sido confirmada por todos los autores (REYNOSO y cols., 1972a).

El CEA se determina por radioinmunoanálisis en el plasma de los pacientes, siendo las dos técnicas más utilizadas las descritas por THOMSON y cols. (1969) y por HANSEN y cols. (1971 a, 1971 b) en los laboratorios Hoffman-La Roche. Mediante dichas técnicas se han podido detectar valores de CEA superiores a 2,5 ng/ml (cifra considerada como tope de normalidad) en una amplia variedad de procesos tanto malignos como benignos. Entre los primeros trabajos que demostraron la no especificidad del CEA para las neoplasias digestivas cabe citar los de REYNOSO y cols., (1972 a, 1972 b) que hallaban positividades para el CEA en casos de cáncer de mama, urogenital masculino y femenino, neuroblastoma y otros. Estudios posteriores han confirmado este hecho y se añadieron nuevos tipos de neoplasias a la lista, como por ejemplo el cáncer de pulmón (VICENT y cols., 1975). Pero además pueden existir valores de CEA eleva-

vados en casos de obstrucción de vías biliares (LURIE y cols.,1975), individuos fumadores (ALEXANDER y cols., 1976), enfermedades alcohólicas hepáticas (KUPCHIC y ZAMCHECK,1972), o procesos inflamatorios intestinales (RULE y cols.,1972) y otras enfermedades benignas como la bronquitis crónica (HANSEN y cols.,1974) que se acompañan de una anormal producción de moco.

Dada la posibilidad de que aparezcan pues no sólo falsos negativos sino también falsos positivos, todos los autores están de acuerdo en que el CEA no es útil como método precoz de diagnóstico del cáncer. ZAMCHECK y cols. (1972) no hallaron elevaciones de CEA en una serie de pacientes con neoplasias gastrointestinales localizadas y en un estudio realizado en Australia por STEVENS y cols. (1975) determinando el CEA en un importante panel de sueros, se comprobó que no era útil para la detección de individuos que posteriormente desarrollaron un cáncer.

Las aplicaciones clínicas del CEA irían en caminadas fundamentalmente a la evaluación de los efectos de la terapéutica y la detección precoz de las recidivas. En los pacientes en que se negativiza el CEA tras el tratamiento sería un índice de radicalidad de la terapéutica y la positivización de nuevo de aquella sustancia

puede preceder a la recidiva clínica en varios meses. Es decir que las determinaciones seriadas de CEA tendrían valor pronóstico y de monitorización del tratamiento, de manera que en general los valores bajos de CEA antes de la resección quirúrgica sugieren un pronóstico más favorable que los niveles altos, indicadores de una recurrencia con más probabilidad y ello se cumpliría tanto para el cáncer de colon como para aquellas neoplasias en que el CEA esté elevado (EGAN y cols.,1977). Por el contrario STEWARD y cols. (1974) señalan que en el cáncer de mama unos valores iniciales muy altos de CEA no implican necesariamente un peor pronóstico, ya que en su serie las dos pacientes que presentaron cifras más elevadas fueron las que respondieron mejor al tratamiento; y por otra parte indican que unos niveles iniciales de CEA bajos no garantizan una buena respuesta a la terapéutica. Por su parte CHU y NEMOTO (1973) hallan una buena correlación entre los niveles de CEA y la respuesta a la quimioterapia en las pacientes con carcinoma metastásico de mama, pero no consideran útil al CEA para la monitorización del tratamiento dado que la mejoría clínica de la paciente precede con frecuencia a la caída en los valores CEA.

También en el cáncer ginecológico se han realizado estudios en este sentido. Di SALA y cols.(1974,

(1975,1976) señalan casi un 50% de positividades en el cáncer invasivo utilizando 2,5 ng/ml como nivel de normalidad. En el 84% de pacientes con carcinoma escamoso recurrente de cérvix hallan valores de CEA elevados y comprueban para este tipo de neoplasia una notable correlación entre el tratamiento y normalización de los valores de CEA.

En otra serie importante Van NAGELL y cols. (1975b) hallan elevaciones del CEA por encima de 2,5 ng/ml en 81 de 100 enfermas con neoplasias ginecológicas y en 17 de 95 con procesos benignos. Señalan una correlación entre los valores de CEA y el grado de extensión de la enfermedad y la negativización de aquellos tras la resección quirúrgica del tumor. El mismo grupo de autores (1976) hallan valores superiores a 2,5 ng/ml en 29 de 100 pacientes con carcinoma preinvasivo del cérvix, retornando estas cifras a la normalidad dentro de las 8 semanas post-tratamiento en el 77% de las enfermas. Sugieren que niveles persistentemente elevados (> 5 ng/ml) se asocian a la existencia de neoplasia residual.

KHOO y Mac KAY (1973) hallan resultados similares en sus estudios sobre diferentes tipos de cáncer ginecológico incluyendo la mama. Obtienen el mayor índice de positividades para el cáncer de ovario (73%).

En cambio los resultados de LOGERFO y cols, (1971), de SEPPALA y cols. (1975), del grupo de Van NAGELL estudiando el cáncer de endometrio (1977a) y los muy recientes de PURI y cols. (1977), dan porcentajes de positividades inferiores para el cáncer ginecológico, oscilando entre el 20 y 30% de forma global.

Por otra parte existen trabajos como los de SAMAN y cols. (1976) en los que se concluye que no existe correlación entre el CEA y la evolución clínica en el cáncer de ovario y que las determinaciones de dicha sustancia carecen de valor para controlar los efectos de la terapéutica.

Los resultados son pues en ocasiones discordantes y se necesitan más estudios en este sentido. No debe olvidarse que las diferentes técnicas utilizadas y el hecho de que los radioinmunoanálisis no sean totalmente específicos pudiendo medir sustancias con reacción cruzada (COLIGAN y cols., 1973) son factores que pueden explicar el que los resultados obtenidos en los diferentes laboratorios no sean siempre estrictamente comparables desde el punto de vista cuantitativo (ZAMCHECK y KUPCHIK, 1974).

Todo ello indica que debemos ser muy cautos por el momento en la interpretación de los resultados;

así por ejemplo hay autores que señalan la necesidad de obtener dos (HOLYOKE y cols., 1975) y hasta tres (HERBERMAN, 1976) valores elevados CEA consecutivos a intervalos mensuales, para ser indicativos de recidiva tras la cirugía.

La investigación debe pues proseguir a fin de conseguir una mayor fidelidad diagnóstica para el CEA. Recientemente EDINGTON y cols., (1975) han descrito una forma isomérica del CEA detectable también por radioinmunoanálisis y que parece demostrar una elevada especificidad para el carcinoma de colon. La incidencia de falsos positivos en otras neoplasias y en procesos intestinales inflamatorios es muy baja, pero se requieren más estudios en este sentido.

Ultimamente se está llamando la atención acerca de la importancia de la detección del CEA en el propio tejido tumoral. Desde que recientemente PRIMUS y cols., (1975) describieron la técnica de inmunoperoxidasas para este fin, han surgido algunos trabajos al respecto en el cáncer ginecológico. GOLDENBERG y cols. (1976 a) detectaron el CEA en una serie de tejido tumorales diversos, incluyendo neoplasias ginecológicas y hallaron

que cuando el tumor primario contenía CEA, las metástasis eran así mismo positivas para CEA en más del 90% de los casos estudiados; por tanto, si el tumor primario contiene dicho antígeno es muy probable que el CEA pueda ser de utilidad para detectar la presencia de recidivas o metástasis ocultas. Estos autores hallan una falta de correlación entre los niveles plasmáticos y tisulares de CEA, confirmando así el trabajo anterior de KHOO y cols. (1973) en que no se encuentra correlación entre los valores de CEA en los extractos tumorales y los plasmáticos. Los niveles de CEA en plasma reflejarían la (concentración de CEA en el tumor X masa tumoral) más que la concentración tumoral de CEA únicamente. GOLDENBERG y cols. (1976 a) describen el caso de una paciente con carcinoma escamoso de cérvix cuyo valor de CEA en plasma era de 28 ng/ml mientras que la concentración de este antígeno en el tejido tumoral era de 90 ng/gr. Van NAGELL y cols. (1977a) afirman que el papel del CEA como "biological marker" en el cáncer ginecológico no está todavía resuelto y tampoco hallan relación entre los valores plasmáticos y tisulares del mismo en la neoplasia de endometrio. Más recientemente aún, PURI y cols. (1977) corroboran esta falta de paralelismo y señalan que la técnica de las inmunoperoxidasas constituiría un método más específico y sensible que los niveles plasmáticos para determinar la producción tumoral de CEA,

ya que está demostrado que la técnica inmunohistoquímica detecta ultraestructuralmente el antígeno a unas diluciones de anticuerpos mucho mayores que las utilizadas en el radioinmunoanálisis (MORIARTY y cols.,1973). En el estudio de PURI y cols. la mayoría de pacientes con cifras de CEA plasmático elevadas, presentaban una reacción negativa a las inmunoperoxidasas, sugiriendo que estas elevaciones plasmáticas no están relacionadas con la producción de CEA por las células tumorales. Este CEA plasmático procedería de otras fuentes distintas a la neoplasia específicamente estudiada, como podrían ser otros tumores ocultos (inespecificidad de la prueba) u orígenes inespecíficos y mal definidos como ocurre en los fumadores. La presencia o ausencia de CEA en la sangre podría venir influenciada por la rapidez en la síntesis del CEA, su liberación por el tumor, la vascularización del mismo y la metabolización de aquella sustancia por parte del paciente. Recientemente varios investigadores han llamado la atención sobre la importancia de la función hepática en el metabolismo del CEA, tanto en los animales como en el hombre (SHUSTER y cols., 1973; PRIMUS y cols.,1974; LURIE y cols.,1975). PURI y cols., señalan también que prácticamente todas las pacientes que presentaron claras y significativas elevaciones (> 20 ng/ml) de CEA plasmático, presentaron reacciones positivas a las

inmunoperoxidasas, lo que indica que existe una buena correlación entre estos elevados niveles de CEA y la presencia de células neoplásicas productoras del antígeno. Y concluyen que es en este tipo de pacientes con importantes elevaciones de CEA plasmático o con células productoras de CEA demostrado histoquímicamente, en las que el antígeno carcinoembriónico determinado seriadamente puede ser más útil para monitorizar el curso de la enfermedad.

