

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



UNIVERSIDAD DE BARCELONA

HOSPITAL CLINICO Y PROVINCIAL
FACULTAD DE MEDICINA

Prof. J. González-Merlo

Departamento de Obstetricia y Ginecología

Casanova, 143 - Teléf. 253 57 96
BARCELONA-11

D. Jesús González-Merlo, Catedrático de Obstetricia y Ginecología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Barcelona,

C E R T I F I C A: Que D. JUAN BALASCH CORTINA ha realizado, bajo mi dirección, la Tesis Doctoral titulada "ESTUDIO INMUNITARIO EN EL CANCER GINECOLOGICO" y que dicha Tesis está en condiciones de ser leída a partir del día de la fecha.

Lo que hago constar para los efectos oportunos en Barcelona a cuatro de octubre de mil novecientos setenta y ocho.

Prof. J. González-Merlo

II CATEDRA DE OBSTETRICIA Y
GINECOLOGIA DE LA FACULTAD
DE MEDICINA DE BARCELONA
Profesor Dr. J González Merlo

A mi madre, gracias a
cuyo esfuerzo e ilusión
he llegado hasta aquí.

A Carmen, mi esposa,
que me acompaña en mi
camino.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar deseamos expresar nuestro profundo agradecimiento al Profesor Jesús González-Merlo quien con sus enseñanzas despertó en nosotros el interés por la Ginecología cuando cursábamos cuarto curso de Medicina. Ahora, seis años después, hemos finalizado esta tesis bajo su dirección. Durante este período de tiempo hemos sido alumno interno por oposición, médico asistente y médico residente de primero, segundo y tercer año en su Escuela que con tanto acierto dirige y de la que nos sentimos orgullosos de formar parte. Trabajar a su lado ha constituido un constante estímulo en nuestro quehacer diario y nos ha "contagiado" de su inquietud científica y vocación por la Ginecología; fruto de todo ello es esta tesis que presentamos y que nos honra en dirigir.

Nuestra gratitud a los Dres. Teresa Estrach, Carlos Romaguera y Prof. Antonio Castells-Rodellas del Departamento de Dermatología cuya colaboración ha sido imprescindible para llevar a cabo algunas de las técnicas utilizadas.

Al Sr. Ramón Vilella, biólogo y residente del Departamento de Inmunología, por su trabajo en la laboriosa técnica de determinación del antígeno carcino-embriónico; y muy especialmente al Director de dicho Departamento, Dr. Jorge Vives, cuya orientación ha sido esencial para el logro de esta tesis.

Nuestro reconocimiento al Dr. Manuel Márquez, Jefe del Laboratorio de Histopatología de nuestro Departamento, por sus precisos informes anatomo-patológicos necesarios para la valoración y clasificación de los casos estudiados. Al Dr. Pedro Jou por la preparación de la iconografía histológica.

Seríamos injustos si no hiciéramos constar desde estas líneas nuestro agradecimiento al equipo de enfermería de la Sala de Ginecología de nuestra Clínica por su labor en la recogida y transporte de las muestras sanguíneas; y a las componentes del Laboratorio de Inmunología del Departamento de Dermatología por su labor en la práctica de alguna de las técnicas que hemos empleado.

También deseo dar las gracias a Eugenia Bieto, Licenciada en Ciencias Empresariales y Master en

Dirección de Empresas por ESADE, quien ha llevado a cabo el estudio estadístico de los resultados dando a los mismos el rigor científico necesario.

A las Stas. Ma Carmen Puertas, Pilar Sabater y Montse Pons por su eficiente y esmerada labor en la preparación de este manuscrito.

Finalmente a todos los médicos y compañeros del Departamento, quienes directa o indirectamente han contribuido a la confección de las historias clínicas de las pacientes estudiadas.