Los estudios con alfa-fetoproteína (AFP) están en una fase de desarrollo algo más precoz que con el CEA. Por técnicas de radioinmunoanálisis (RUOSLAHTI y SEPPALA, 1971 b) se detecta especialmente en casos de carcinoma primitivo de hígado (Mc INTIRE y cols., 1972; RUOSLAHTI y cols., 1974 a) y teratomas (BRAUNSTEIN y cols., 1973) siendo utilizada para el diagnóstico y monitorización del tratamiento. Se han hallado también valores elevados (> 25 ng/ml) en casos de carcinoma gástrico (RAVRY y cols., 1974) y pancreático (RUOSLAHTI y cols., 1974 a) sin afectación hepática evidenciable.

Aunque pueden detectarse elevaciones de AFP en otros procesos hepáticos como por ejemplo los inflamatorios, es de destacar su notable especificidad para el carcinoma primitivo de hígado cuando se utilizan técnicas sen­sibles y adecuadas de radioinmunoanálisis. La recuperación

de una hepatitis aguda se acompaña de una caída en los niveles de AFP y la normalización o fluctuación de los mismos sugiere un origen benigno, mientras que una elevación de aquellos valores en ausencia de cualquier intervención quirúrgica son característicos de neoplasia, habiéndose señalado una correlación entre la AFP y los procesos regenerativos (RUOSLAHTI y cols. 1974b.)

La frecuencia de los tumores productores de AFP en América y Europa es demasiado baja para justificar screenings masivos de esta sustancia para la detección del cáncer hepático, pero en cambio esta técnica se ha mostrado útil en China donde en un estudio realizado sobre 500,000 individuos se han descubierto varios nuevos casos de carcinom primitivo de hígado, algunos de ellos aún en fase operable (EGAN y cols., 1977). En Estados Unidos se estudian sus posibles aplicaciones en el diagnóstico diferencial y monitorización de tumores testiculares, coriocarcinoma y posiblemente también carcinoma gástrico, (HERBERMAN, 1976).

La detección de calcitonina por radioinmunoanálisis ha mostrado ser útil en el diagnóstico precoz del carcinoma medular de tiroides. Dado que esta enfermedad es de tipo familiar ha sido posible el screening

de familias en las que se han descubierto por este método neoplasias que no habían dado aún ninguna otra manifestación clínica ni de laboratorio (TASHJIAN y cols., 1974). Se considera como el test más sensible y específico para el carcinoma medular de tiroides, si bien pueden detectarse también elevaciones de la calcitonina en diferentes tipos de cáncer como el carcinoma bronquial y mamario (COOMBES y cols., 1974).

La gonadotropina coriónica (β HCG) es especialmente útil y sensible para la detección del coriocarcinoma y su determinación por radioinmunoanálisis es de un inestimable valor en el control y seguimiento de este tumor y de las pacientes en las que se extirpó una mola hidatiforme (BAGSHAWE, 1974).

La HCG puede señalar también la presencia de teratomas que desarrollan una diferenciación trofoblástica (BRAUNSTEN y cols. 1973) y de carcinomas bronquiales (VAITUKAITIS y cols., 1972).

En la Tabla IV se citan otras sustancias cuya posible aplicación clínica y limitaciones en el inmunodiagnóstico del cáncer están todavía por aclarar. Aunque se incluyen en la lista los antígenos viro-asociados, estos no se han buscado aún de forma sistemática en el

suero de los pacientes con cáncer.

Podemos concluir que ninguno de estos "marker" de los que disponemos actualmente es tumor-específico, hecho que tiende a limitar su aplicabilidad diagnóstica. Su principal utilidad parece estar en el seguimiento de los casos tras el diagnóstico y tratamiento inicial; las elevaciones en los líquidos corporales puede preceder a la recidiva clínica o a la metástasis y sustancias como la HCG o la AFP que guardan relación con la masa tumoral, pueden ser de considerable valor a la hora de calibrar los efectos del tratamiento y de decidir cuando éste debe ser interrumpido o reiniciado.

4.2.- Tests de inmunocompetencia en el inmunodiagnóstico y pronóstico del paciente canceroso.

Los diferentes tipos de pruebas útiles para evidenciar la disminución de la capacidad inmunitaria en el paciente canceroso se exponen en la tabla V.

Teniendo en cuenta la teoría de la inmunosurveillance cabría esperar un descenso de la capacidad inmunológica previamente a la manifestación clínica del cáncer o en estadios de enfermedad precoz localizada. Por otra parte, si la presencia de una neoplasia produce un déficit inmunológico ello podría ser útil en vistas al pronóstico y monitorización del enfermo. En la mayoría de estudios realizados hasta la fecha la disminución del status inmunitario se ha observado principalmente en los pacientes con cánceres avanzados.

Los tests cutáneos mediante inyección intradérmica de un antígeno desencadenante de reacciones de hipersensibilidad retardada ha sido uno de los métodos más profusamente utilizados. En 1902 Dorothy REED inyectaba tuberculina por vía intradérmica para estudiar una posible relación entre la enfermedad de Hodgkin y la tuberculosis. Su hallazgo de que los pacientes con enfermedad de Hodgkin en fases avanzadas presentaran reac-

Tabla V.- Pruebas para el estudio de la inmunocompetencia en paciente canceroso.

- 1.- Pruebas de hipersensibilidad cutánea retardada
 - a) frente a antígenos de recuerdo (sensibilización natural previa)
 - b) sensibilización primaria (ej. dinotroclorobenceno, dinitrofluorobenceno, hemocianina)
- 2.- Recuento de linfocitos circulantes
 - a) totales
 - b) células B (anticuerpos inmunofluorescentes y citotóxicos)
 - c) células T (técnica de rosetas)
- 3.- Funciones del linfocito
 - a) respuesta proliferativa a mitógenos (PHA)
 - b) citotoxicidad
 - c) producción de linfokinas
- 4.- Producción de anticuerpos
- 5.- Funciones del macrófago

cciones negativas a la tuberculina, constituye uno de los primeros estudios clínicos acerca de la paresia inmunológica que se asocia a las neoplasias. Desde entonces diversos tipos de sustancias antigénicas capaces de producir reacciones de hipersensibilidad cutánea retardada, han sido utilizadas para estudiar la función inmunitaria en los pacientes cancerosos. Dichos antígenos derivan principalmente de preparaciones bacterianas, víricas o fúngicas y se emplean como "antígenos de recuerdo", es decir, bajo la presunción de que el individuo ha tenido ya algún contacto previo con los mismos de forma natural. Estos tests tienen la ventaja de su gran simplicidad: basta con inyectar intradérmicamente una pequeña cantidad de antígeno contenido en un escaso volumen de líquido (en general no superior a 0,1 ml) y "leer" (eritema, induración, vesiculación) el resultado a las 48-72 h. La mayoría de autores eligen una batería de antígenos a concentración constante y obtienen sus resultados comparando las reacciones obtenidas en el grupo de enfermos neoplásicos con los de un grupo control adecuado formado por enfermos hospitalarios no cancerosos. El Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) -una organización multicéntrica para el estudio del cáncer con instituciones participantes en Norteamérica, Europa y Africa- utiliza las cuatro preparaciones siguientes

para la valoración inmunológica del paciente canceroso: derivado proteico purificado a la tuberculina (PPD, Parke Davis), extracto de *Candida albicans* al 1/100 (Dermatophytin O, Hollister-Stier Laboratories), antígeno de la parotiditis (Lilly) y estreptoquinasa - estreptodornasa (varidasa). Las pruebas se repiten aproximadamente cada 2-3 meses durante el período de estudio y tratamiento. Se considera a un paciente totalmente anérgico únicamente si no existe reacción frente a ninguno de estos antígenos. Las baterías de antígenos utilizadas por los diferentes autores varían poco de la citada.

Estos tests son útiles para demostrar la existencia de una anergia cutánea en pacientes con linfomas, leucemias y con tumores sólidos. Sin embargo los resultados no han sido muy útiles desde el punto de vista diagnóstico dado que la mayoría de pacientes, excepto aquellos con enfermedad ampliamente diseminada, reaccionan frente a alguno de estos antígenos (LAMB y cols., 1962; MILLER, 1968; SOLOWEY y RAPAPORT, 1965).

Por el contrario en diferentes tipos de tumores sólidos existe una buena correlación entre la inmunidad celular valorada a través de las reacciones de hipersensibilidad cutánea retardada y el pronóstico de la enfermedad (EILBER y MORTON, 1970; LEE y cols., 1970). Y es

que el estudio de estas reacciones de hipersensibilidad constituye actualmente uno de los mejores métodos de monitorizar in vivo la inmunidad celular ya que la aparición de una respuesta frente al antígeno depende de la memoria de un linfocito activado previamente de forma específica presente en el lugar de la reacción y si bien teóricamente una anergia puede ser debida simplemente a una falta de exposición previa a los antígenos utilizados más que a una depresión de la inmunidad celular, resulta estadísticamente muy poco probable que un individuo no haya contactado previamente al menos frente a uno de los antígenos de la batería utilizada. En realidad alrededor del 95% de individuos normales presentan una reacción positiva a uno de aquellos como mínimo.

De todas maneras la mayoría de autores están de acuerdo en completar el estudio de la hipersensibilidad cutánea retardada mediante la sensibilización a antígenos a los cuales el sujeto no ha estado previamente expuesto al menos con gran probabilidad. Sustancias como el 1-nitro, 2-4-difluorobenceno (DNFB) o el 1-nitro, 2,4-diclorobenceno (DNCB) inducen la aparición de una dermatitis alérgica de contacto y la sensibilización con dichos componentes ofrece una serie de ventajas: 1º no es necesaria una exposición previa al alergeno, 2º tanto la

sensibilización como el segundo contacto pueden ser controlados, 3º el 90-95% de personas normales se sensibilizan frente a estos agentes con un sólo contacto, y 4º con la sensibilización por contacto no se forman anticuerpos circulantes, lo que teóricamente hace más específica a esta prueba para el estudio de la inmunidad celular. La combinación de la batería de antígenos standar y el DNFB o DNCB, ha demostrado ser un buen método pronóstico en las neoplasias en general (EILBER y MORTON, 1970; PINSKY y cols.,1971; WELLS y cols.,1973a) y también en el cáncer genital femenino (NALICK y cols.,1974; KHOO y MACKAY,1974) y mamario (CUNNINGHAM y cols.,1976). Los pacientes con reacciones positivas responden mejor al tratamiento.