I N D I C E

	Pag.
HIPOTESIS DE TRABAJO.MOTIVO DE LA TESIS.	1
PLANTEAMIENTO GENERAL DEL PROBLEMA Y REVISION DE LA LITERATURA.	6
1.- Introducción	7
2.- Antigenicidad tumoral	21
2.1.- En tumores de experimentación animal.	30
2.2.- En tumores humanos.	54
2.3.- En el cáncer ginecológico	116
3.- Respuesta inmune del huésped frente al tumor.	143
3.1.- Datos obtenidos de la experimentación animal.	146
3.2.- Evidencia clínica para reacciones inmunológicas a tumores humanos.	176
3.3.- Mecanismos efectores en inmunidad tumoral.	226
3.4.- "Escape" del tumor a los mecanismos inmunológicos de control.	250

	Pag.
4.- Aplicación del estudio inmunitario en el diagnóstico y pronóstico de las neoplasias.	256
4.1.- "Biological markers".	265
4.2.- Tests de inmunocompetencia en el inmunodiagnóstico y pronóstico del paciente canceroso.	279
4.3.- Estudio de la respuesta inmunitaria frente a antígenos tumor asociados.	291
 MATERIAL Y METODOS.	 297
1.- Esquema de trabajo.	298
2.- Pacientes estudiadas. Casuística.	301
3.- Técnicas de evaluación inmunitaria.	311
3.1.- Determinación de inmunoglobulinas cuantitativas (IgG, IgM, IgA).	311
3.2.- Determinación de los linfocitos B.	311
3.3.- Intradermorreacciones con antígenos "de recuerdo".	314
3.4.- Sensibilización por contacto a alérgenos primarios (DNFB, DNCB)	317
3.5.- Test de transformación linfoblástica (TTL).	321

	Pag.
3.6.- Determinación de linfocitos T (test de las rosetas).	323
4.- Técnicas de investigación de los "mar- kers" tumorales.	327
4.1.- Determinación del antígeno carci- noembrionario (CEA)	327
4.2.- Determinación del lactógeno pla- centario humano (HPL)	330
4.3.- Estudio de la gonadotrofina-co riónica (β -HCG).	331
5.- Metodología estadística	333
RESULTADOS	335
COMENTARIOS Y DISCUSION	391
CONCLUSIONES	430
BIBLIOGRAFIA	435

1.-

HIPOTESIS DE TRABAJO, MOTIVO DE LA TESIS.

Si bien algunos tipos de cáncer están experimentando un descenso en su incidencia (cáncer gástrico, cáncer de cuello uterino), se conocen hasta el momento más de cien tipos diferentes de neoplasias malignas y el porcentaje global de las mismas en la población va en aumento.

Fundamentalmente son seis los problemas que la medicina debe de resolver frente al cáncer:

- a) identificar la causa(s)
- b) erradicación de la misma(s)
- c) identificación de los factores e individuos de alto riesgo para cada tipo de neoplasia
- d) intensificación de los programas de diagnóstico precoz, especialmente en los grupos de alto riesgo
- e) hallar los métodos adecuados para valorar

la inmunocompetencia del huésped frente al cáncer y para incrementar la respuesta orgánica frente al mismo

f) desarrollar los programas adecuados destinados tanto a profesionales como al público en general en relación con los problemas que presenta el paciente canceroso, a fin de mejorar la calidad de la supervivencia en los enfermos neoplásicos avanzados y en aquellos en los que el tratamiento de su enfermedad requirió la amputación de alguna parte de su organismo.

La participación del sistema inmunitario en la relación huésped-neoplasia parece ser hoy un hecho firmemente establecido. Así KEAST (1970) señala que "... posiblemente están apareciendo de forma constante en el cuerpo humano células potencialmente malignas que son reconocidas como tales y eliminadas; sólo cuando inciden factores ambientales secundarios o con el declive de la función inmunitaria del organismo, pueden estas células desarrollarse en forma tumoral a pesar de la inmunidad".