También se ha comprobado una disminución de la inmunidad celular mediada en los pacientes cancerosos mediante pruebas in vitro. La respuesta proliferativa (transformación blástica) de los linfocitos frente a mitógenos ha sido profusamente utilizada, pero una clara depresión de dicha respuesta se limita en gran parte a pacientes con neoplasias avanzadas o inoperables (HERSH y OPPENHEIM,1965; WHITTAKER y cols.; BROOKS y cols.,1972; HAN y TAKITA,1972). La aplicabilidad específica de este test para el pronóstico y monitorización de las neoplasias no está claramente deteru

minada. De todas maneras el test de transformación blástica del linfocito (TTL) por la fitohemaglutinina (PHA) constituye la prueba in vitro más empleada para medir la hipersensibilidad celular. Fue en 1959 cuando se descubrió que la fitohemaglutinina, un extracto vegetal de *Phaseolus vulgaris*, estimula a los linfocitos T en cultivo de modo que experimentan una transformación morfológica a células blásticas semejantes a las que aparecen en los ganglios linfáticos tras la estimulación antigénica in vivo.

La proliferación de células sensibles tras el contacto con el antígeno específico y su cambio de morfología apareciendo grandes células blásticas con un núcleo más pálido y un citoplasma basófilo permite valorar la hipersensibilidad celular comprobando el grado de estimulación que se aprecia bien por el porcentaje de blastos que encontremos en el cultivo, o bien por la incorporación de timidina marcada en el DNA que se haya sintetizado en la prueba. Se pueden inducir cambios parecidos en linfocitos mediante tratamiento con determinados mitógenos vegetales, de los cuales el más conocido es la fitohemaglutinina y también la concanavalina A (con A). Producen la misma serie de fenómenos celulares que el antígeno origina al interaccionar con sus receptores de superficie específicos. La PHA transforma la mayoría de células T.

Otras funciones de los linfocitos como la citotoxicidad puede estar también deprimida en los pacientes cancerosos, incluyendo casos de enfermedad localizada (Mc COY y cols., 1973; ROSENBERG y cols., 1974; TAKASUGI y KINOSHITA, 1974). El grado de citólisis producida por las células citotóxicas se mide cuantificando la cantidad de cromio radioactivo liberado por las células "diana", previamente marcadas, al sobrenadante.

Los linfocitos estimulados por mitógenos específicos liberan una serie de sustancias humorales la mayoría de las cuales pueden estar implicadas en las reacciones de hipersensibilidad retardada. A estas sustancias se las conoce globalmente con el nombre de linfokinas. Una de las linfokinas más interesantes desde el punto de vista clínico es el Factor de Inhibición de la Migración (MIF), sustancia capaz de inhibir la migración de los macrófagos y otros tipos celulares desde los capilares. El valor de este test en inmunología clínica no está claro aún y en general no existe correlación entre el mismo y la transformación blástica in vitro y las reacciones de hipersensibilidad retardada in vivo.

El recuento de células B y T y de linfoci-

tos totales son útiles también en el estudio inmunitario del paciente canceroso. Basándose en un estudio sobre 589 pacientes (370 con cáncer de cérvix uterino, 79 de mama y 140 de tipos diversos) RIESCO (1970) señalaba una significativa y positiva correlación entre la curabilidad del cáncer a los 5 años y el número de total de linfocitos periféricos. En un estudio retrospectivo de 305 pacientes con cáncer de mama, PAPATESTAS y KARK (1974,1976) hallaron que los niveles de linfocitos previos al tratamiento constituyen un índice de la inmunocompetencia del huésped, hallándose una correlación inversa entre el estadio de la enfermedad y el recuento linfocitario. Las pacientes que permanecían libres de metástasis postmastectomía, presentaban cifras iniciales de linfocitos significativamente superiores a las de enfermas que desarrollaban metástasis y/o recidivas. Y dentro de cada estadio, las pacientes con linfocitos superiores a $2.000/mm^3$ tenían un mejor índice de supervivencia que aquellas cuyos recuentos eran inferiores. LEE y cols. (1975) buscan una relación entre la hipersensibilidad cutánea retardada y el número total de linfocitos estudiando 183 pacientes con cánceres diversos, y hallan que los pacientes con reacciones positivas al DNCB o algunos de los antígenos de recuerdo, no suelen presentar linfocitopenia ($< 1.000/mm^3$) y que la progresión de la enfermedad es mucho más rápida en

los individuos anérgicos al DNCB y con linfocitopenia. Concluyen los autores que si bien el valor pronóstico de cada test considerado individualmente es limitado, la capacidad predictiva aumenta cuando se utilizan varias pruebas conjuntamente. En un estudio reciente LEE y cols. (1977) confirman el valor pronóstico del recuento total de linfocitos y señalan que la utilidad de la determinación de células B y T no está todavía bien definida. En general está comprobado que la mayoría de enfermos neoplásicos incluyendo los casos de cáncer localizado, presentan una disminución en el porcentaje de células capaces de formar rosetas; tras el tratamiento, cuando no existe evidencia de enfermedad puede recuperarse la normalidad (HERBERMAN, 1976).

La producción de anticuerpos humorales ha constituido un motivo de estudio menos frecuente que la inmunidad celular. Ello se explica por diversas razones: en primer lugar porque si bien es necesaria una cooperación entre los dos brazos eferentes de la respuesta inmunitaria, se ha aceptado que la inmunidad celular constituye el mecanismo primario en la inmunosurveillance y destrucción de las neoplasias. En segundo lugar porque es difícil disponer de antígenos primarios adecuados para el estudio de la producción de anticuerpos dado que una vez el individuo llega a

la edad adulta ha sufrido una amplia exposición inmunológica y además el problema de las reacciones cruzadas complica las determinaciones de anticuerpos humorales. Y por último, porque se ha comprobado que el canceroso mantiene casi siempre su capacidad de producción de anticuerpos séricos (SOUTHAM y MOORE, 1954; AIZAWA y SOUTHAM, 1960). Técnicas más refinadas de estudio de las funciones del linfocito B puede modificar este punto de vista actual, pero hasta el momento parece ser que la capacidad humoral inmune permanece relativamente bien preservada hasta estadios avanzados de la enfermedad, mientras que por el contrario, la inmunidad celular se altera en fases más precoces y de una manera más profunda.

Podemos resumir diciendo que ninguna de estas pruebas para el estudio inmunitario es de gran valor para un inmunodiagnóstico precoz del cáncer y que los diferentes métodos in vitro de estudio de la inmunidad celular en el hombre están en continuo desarrollo y serán superadas por otras técnicas mejores sin duda alguna. Con vistas al diagnóstico inmunológico serían necesarios estudios prospectivos incluyendo enfermos sintomáticos y personas con elevado riesgo de padecer cáncer. Sin embargo existen dificultades de aspecto técnico como la serie de variables que pueden alterar

los resultados; incluso en individuos normales tienden a producirse variaciones día a día. Para que estos tests tuvieran aplicación clínica a gran escala sería necesaria su perfecta estandarización y reducir su variabilidad. Hoy por hoy por tanto, su principal utilidad está en relación al pronóstico de las neoplasias a pesar de las limitaciones que sabemos existen, paliadas en parte cuando se utilizan varias de estas pruebas conjuntamente.

4.3.- Respuesta inmunitaria frente a antígenos tumor-asociados.

Además de los estudios sobre la capacidad de reacción inmunológica general, algunos investigadores han evaluado la respuesta inmunitaria frente a antígenos tumor-asociados. Las diferentes técnicas utilizadas para este fin se exponen en la Tabla VI. A pesar de la inmunosupresión existente en los pacientes cancerosos, algunos pacientes pueden manifestar una respuesta inmune a los antígenos tumor-asociados.

Los tests de hipersensibilidad cutánea retardada mediante extractos tumorales se han llevado a cabo de manera similar a los antígenos de recuerdo (HERBERMAN, 1974). Se han observado reacciones frente a antígenos comunes para diferentes tumores del mismo tipo histológico en casos de leucemia (CHAR y cols., 1973), carcinoma intestinal (HOLLINSHEAD y cols., 1970), cáncer de mama (HOLLINSHEAD y cols., 1974a), melanoma maligno (HOLLINSHEAD y cols., 1974b) y algunos otros. Sin embargo los resultados son difíciles de valorar, la estandarización de los extractos tumorales dificultosa, las reacciones cutáneas de sencadenadas constituyen con frecuencia una mezcla de hiperu

Tabla VI.- Pruebas para el estudio de la respuesta inmune frente a antígenos tumor-asociados.

1.- Inmunidad celular mediada

- a) test de hipersensibilidad cutánea retardada con extractos celulares tumorales
- b) citotoxicidad frente a células tumorales en cultivo
- c) inhibición de la migración leucocitaria por los an antígenos tumorales
- d) respuesta proliferativa a antígenos tumorales
- e) test de movilidad electroforética del macrófago
- f) inhibición de la adherencia leucocitaria

2.- Factores humorales

- a) anticuerpos frente a antígenos tumorales (inmuno fluorescencia, citotoxicidad, etc.)
- b) factores bloqueantes de los tests de inmunidad ce lular-mediada.

sensibilidad inmediata y retardada, y además no se dispone de los controles adecuados dado que no es aceptable la inoculación de extractos neoplásicos a individuos sanos. Por otra parte los resultados obtenidos con frecuencia son discordantes con los de otras pruebas in vitro de estudio de la inmunidad celular. Con fines diagnósticos se ha utilizado este tipo de pruebas en el caso del melanoma ocular (CHAR y cols.,1974) y se sugiere la posible aplicación en este sentido de los extractos de intestino o hígado fetal para la detección del cáncer de colon en familias con poliposis (dada la existencia de antígenos carcinoembrionarios en esta neoplasia).

Los tests de citotoxicidad celular mediada podrían ser también teóricamente útiles en el inmunodiagnóstico. Ya hemos citado anteriormente que los estudios de HELLSTROM y HELLSTROM, (1971a) demuestran que los linfocitos de los pacientes con diferentes tipos de cáncer pueden inhibir la formación de colonias o ser citotóxicos frente a células tumorales en cultivo de un origen histológico común. Si sólo presentaran esta capacidad los individuos que desarrollan un cáncer, dispondríamos de un sensible método de detección del mismo. Sin embargo existen dos problemas: los linfocitos de personas normales pueden presen

tar esta propiedad, y en segundo lugar se ha comprobado que los linfocitos de un paciente canceroso pueden ser citotóxicos para células tumorales de un tipo diferente al del enfermo. Por lo tanto ésta técnica carece actualmente de aplicación clínica. Algo parecido ocurre con la detección de factores humorales "bloqueantes" o "desbloqueantes" de la acción citotóxica celular.

El test de inhibición de la migración leucocitaria se ha comprobado en casos de cáncer de mama (Mc COY y cols.,1974),melanoma maligno (Mc COY y cols., 1975),cáncer de colon (BULL y cols.,1973),linfoma y leucemia (BRAUN y cols.,1972), pero esta prueba es difícil de realizar.

Las técnicas de inhibición de la adherencia leucocitaria (MALUISH y HALLIDAY,1974) y de movilidad electroforética de los macrófagos (CASPARY y FIELD,1971) necesitan de una mayor investigación y control en pacientes con procesos benignos antes de poder ser aplicados.

El test de transformación linfocítica frente a antígenos tumorales solubles (MAVLIGIT y cols.,1973) presenta el inconveniente de que se comprueba también la

respuesta proliferativa en caso de linfocitos de dadores alogénicos normales (DEAN y cols.,1975) por lo que su aplicabilidad es dudosa.

La detección de anticuerpos frente a antígenos tumor-asociados constituye teóricamente un procedimiento inmunodiagnóstico sencillo y sensible. Pero desgraciadamente han habido relativamente pocos avances en este terreno ya que si bien se han detectado anticuerpos frente a antígenos comunes en algunos tipos de tumores como por ejemplo el melanoma y osteosarcoma (MORTON y cols., 1970b), un considerable número de dadores normales dan también reacciones positivas por lo que no queda clara la especificidad de los antígenos detectados. MORTON y cols., hallan buena correlación entre el título de anticuerpos y la evolución clínica; las determinaciones seriadas son útiles para la monitorización del tratamiento y poseen valor pronóstico.

En general podemos decir que la aplicación de estas técnicas en el inmunodiagnóstico se ha visto dificultada por la complejidad de los antígenos asociados a las células tumorales, así como de la respuesta inmunitaria en sí misma. Un problema común a todas estas prue-

bas lo constituye la falta de estandarización y de antígenos y células diana adecuados. Por todo ello se han llevado a cabo pocos ensayos en los diferentes tipos tumorales. Los esfuerzos dirigidos a la crioconservación de gran número de células tumorales y a la caracterización de líneas tisulares en cultivo derivadas de los tumores, pueden constituir una ayuda en la resolución de este problema.

MATERIAL Y METODOS

1.- ESQUEMA DE TRABAJO.

Se ha llevado a cabo un estudio inmunitario en 145 pacientes con cáncer ginecológico histológicamente comprobado en los dos aspectos en que la inmunología puede mostrarse útil para el estudio del enfermo canceroso, es decir, realizando por un lado una valoración del status inmunológico de cada paciente y determinando por otra parte la existencia o no de "markers" o antígenos tumor-asociados en el plasma.

La valoración de la función inmunitaria consta de los siguientes apartados:

A) Estudio de la inmunidad humoral

1.- Determinación de inmunoglobulinas cuantitativas (IgG, IgA, IgM).

2.- Determinación de linfocitos B.

B) Estudio de la inmunidad celular

1.- Pruebas de hipersensibilidad cutánea retardada, que incluyen:

a) Intradermoreacciones a la candidina, vacuna antibacteriana mixta, varidasa (estreptoquinasa-estrep

todornasa), PPD y tuberculina.

b) Sensibilización por contacto a alergenos primarios como el 1-nitro,2,4-difluorobenceno (DNFB) y 1-nitro,2,4-dichlorobenceno (DNCB).

2.-Test de transformación linfoblástica (TTL) con fitohemaglutinina (PHA).

3.-Determinación de linfocitos T.

Toda esta batería de pruebas se realizaron previamente al inicio de la terapéutica y posteriormente se repitieron cada 3-4 meses coincidiendo con los controles clínicos a que son sometidas las pacientes.

La detección de "biological markers" se ha basado en el estudio del antígeno carcinoembriónico (CEA), beta-subunidad de la hormona gonadotropo-coriónica (β HCG) y lactógeno placentario humano (HPL).

Las determinaciones de CEA se llevaron a cabo según el siguiente esquema: en las pacientes que no habían realizado ningún tipo de terapéutica se practicaron antes de iniciar el tratamiento, a la semana, a las dos y a las seis semanas de finalizar el mismo y posteriormente a intervalos de 1-2 meses. Para las enfermas que ya estaban

en curso de tratamiento los controles de antígeno carcinoembriónico se realizaron cada 1-2 meses también.

En el caso de la β -HCG y HPL únicamente se practicaron determinaciones antes del tratamiento quirúrgico o radioterápico ya que ambas hormonas no se han mostrado útiles para la "monitorización" de la terapéutica en las neoplasias ginecológicas (SAMAAN y cols., 1976) a excepción de la HCG para el coriocarcinoma, y su interés estriba en que pueden constituir una manifestación de la "desdiferenciación" o "derepresión" que experimenta la célula cancerosa y que hace posible la producción ectópica de estas hormonas placentarias.

Por último y dado el importante papel que desempeña el linfocito dentro del sistema inmunitario del individuo se ha comprobado si la cifra total de linfocitos circulantes previa al tratamiento y la infiltración linfocitaria de los tejidos tumorales constituyen o no datos de significación pronóstica.

2.- PACIENTES ESTUDIADAS

Dado que al comenzar el presente estudio hace algo más de tres años no se disponía aún de todas las técnicas necesarias para llevar a cabo las pruebas citadas anteriormente en su totalidad, ello es la razón por la que el grupo de enfermas en que se investigó la presencia de hormonas placentarias en el suero no coincide con el de las pacientes en que se realizó la inmunovaloración.

A su vez el hecho de que no dispusiéramos de la técnica de determinación del CEA hasta varios meses después de iniciado ya el programa de trabajo, explica el porqué no todas las pacientes tienen determinado este antígeno en plasma antes de iniciar cualquier tipo de terapéutica. Ello sólo fue posible en las enfermas que eran diagnosticadas e incluídas en el estudio posteriormente a la puesta en marcha de dicha técnica.

De 102 pacientes que constituían inicialmente el grupo de estudio, sólo se han incluído 88 para la investigación de la inmunidad humoral y celular, suprimiéndose aquellos casos en que no pudo realizarse una correcta valoración de las pruebas o aquellas enfermas que habían sido sometidas a un tratamiento antineoplásico demasiado

recientemente.

En relación a este último hecho EILBER y MORTON y cols. (1975) pioneros en el estudio del papel de la inmunidad en el proceso canceroso, señalan un mínimo de seis semanas tras la cirugía, radio o quimioterapia para poder incluir un paciente en sus estudios. NALICK, DiSAIA y cols. (1974), autores de los que más se han ocupado del estudio inmunitario en el cáncer ginecológico, fijan este intervalo en tres meses. Por otra parte no debe olvidarse que en ocasiones se observa un efecto de rebote con mejoría de la función inmunitaria tras tratamientos antineoplásicos (CHEEMA y HERSH, 1971; HARRIS y cols., 1976).

Nosotros hemos llevado a cabo el estudio de la inmunidad humoral e inmediata por primera vez en cada paciente previamente al comienzo de la terapéutica en 72 casos. En las 16 enfermas restantes, el tiempo transcurrido desde que finalizó el tratamiento previo osciló entre 5 meses y 11 años (media 2,3 años). Por otra parte, en las pacientes sometidas periódicamente a tratamiento con citostáticos se efectuaron las pruebas siempre inmediatamente antes de cada tanda quimioterápica, esto es, lo más alejadas posible de la tanda anterior.

El estudio del antígeno carcinoembrionario

se ha efectuado también en estas 88 pacientes, todas ellas con neoplasias histológicamente comprobadas y cuya distribución es la siguiente (ver Tabla VII):

- 32 casos de carcinoma de cuello uterino, 8 de ellos preinvasivos, 6 en estadio I, 4 en estadio II, 7 en estadio III y 7 en estadio IV.

El cáncer preinvasivo se refiere a aquellas lesiones limitadas al epitelio escamoso con integridad de la membrana basal y sin invasión de la estroma. Incluimos aquí displasias severas y carcinomas in situ del cérvix.

El estadio I comprende aquellos casos en que existe ya invasión pero el carcinoma está estrictamente limitado al cérvix.

El estadio II incluye los carcinomas que se extienden fuera del cérvix, pero no llegan a la pared pelviana, y los que afectan la vagina sin llegar al tercio inferior.

En el estadio III se incluyen las neoplasias cervicales extendidas hasta la pared pélvica, hasta el tercio inferior de la vagina, o aquellos en que existe hidronefrosis o anulación funcional del riñón.

El estadio IV comprende los casos en que el carcinoma se ha extendido fuera de la pelvis o afecta la mucosa del recto o de la vejiga.

Tabla VII.- Distribución de las neoplasias estudiadas.
 (valoración inmunológica y CEA).

<u>Organo</u>	<u>Estadío</u>	<u>Nº casos</u>	<u>Total</u>
Cérvix	Preinvasivo	8	
	I	6	
	II	4	
	III	7	
	IV	7	32
Endometrio	I	10	
	II	2	
	III	3	
	IV	8	23
Ovario	I	2	
	II	2	
	III	2	
	IV	3	9
Vulva	I	4	4
Vagina	I	1	1
Trompa	Recidiva	1	1
Mama	I	4	
	II	5	
	III	4	
	IV	5	18
Total pacientes			<u>88</u>

- 23 casos de cáncer de endometrio, 10 en estadio I, 2 en estadio II, 3 en estadio III, y 8 en estadio IV.

El estadio I comprende los casos en que el carcinoma está limitado al cuerpo del útero.

En el estadio II existe propagación al cérvix.

El estadio III incluye los casos en que la neoplasia se extiende fuera del útero sin salir de la pelvis.

En el estadio IV existen metástasis a distancia o extensión a la vejiga o al recto.

- 9 casos de cáncer de ovario, de ellos 2 en estadio I, 2 en estadio II, 2 en estadio III y 3 en estadio IV.

En el estadio I el tumor está limitado en el ovario.

En el estadio II el tumor afecta a uno o a los dos ovarios extendiéndose a la pelvis.

El estadio III incluye los casos en que hay afectación de uno o ambos ovarios con metástasis intraperitoneales en el abdomen (epiplon, intestino delgado y mesenterio).

En el estadio IV el tumor afecta a uno o ambos ovarios y existen metástasis distantes fuera de la cavidad peritoneal.

- 4 carcinomas de vulva en estadio I, que comprenden de los casos en que existe un tumor confinado a la vulva de 2 cm ó menos de diámetro (T_1) sin que se palpen ganglios inguinales (N_0) o si se palpan no son sospechosos de neoplasia (N_1); no hay metástasis a distancia ($T_1N_0M_0$, $T_1N_1M_0$).

- 1 carcinoma vaginal en estadio I (confinado a la pared vaginal, sin invasión de los tejidos subyacentes).

- 1 carcinoma de trompa (estadio I: limitado a la capa muscular, sin invasión de la serosa).recidivado.