Existen una serie de hechos experimentales que apoyan una participación de la inmunidad en el proceso canceroso y datos clínicos sobre la existencia de reacciones inmunológicas a tumores humanos.

Por otra parte, especialmente para tumores

de experimentación animal pero también en diversos tipos de neoplasias humanas, se demuestra que la transformación maligna de las células conlleva la derepresión de unos antígenos denominados "tumor asociados o tumor específicos" que se localizan en la superficie celular y que en algunos casos es posible hallarlos también en las células del embrión humano.

Frente a la posibilidad de que existan estos antígenos tumorales, cabe preguntarse: ¿ presenta el enfermo una respuesta inmune de defensa frente al tumor ?, ¿ influyen esas reacciones inmunológicas en la historia natural de la neoplasia ?, ¿ podemos intervenir potenciando la respuesta inmunitaria ?.

Si ello se comprueba ser cierto podríamos tener las bases inmunológicas para: 1º el diagnóstico de las neoplasias mediante reacciones antígeno-anticuerpo o por detección de antígenos tumorales específicos, 2º hacer un pronóstico del enfermo canceroso mediante el estudio de su status inmunológico, 3º instaurar una inmunoterapia.

Teniendo en cuenta el importante papel que juegan las neoplasias ginecológicas en la mortalidad por cáncer en la mujer, y de lo dicho hasta aquí y del interés que ha despertado en nosotros el posible papel de la inmu-

nidad en el cáncer, se desprenden el motivo y la intencionalidad de esta tesis cuyos objetivos pretenden ser los siguientes:

1º Hacer una valoración del estado inmunitario de la paciente con cáncer ginecológico y con ello relacionar:

- a) la respuesta inmunitaria y el pronóstico de la enfermedad
- b) la respuesta inmunitaria con el estado clínico de la neoplasia
- c) la respuesta inmunitaria y la evolución post-tratamiento en las pacientes en que proceda
- d) la respuesta inmunitaria con la localización de la neoplasia
- e) la respuesta inmunitaria con el tipo histológico

2º Detectar la presencia en el plasma de la paciente cancerosa de macromoléculas de origen tumoral (neoantígenos), lo que puede permitirnos:

- a) valorar la eficacia y radicalidad de la terapéutica empleada en cada caso
- b) "monitorizar" los efectos de la misma constituyendo una ayuda en la detección precoz de metástasis y recidivas y progresión de la neoplasia
- c) reevaluar el tratamiento empleado.

PLANTEAMIENTO GENERAL DEL PROBLEMA Y

REVISION DE LA LITERATURA.

7.-

I.- INTRODUCCION

De las múltiples definiciones que se han dado para establecer el concepto de neoplasia maligna, seguramente es la de WILLIS (1952) una de las más aceptadas y acertadas. Según este autor, "una neoplasia es una masa anormal de tejido cuyo crecimiento es excesivo e incoordinado en relación con el de los tejidos normales y persiste en esta forma aún después de haber cesado el estímulo que indujo la aparición de aquella".

Esta definición implica dos características fundamentales referentes a la masa tumoral: su crecimiento ilimitado y la autonomía de las células cancerosas en su proliferación escapando a los mecanismos de control del huésped.

Y desde el punto de vista clínico, los he-

chos más importantes en relación a las neoplasias malignas, los constituyen este crecimiento de las células en forma desordenada, su tendencia a invadir y diseminarse y el aparente fracaso de los mecanismos de control del huésped.