Estos estadios corresponden a la clasificación recomendada por el Comité del Cáncer de la FIGO (Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia). Para el estudio inmunitario nosotros hemos incluido las recidivas neoplásicas dentro del estadio IV en cada grupo.

- 18 casos de cáncer de mama, 4 de ellos en estadio I, 5 en estadio II, 4 en estadio III y 5 en estadio IV.

La clasificación en estadios del cáncer de mama se basa en el sistema TNM aceptado por la UICC (Unión Internacional Contra el Cáncer) y la AJC (American Joint - Committee for Cancer Staging and End Results Reporting).

El estadio I incluye los casos $T_{1a}N_0M_0$, $T_{1a}N_{1a}M_0$, $T_{1b}N_0M_0$. (T_1 : tumor menor de 2 cm en su diámetro mayor sin fijación a planos subyacentes -a- o con ella -b-), (N_0 : no hay ganglios axilares homolaterales palpables, o si los hay no se considera que contengan neoplasia - N_{1a} -), (M_0 : ausencia de metástasis a distancia).

El estadio II comprende los casos $T_{1a}N_{1b}M_0$, $T_{1b}N_{1b}M_0$, $T_{2a}N_0M_0$, $T_{2a}N_{1a}M_0$, $T_{2a}N_{1b}M_0$, $T_{2b}N_0M_0$, $T_{2b}N_{1b}M_0$. (N_{1b} : ganglios que se considera que contienen neoplasia), (T_2 : tumor mayor de 2 cm pero menor de 5 en su diámetro mayor con -b- o sin -a- fijación a planos subyacentes).

El estadio III incluye los casos $T_{2a}N_2M_0$, $T_{2a}N_3M_0$, $T_{3a}N_0M_0$, $T_{3a}N_{1b}M_0$, $T_{3a}N_3M_0$, $T_{3b}N_0M_0$, $T_{3b}N_{1b}M_0$, $T_{4a}N_{1b}M_0$, $T_{4b}N_2M_0$, $T_{4b}N_3M_0$. (T_3 : Tumor mayor de 5 cm en su diámetro mayor con -a- o sin -b- fijación a planos subyacentes; T_4 : tumor de cualquier tamaño con fijación a la pared torácica -a- o con edema, ulceración de la piel o nódulos cutáneos satélites en la misma mama -b-), (N_2 : ganglios axilares homolaterales que se consideran neoplásicos y fijos entre ellos o con otras estructuras; N_3 : ganglios supraclaviculares o infraclaviculares homolaterales que se considera que contienen neoplasia o bien edema del brazo).

El estadio IV incluye cualquier caso con metástasis a distancia. Nosotros hemos incluido aquí también las recidivas para el presente estudio.

La edad de las 88 pacientes estudiadas oscila entre 21 años para la más joven y 80 para la más vieja (media de 54 años).

Como grupo control se utilizaron 50 mujeres con patología ginecológica benigna (prolapso genital, mioma uterino, etc.) y cuya edad promedio es similar a la del grupo de cancerosas (49 años, oscilando entre 33 y 72 años). En ambos grupos de pacientes se efectuaron las mismas pruebas.

En las enfermas neoplásicas se efectuó un seguimiento que osciló entre 18 y 36 meses, durante cuyo período de tiempo se llevaron a cabo las pruebas según se ha señalado en el esquema de trabajo. En los casos de exitus de la paciente sólo se han incluido aquellos casos en los que se practicó el estudio completo como mínimo en dos ocasiones.

Para el estudio de los "markers" tumorales se practicaron determinaciones antes de llevar a cabo medida terapéutica alguna en 57 pacientes entre las que se incluyen 16 cánceres de mama, 17 adenocarcinomas de endometrio

16 carcinomas de cuello uterino, 4 neoplasias ováricas y 4 de vulva (ver Tabla VIII).

Tabla VIII.- Distribución de las neoplasias estudiadas
(detección de HCG y HPL).

<u>Organo</u>	<u>Estadío</u>	<u>Nº casos</u>	<u>Total</u>
Endometrio	I	6	17
	II	6	
	III	1	
	IV	4	
Cérvix	Preinvasivo	1	16
	I	3	
	II	4	
	III	4	
	IV	4	
Ovario	I	1	4
	II	1	
	IV	2	
Vulva	I	3	4
	II	1	
Mama	I	4	16
	II	8	
	III	2	
	IV	2	
Total pacientes			<u>57</u>

3.- EVALUACION INMUNITARIA

Se ha llevado a cabo como ya se citó anteriormente, una valoración de ambos tipos de inmunidad -celular y humoral- mediante la siguiente batería de pruebas::

3.1.- Determinación de inmunoglobulinas cuantitativas (IgG, IgA, IgM).

Se ha practicado por inmunodifusión radial según técnica de MANCINI y cols. (1965) que se realiza en placas de agar con antisuero incorporado (Immunoplates Hyland).

3.2.- Determinación de linfocitos B.

Para ello nos hemos basado en una técnica descrita por PREUD^eHOMME y FLANDRIN (1974) que permite obtener una diferenciación de los linfocitos B frente a los monocitos e histiocitos con un mínimo de error, gracias a la capacidad de los histiocitos, monocitos y polinucleares para producir peroxidasa y la incapacidad de los linfocitos para producir estas enzimas. Con una técnica combinada de inmunofluorescencia y tinción de peroxidasa se logra separar cada uno de estos elementos.

El procedimiento llevado a la práctica en

este Hospital Clínico por ESTRACH y cols. (1975) consta de los siguientes apartados:

1º Inmunofluorescencia: se realiza una in-munofluorescencia indirecta empleando antisueros de conejo anti-inmunoglobulinas humanas marcadas con fluoresceína (Pasteur). A partir del conjugado comercial se practican diluciones al 1/10, 1/20 y 1/50 en solución isotónica de fosfatos a pH 7,4.

2º Tinción de peroxidasas: para ello se usa un reactivo a base de 0,25g de bencidina, 0,5 g de nitro - prusiato sódico en 100 g de alcohol etílico de 96º.

3º Preparación de la sangre del enfermo: con una jeringuilla estéril se extraen 20 cc de sangre que se hepariniza. Mediante centrifugación diferencial con gra-diente Ficoll-Pielograf se separan los linfocitos.

4º Preparación de la suspensión: Se prepara una suspensión de las células con el conjugado ya preparado que se deja en incubación durante 30 min. a 4º C. Se la-van tres veces con solución tamponada de Hanks. Seguidamente se practica una extensión sobre portaobjetos que se deja secar durante unos minutos, al cabo de los cuales se cubre la preparación con el reactivo de las peroxidasas. A los tres minutos se cubren las preparaciones con una mezcla vo-lumen a volumen de reactivo de peroxidasa y agua oxigenada

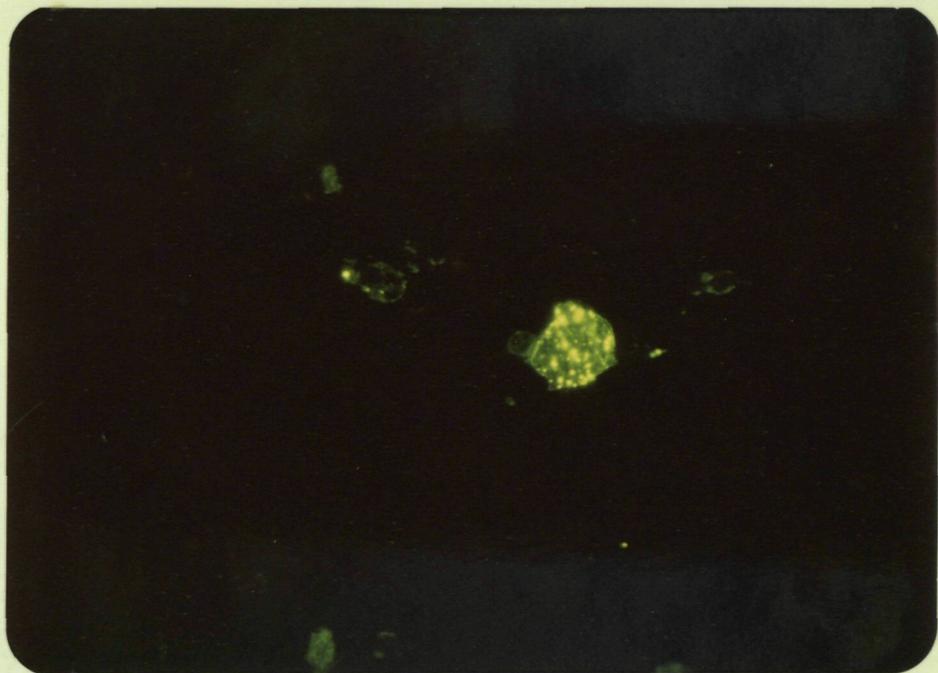


Fig. 1.- Monocito visto por inmunofluorescencia y marcado con conjugado antiglobulinas humanas.

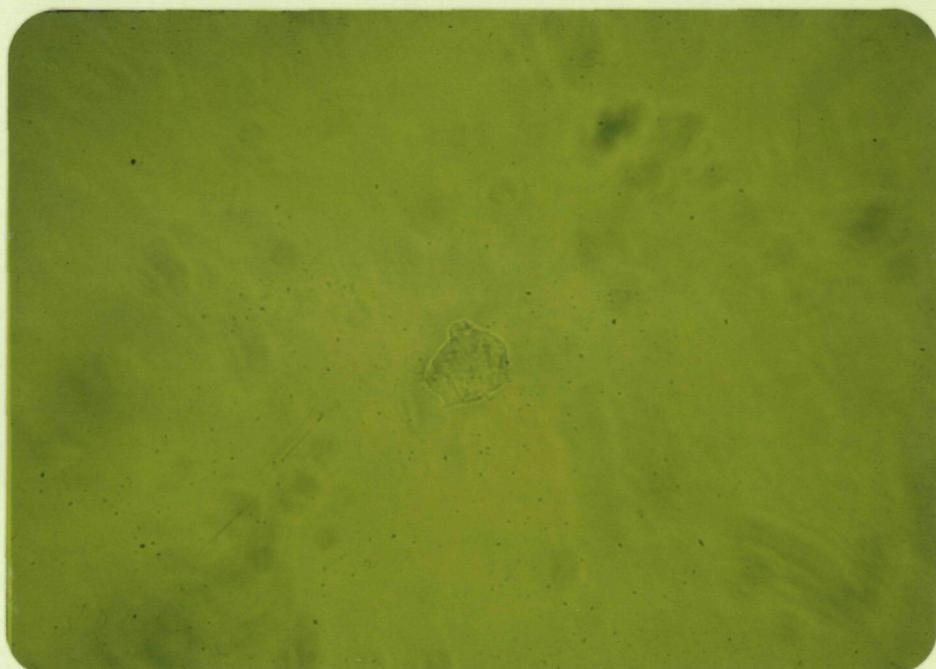


Fig. 2.- La misma célula de la Fig. anterior teñida con peroxidasa y vista con luz no u.v.

al 1/100. A los tres minutos se lava la preparación con una solución tamponada montándose con Fa Mounting Fluid (Difco), observándose seguidamente cada campo microscópico con luz visible y luz ultravioleta.

La interpretación de los resultados se realiza mediante examen con luz ultravioleta. Las células que presentan inmunoglobulinas de superficie se pueden observar con un contorno fluorescente o a veces dan imágenes puntiformes situadas en la periferia de las células. Todas las células que presentan fluorescencia periférica y reacción peroxidasa positiva se descartan para el recuento. Debe efectuarse un recuento de todas las células observadas en cada campo microscópico, sean fluorescentes o no, para permitir establecer un porcentaje. (Figs. 1 y 2).

3.3.- Intradermoreacciones con antígenos "de recuerdo".

Se han practicado intradermoreacciones a los siguientes antígenos:

a) candidina: extracto de candida albicans al 1/100 (Laboratorios Leti).

b) vacuna antibacteriana mixta: vacuna poli-microbiana conteniendo Streptococcus pyogenes, sanguis, anginosus, 37,50 % ; Staphylococcus pyogenes, var. aureus, -

epidermidis y aurianticus, 12,50%; Streptococcus grupo D, 6,25%; N.Catarrhalis, 10%; Klebsiellae, 6,25%; Hemophilus influenzae, 10%; E.coli, 7,50%; Proteus, 10%, a la concentración global de 800 millones de gérmenes por cc. (Laboratorios Leti).

c) varidasa: estreptoquinasa (10 U.), estrep todornasa (2,5 U.). (Laboratorios Lederle).

d) PPD: derivado proteico purificado de la tuberculina (2 U.T. por 0,1 cc.). (Laboratorios Ibys).

e) tuberculina: a concentración de 1mg/ml. (cedida por el Instituto Municipal de Higiene de Barcelona).

Como puede observarse todos estos antígenos derivan de preparaciones bacterianas o fúngicas y se emplean bajo la suposición de que el individuo ha contactado ya con ellos en algún momento de su vida y la inyección intradérmica de los mismos va a evocar una reacción de "recuerdo" que a su vez pondrá de manifiesto la capacidad del individuo para evidenciar una hipersensibilidad retardada establecida (respuesta secundaria).

Estos tests tienen la virtud de su gran simplicidad ya que basta inyectar intradérmicamente en el bra

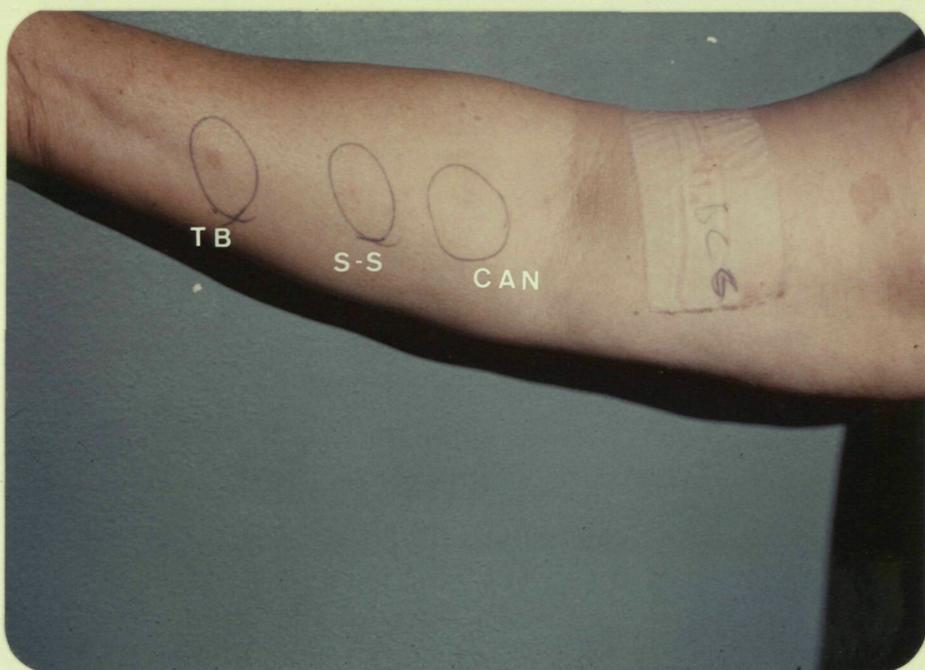


Fig. 3.- Ausencia de respuesta a los antígenos de recuerdo (círculos azules).



Fig. 4.- Intensa reacción al PPD, débil a la vacuna antibacteriana mixta (v.a.m.) y negativa a la candidina (can.).

zo la cantidad de antígeno contenido en 0,1 ml. de estas preparaciones mediante jeringa de insulina y realizar la "lectura" de la reacción a las 48 h., comprobando si aparece en la zona de la inyección un eritema, edema y/o induración. Nosotros, siguiendo las normas de la E.C.O.G. (Eastern Co-operative Oncology Group) una organización multicéntrica para el estudio del cáncer con instituciones en Norteamérica, Europa y Africa, hemos utilizado como mínimo cuatro de estos antígenos en todos los pacientes, incluidos los del grupo control.

Hemos considerado la prueba como positiva cuando existe reacción como mínimo frente a dos de los antígenos inyectados, ya que la mayoría (el 92%) de nuestros controles mostraron esta capacidad. (Figs. 3 y 4).

3.4.-Sensibilización por contacto a alérgenos primarios (DNFB, DNCB)

Al estudio de la inmunidad celular mediada con los antígenos de "recuerdo" puede imputársele el hecho de que el procedimiento no es capaz de distinguir entre una verdadera anergia y la falta de exposición previa a los antígenos.

Es por ello que al hacer una valoración inmunitaria mediante el estudio de la hipersensibilidad cu

tánea retardada se aconseja completar la batería de antígenos con la aplicación de alguna sustancia antigénica frente a la cual el individuo raramente habrá estado en contacto previamente (respuesta primaria). Con mucho ha sido el dinitroclorobenceno (DNCB) el antígeno de este último grupo utilizado más profusamente. También el dinitrofluorobenceno (DNFB) ha sido empleado por diferentes autores. Ambas sustancias son irritantes locales que producen una sensibilización por contacto en alrededor del 90% de la población adulta normal.

Nosotros hemos utilizado ambos alérgenos en nuestros pacientes. El DNCB se ha aplicado según la técnica habitual del Dispensario de Alergia del Departamento de Dermatología de este Hospital (ROMAGUERA y cols., 1974) basada en el método descrito por CLAUDY (1972). El primer día se efectúa una simple epicutánea en la cara anteroexterna del brazo con una gasa impregnada (patch-test) de 0,02 cc. de una solución de DNCB al 3% en acetona, recubierta seguidamente con esparadrapo. Transcurridas 48 horas se procede a la lectura del parche cuyo resultado consiste la mayoría de veces en la aparición de un efecto caústico (reacción irritativa-tóxica). A este primer paso se le denomina prueba de inducción.

A los 15 días de efectuado el test de inducción debe procederse a realizar la prueba de revelación que consiste en la aplicación de una epicutánea en la cara anteroexterna del otro brazo con una gasa impregnada con 0,02 cc. de una solución de DNCB al 0,66% en acetona y recubierta posteriormente con esparadrapo.

A las 48 horas se levanta el parche y se procede a la lectura. El resultado es negativo si no existe alteración en la zona cutánea donde se efectuó la prueba; es positivo si aparece una reacción alérgica típica con edema y/o vesiculación.(Fig. 5).

Para la sensibilización frente al DNFB se sigue la técnica de TREMIRE (1970). Dicha sustancia se prepara en una solución de acetona y aceite de oliva a proporciones iguales y a concentraciones del 10 y 0,1%. El primer día se colocan 0,05 cc. de la solución al 10% en la cara anteroexterna del brazo dejando secar la zona impregnada por sí sola. Simultáneamente y para descartar una eventual sensibilización anterior al antígeno o para verificar que no provoca lesiones irritativas se aplica un segundo test mediante solución al 0,1% bajo parche durante 48 h.

A los 15 días se reaplica el DNFB a ambas concentraciones efectuándose la "lectura" a las 48 h. y



Fig. 5.- Intensa reacción al DNFB que desborda el área de aplicación.

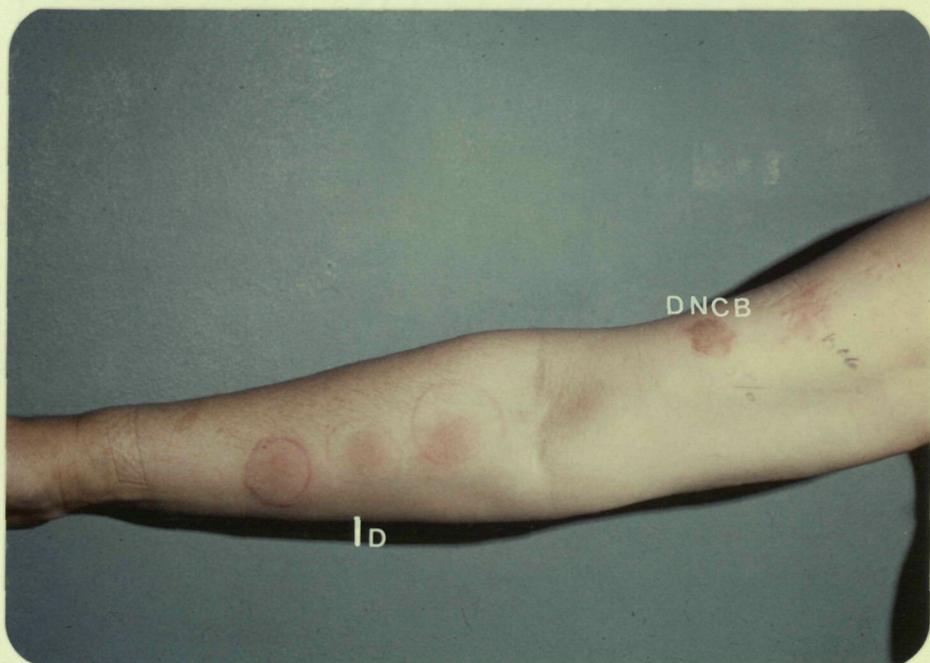


Fig. 6.- Marcada respuesta al DNCB con necrosis de la zona. Intradermoreacciones también positivas (Id).

comprobando si existe edema, eritema y/o vesiculación.(Fig.6)

3.5.- Test de transformación linfoblástica (TTL).