Esta autonomía de la célula cancerosa en su crecimiento ha constituido la piedra clave de nuestros conocimientos sobre la biología del cáncer durante muchos años. Sin embargo, a partir de los trabajos de HUGGINS y HODGES (1941) en los que se demuestra la hormonodependencia de algunos tumores, se señala la posibilidad de que mecanismos huésped-mediados puedan ejercer alguna influencia en el curso de la neoplasia. Desde entonces el posible papel de la respuesta inmunitaria en el desarrollo y crecimiento tumorales y las alteraciones inmunológicas que provoca el cáncer en el huésped han sido objeto de muchas especulaciones y experimentos. Y hasta el momento existen evidencias tanto clínicas como experimentales de que el curso de la neoplasia puede verse influenciado por factores procedentes del sujeto enfermo, que si bien no constituyen todavía una ayuda práctica definitiva desde el punto de vista terapéutico, representan un camino extraordinariamente prometedor.

El concepto de resistencia frente al tumor fué introducido ya por EHRLICH a principios de este siglo

(1906), pero él atribuía este fenómeno a factores nutricios.

En realidad la inmunología tumoral tomo especial interés con el estudio de las bases inmunogenéticas y biológicas de los trasplantes. Ello tiene su explicación, ya que por una parte la restitución de órganos enfermos por el trasplante de tejidos sanos ha sido objetivo de la medicina desde hace mucho tiempo, pero ha sido frustrado de manera notable por los intentos del cuerpo para rechazar los injertos de otros individuos, y por otro lado existen una serie de datos (especialmente animales) que indican que el huésped no trata la neoplasia (ya sea inducida por virus oncogénicos o provocada por sustancia químicas cancerígenas) "como una cosa propia".

La capacidad de rechazar un trasplante de tejido puede buscarse en el pasado a lo largo del árbol evolutivo, llegando tan lejos como a los gusanos de anillos (anélidos). Obviamente esta facultad no se desarrolló con el fin de frustrar al cirujano que realiza el trasplante; debe proporcionarle una ventaja de supervivencia al huésped. Una posibilidad sugerida de forma intuitiva por Lewis THOMAS (1959) y desarrollada posteriormente por BURNET (1965) fué que el sistema inmunológico actuaba como "policía", vigilando a las células del cuerpo, pendiente de las formas alteradadas que podían convertirse en neoplásicas. Pero para que es

te mecanismo de supervisión inmunológica funcione, las células cancerosas deben desarrollar un nuevo antígeno de superficie que pueda ser reconocido por las células linfoides.

Si bien tanto los datos clínicos como los trabajos realizados en tumores animales son alentadores en este sentido, y la demostración de antígenos tumor-específicos que conllevan una reacción inmunitaria por parte del huésped han acabado con el concepto de la total autonomía tumoral, ello nos enfrenta con nuevos y más difíciles problemas conceptuales.

En efecto; el significado biológico de los neoantígenos tumorales todavía es oscuro. La transformación maligna de la célula conlleva una serie de alteraciones en la superficie celular que podrían ser detectadas por un sistema inmunitario altamente sensitivo que reconocería aquellas aberraciones como "no propias" a modo de antígenos específicos. El mecanismo por el cual aparecen estas determinantes antigénicas sigue siendo fruto de la especulación. Pueden ser el resultado de alteraciones estructurales en los genes que codifican para la superficie celular o pueden surgir como consecuencia de una derepresión de genes que normalmente sólo se manifiestan en etapas precoces de la vida embrionaria. La estructura de algunos tu-

mores semejando tejidos embrionarios y la similitud entre las células neoplásicas y las del embrión de los mamíferos en algunos aspectos como son la capacidad para un rápido crecimiento e invasión y la relación inmunológica huésped-neoplasia, apoyan especialmente la segunda teoría.

Pero si aceptamos la existencia de neoantígenos tumorales que desencadenan una respuesta inmunitaria en el paciente, canceroso, se nos plantea una cuestión crucial, punto clave de la relación huésped-neoplasia: si el enfermo presenta esta reacción inmunológica potencialmente letal para la célula cancerosa, ¿por qué la neoplasia sigue creciendo y desarrollándose? Sólo cuando llegemos a conocer los mecanismos que se esconden bajo esta aparente paradoja, la inmunología tendrá una verdadera aplicación clínica frente al cáncer.