La proliferación de células sensibilizadas tras el contacto con el antígeno específico y su cambio de morfología apareciendo grandes células blásticas con un núcleo más pálido y un citoplasma basófilo, se ha utilizado como una prueba in vitro para medir la hipersensibilidad celular y habiéndose demostrado en ocasiones una buena correlación con los resultados in vivo. El grado de estimulación se aprecia bien por el porcentaje de blastos que encontramos en el cultivo o bien por la incorporación de timidina marcada (precursora de los ácidos nucleicos) en el DNA que se haya sintetizado en la prueba.

Por otra parte se ha comprobado que se pueden inducir cambios parecidos en linfocitos mediante tratamiento con determinados mitógenos vegetales, de los cuales los mejor conocidos son la fitohemaglutinina (PHA) y la conavalina A (con A).

Nosotros hemos utilizado la PHA según técnica de NOWELL (1960) y llevada a la práctica entre nosotros por CASTELLS RODELLAS (1971). Para ello se extraen 20 cc. de sangre heparinizada que se mantiene en condiciones esté



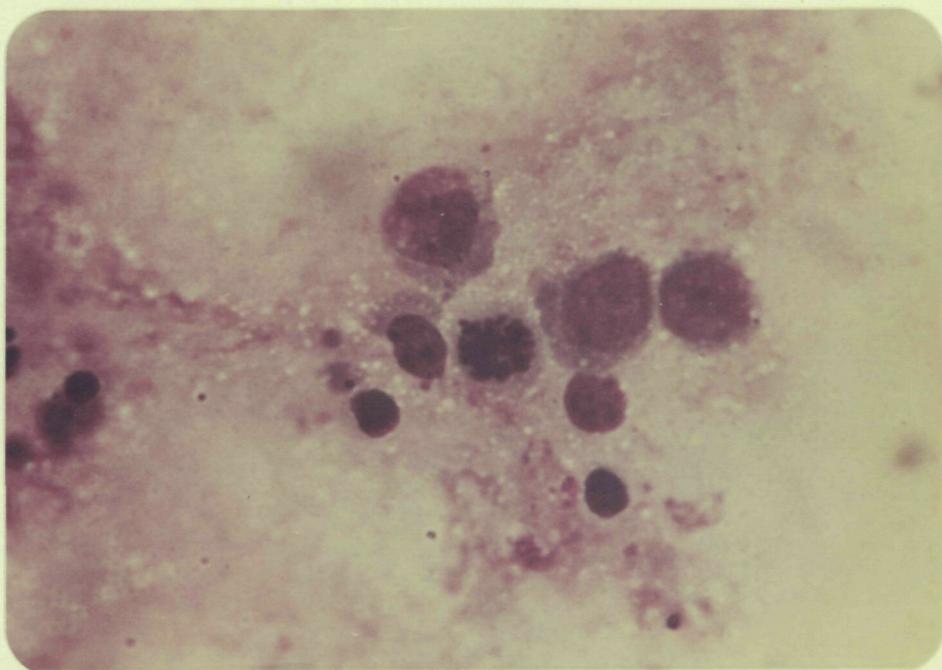


Fig. 7.- TTL. Aparición de formas blásticas tras la estimulación linfocitaria con fitohemaglutinina. (PHA).

riles a 37° C como mínimo durante dos horas. Se prepara 1 cc. de medio de cultivo Tc 199 con 0,2 ml. de suero AB; a esto se le añade el antígeno (PHA) al 1 % ; se recoge el plasma obtenido por sedimentación a 37° y tras centrifugado se desprecia el sobrenadante; el sedimento que contiene los linfocitos se resuspende en 1 cc. de Tc 199. Esta suspensión se adiciona al tubo que contiene el antígeno y se mantiene durante 3 días a 37° C en estufa. Al cabo de este período de tiempo se centrifuga la suspensión y tras eliminar el sobrenadante se resuspende el sedimento en 2 cc. de fijador (2 cc. de alcohol metílico más acético al 5%). Se coloca en nevera a 4° C durante 20 minutos y se centrifuga. Una vez eliminado el sobrenadante se realiza la extensión que una vez seca y teñida con Giemsa podrá ser leída.(Fig.7)

3.6.- Determinación de linfocitos T (test de las rosetas).

Se ha realizado mediante la técnica de SILVEIRA y cols. (1972) con las modificaciones sugeridas por EDELSON y cols. (1973) y puesta en marcha en nuestro Hospital por ESTRACH y cols. (1974).

Dicha técnica se basa en la capacidad que presentan los linfocitos T del hombre de formar rosetas espontáneamente al ponerse en contacto con los hematíes de

carnero gracias a que poseen receptores de membrana para estos (receptores E). Consta de los siguientes pasos:

a) Preparación de los hematíes de carnero.

En un recipiente estéril se recoge sangre de carnero des_fibrinándola mediante perlas de cristal. Se lava 3 veces con PBS, centrifugando a 3.000 rev. p.m. La sangre puede conservarse por un período de 8 a 10 días en líquido de Alsever (vol/vol) a 4° C.

Antes de utilizar la sangre debe lavarse dos veces con líquido de Hanks. Una vez centrifugada se ajusta al 2,5% en medio de cultivo TC-199, enriquecido con un 10% de suero fetal de ternera descomplementado.

b) Preparación de la sangre del enfermo.

Con una jeringuilla estéril se extraen 20 ml. de sangre que se hepariniza. Mediante centrifugación diferencial con gradiente Ficoll-Pielograf se separan los linfocitos. Se efectúa el recuento de los linfocitos en una cámara cuentaglóbulos y se ajusta la concentración a $2-5 \cdot 10^6$ células/ml.

c) Preparación de la suspensión. Se prepara una suspensión vol/vol con linfocitos y hematíes de carnero a 2,5% que se mantiene en la estufa a 37° C durante una hora. Se centrifuga a 300 g. durante 10 minutos

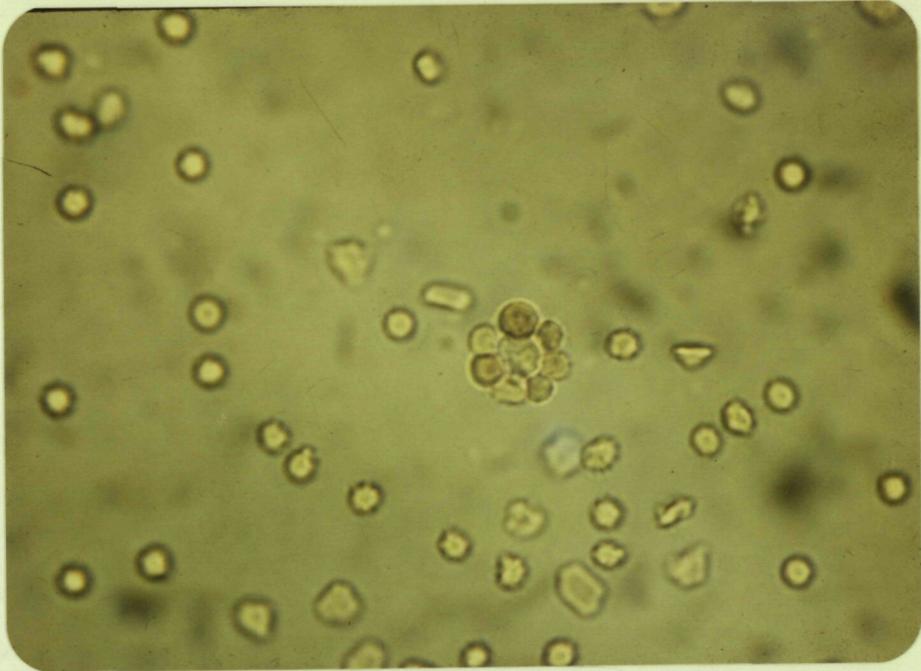


Fig. 8.- Test de las rosetas. Imagen en fresco.

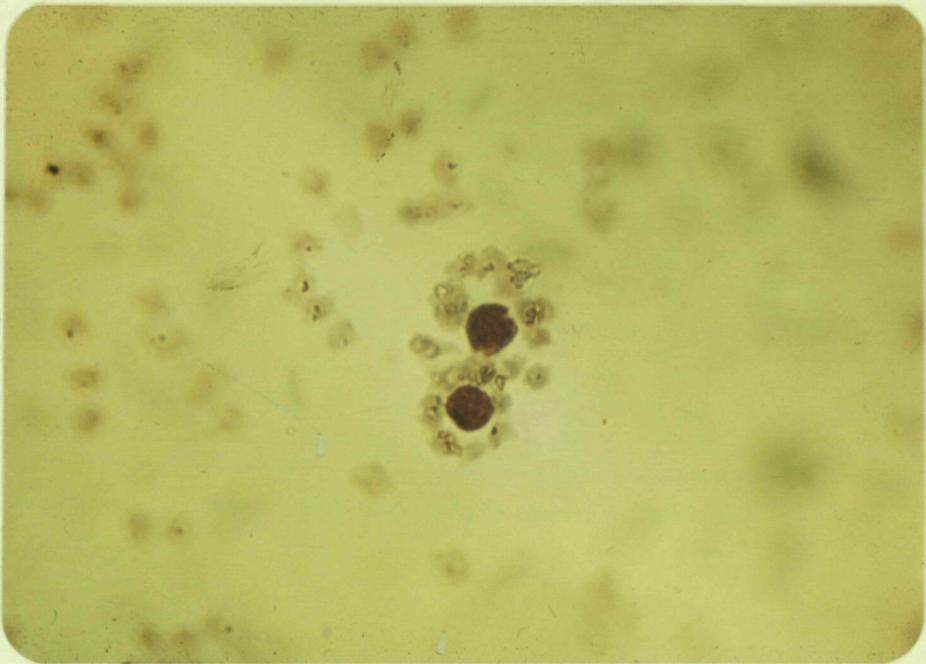


Fig. 9.- Test de las rosetas. Roseta doble fijada y teñida con Giemsa.

y el centrifugado se mantiene a 0° C en la nevera durante 1 a 2 horas. Después de este período se deposita una gota de la suspensión sobre un portaobjetos recubriéndola con un cubre para efectuar el recuento de rosetas formadas.

d) Recuento de las rosetas. Para considerar que una roseta está formada, cada elemento linfocitario debe hallarse adherido a mínimo de 4 hematíes. Se efectúa el recuento de 10 a 200 linfocitos, estableciéndose de esta forma el porcentaje de las rosetas formadas. (figs. 8 y 9).

4.- DETECCION DE "MARKERS" TUMORALES.

Tanto el estudio del antígeno carcinoembriónico (CEA) como de la beta-subunidad de la hormona gonadotropo-coriónica (β HCG) y del láctógeno-placentario humano, se han llevado a cabo mediante técnicas de radioinmunoanálisis que pasamos a describir seguidamente.

4.1.- Técnica de determinación del antígeno carcinoembriónico (CEA).

La sangre (10 cc.) obtenida de la vena antecubital es recogida en tubos Standard Vacutainer con teniendo sorbato potásico y EDTA. Antes de 4 horas tras la recogida se centrifuga y el plasma es conservado a 80° C hasta la práctica del test.

Hemos utilizado el test CEA-Roche basado en el método descrito por HANSEN (LoGERFO y cols., 1971) en los laboratorios Hoffmann-La Roche, por ser la única técnica que había sido aprobada por la FDA hasta 1976 para uso clínico y que se esquematiza en la Fig. 10.

Dicho método consta de dos partes fundamentales: 1ª separación del CEA (prepurificación) mediante ácido perclórico y diálisis, 2ª radioinmunoanálisis del CEA.

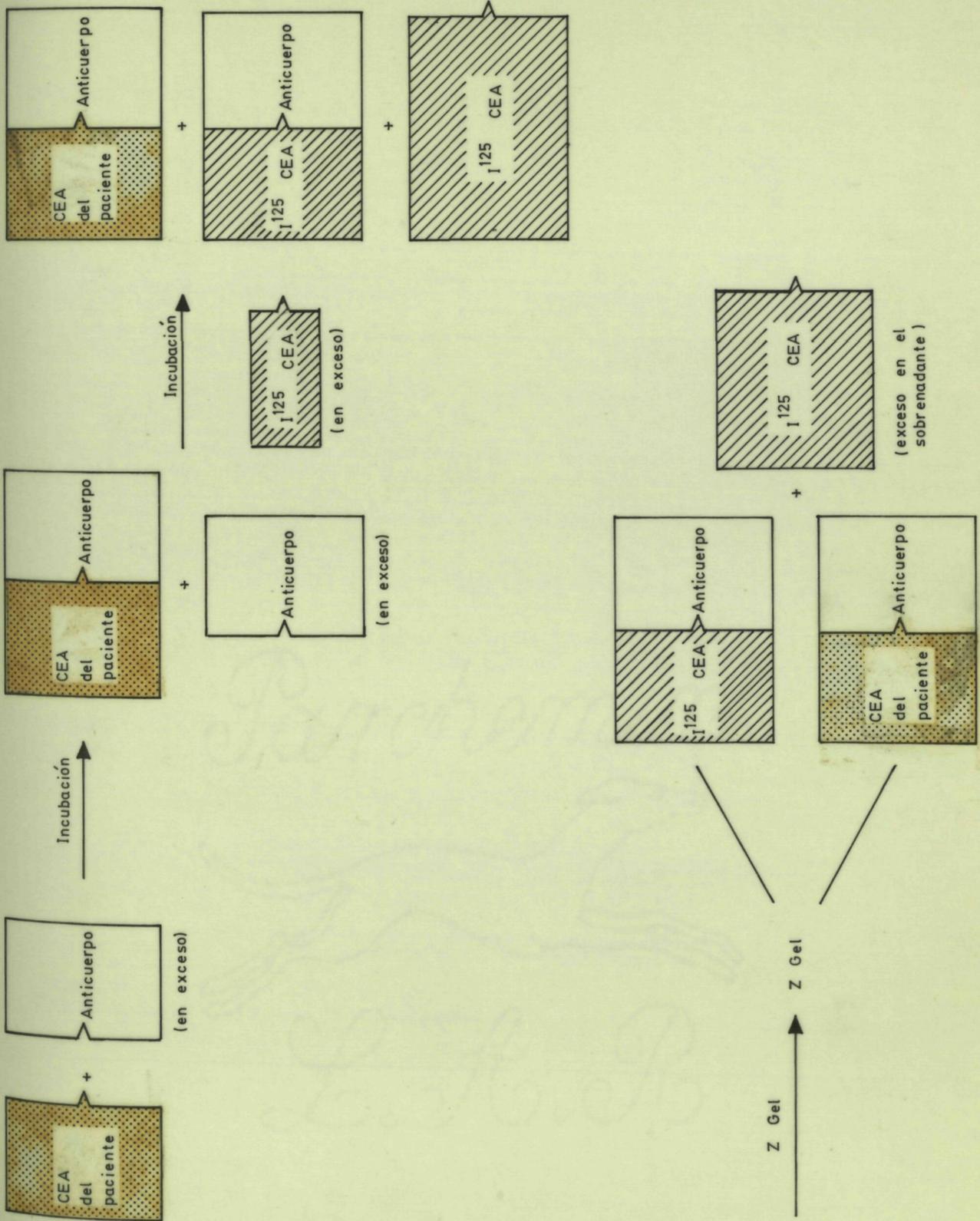


Fig. 10. Test CEA-ROCHE según técnica de Hansen (gel - zirconil - fosfato),

La separación del antígeno carcinoembriónico se realiza de la siguiente manera. Se toman 0,5 ml. de los plasmas problemas y de controles conocidos de CEA y se mezclan con 2 ml. de suero fisiológico a lo que se añaden 2,5 ml. de $\text{ác. perclórico } 1,2 \text{ M.}$ Inmediatamente se agita tubo por tubo durante 30 segundos. Tras centrifugar durante 20 min. a 1000 g. se somete el sobrenadante (que contiene las glicoproteínas solubles en ác. perclórico , incluido el CEA) a diálisis en agua bidestilada durante 3 horas, operación que se repite tres veces (9 horas en total). Finalmente se dializa contra solución tampón de acetato amónico 0,01 M.

Para el radioinmunoanálisis se preparan primeramente las diluciones de los standards (sueros con cantidades conocidas de CEA) que incluye cada kit. Se añade a cada standard 5 ml. de buffer EDTA y a partir de aquí se tratan de la misma forma estos tubos y los problemas procedentes de la diálisis.

Se adiciona a cada tubo el suero anti-CEA y tras agitación e incubación a 45° durante 30' se añade el CEA - I^{125} . Tras agitar e incubar de nuevo se coloca en cada muestra el gel-circonil (gel-z que separa el CEA tanto radiactivo como el problema unido al anticuerpo y el libre). Tras centrifugación a 1000 g. durante 5 min. se

tira el sobrenadante, se procede a lavar el precipitado con tampón acetato amónico y una vez centrifugado y decantado el sobrenadante se valoran los precipitados en un contador gamma.

La sensibilidad del método es de 0,5 ng/ml. de CEA y en cuanto a su reproducibilidad se observa una desviación standard de $\pm 0,5$ ng/ml. para valores de 0-5 ng/ml, de $\pm 1,0$ ng/ml. entre 5-10 ng/ml. y de $\pm 2,0$ ng/ml. para cifras comprendidas entre 10-20 ng/ml.

4.2.- Radioinmunoanálisis del lactógeno placentario humano (HPL).

Se ha realizado según la técnica de GENAZZANI y cols. (1971) basada en un método de separación con un primer anticuerpo ligado a fase sólida (celulosa activada). Su título final es 1:3000, y procede de la cabra.

La hormona standard es de procedencia humana. La hormona marcada lo está por el método de la cloramina T, es purificada en Sephadex G-100 y tiene una actividad específica de 50 mci/mg. El tampón es un buffer fosfato 0,04 M, ph 7,4, con 0,1% de BSA.

Criterios de validez del método. Sensibilidad: 0,0625 μ g/ml.; recuperabilidad: 95-112%; precisión (mediada por coeficiente de variación): intraensayo 7,7%,

interensayo 12,5%.

4.3.- Determinación de la hormona gonadotropacoriónica (β -HCG).

Se ha llevado a cabo mediante la técnica de VAITUKAITIS y cols. (1972) basada en un método de radioinmunoanálisis de separación por segundo anticuerpo ligado a fase sólida (celulosa activada por el método de Wide).

El primer anticuerpo se obtiene en conejo y su título es 1:50.000; el 2º es obtenido en cordero y su título es 1:1.600. El standard es de procedencia sintética con una equivalencia de 1 ng=6,6 m UI del 2º standard internacional.

La hormona marcada lo es por el método de la cloramina T. Purificación en Sephadex G-100 con actividad específica de 200 μ ci/ μ g. El buffer es un tampón fosfato 0,05 M a ph: 7,5, con 0,5% de BSA.

Criterios de validez del método. Sensibilidad: 0,5 ng/ml; recuperabilidad: 94 - 110%; precisión: c.v. intraensayo 4,50%; c.v. interensayo 9,71%.

A pesar de su alta especificidad el anti-suero tiene una pequeña reacción cruzada con TSH y LH (del orden de 0,7-0,9%). Para obviar este inconveniente

se introduce en cada serie un "control negativo" constituido por un pool de sueros de varones normales cuyo valor es de $0,65 \pm 0,12$ ng/ml. (media de 15 determinaciones).

5.- METODOLOGIA ESTADISTICA.

El análisis estadístico de los resultados obtenidos ha sido realizado por Eugenia Bieto, Licenciada en Ciencias Empresariales y Master en Dirección de Empresas por ESADE, y se ha efectuado según los métodos siguientes:

5.1.- El test χ^2 (chi cuadrado) con la corrección de Yates cuando ha sido necesaria (para observaciones inferiores a 5) se ha utilizado para comparar el estadio de la enfermedad, su localización e histología con la respuesta de hipersensibilidad cutánea retardada frente a los antígenos de "recuerdo" y sensibilizantes primarios (DNFB y DNFB), así como para relacionar la evolución clínica de las pacientes con la positivización o ausencia de variación en dicha respuesta.

5.2.- Se ha efectuado una comparación de proporciones utilizando distribuciones binomiales a su aproximación por la normal, para contrastar la hipótesis de si existe variación en la proporción de reacciones negativas para los antígenos standard, dinitrofluorobenceno y dinitroclorobenceno con respecto al grupo de control.

5.3.- Se ha realizado un test de comparación de medias con muestras pequeñas y varianzas desconocidas (test de Student) para contrastar la hipótesis de que las mediciones de poblaciones linfocitarias T y B, test de transformación linfoblástica, inmunoglobulinas G, M y A y linfocitos totales en las pacientes estudiadas son diferentes con respecto al grupo control, clasificando los casos según estadio clínico, localización e histología.