Mientras tanto queda otro problema por resolver y que constituye un reto a la inmunoterapia; ¿cómo podemos potenciar o estimular la respuesta inmunitaria para facilitar la destrucción de las células tumorales?.

La inmunoterapia antitumoral puede ser de tres tipos: activa, pasiva y adoptiva. La primera implica un intento de aumentar la propia respuesta del huésped frente al tumor; la inmunoterapia pasiva supone la administra-

ción de suero que contiene anticuerpos frente a los antígenos neoplásicos; y la inmunoterapia adoptiva consiste en la transferencia al enfermo de células inmunes o de información inmunológica que utilizará como si fueran propias (ver tabla I).

En algunos tipos de neoplasia como por ejemplo la leucemia, la inmunoterapia es un buen complemento de la quimioterapia (que ha conseguido una remisión completa de la enfermedad) para lograr la curación definitiva; pero con los tumores sólidos nos enfrentamos a menudo con neoplasias que responden poco a la terapéutica convencional. La inmunoterapia representa entonces un medio de tratamiento paliativo. Pero cuando la inmunoterapia se aplica en fases precoces de la evolución tumoral, especialmente tras la cirugía o radioterapia, cuando existe la mínima masa neoplásica posible, puede conseguirse entonces un retraso en la aparición de las recidivas o quizás la curación.

La inmunoterapia activa se basa fundamentalmente en la administración de adyuvantes inmunitarios inespecíficos, siendo con mucho la BCG el más utilizado (BORSOS y RAPP, 1973). El Immunotherapy Registry creado por el National Cancer Institute, aportaba en 1974 su primera lista de protocolos de inmunoterapia y de los 43 allí recogidos,

TABLA I.- Tipos de inmunoterapia

- I- Activa- Estimulación de la respuesta del huésped frente a los antígenos tumorales.
- a) Inespecífica. Adyuvantes tipo BCG y otros (Corynebacterium parvum, Bordetella pertussis, etc.)
 - b) Específica. Inyección de células tumorales autólogas o alogénicas muertas más haptenos.
- 2- Pasiva- Suero inmune.
- 3- Adoptiva-Transferencia de células inmunes o de información inmunológica.
- a) Transfusiones de linfocitos.
 - b) Factor de transferencia.
 - c) RNA "inmune".
 - d) Hormonas tímicas.
 - e) Transplante de médula ósea.

25 utilizaban la BCG como única forma de inmunoterapia,¹³ empleaban BCG junto a algún otro tipo de inmunoterapia, y únicamente en 5 no se utilizaba para nada la BCG (Mc.KHANN y GUNNARSON,1974). El bacilo de Calmette-Guerin es la Mycobacteria Bovis, utilizada para la vacunación frente a la tuberculosis humana pero posee además la propiedad de estimular los linfocitos B y T, y los macrófagos, o sea, estimula tanto la inmunidad celular mediada como la síntesis de anticuerpos. Por ello la inmunoterapia con BCG puede ser un complemento de la cirugía o la radioterapia radicales por cuanto contribuiría a evitar la proliferación de los depósitos microscópicos residuales de tumor o a su destrucción. En este sentido se aplicaría en forma de inmunoprofilaxis, pero no siempre con resultados convincentes (PINSKY,1976). Por otra parte se citan efectos beneficiosos de la inmunoterapia con BCG en el tratamiento de recidivas neoplásicas como por ejemplo las ginecológicas (PATTILLO, 1976a) y cuando se inyecta la BCG directamente en el interior de la masa tumoral, tanto en neoplasias experimentales como humanas, (MORTON,1972; ZBAR y cols., 1971; SEIGLER y cols.,1972; PINSKY y cols.,1973; SPARKS y cols., 1973; BORNSTEIN y cols., 1973). Pero donde más aplicación ha tenido, ha sido en el tratamiento de la leucemia aguda en el niño (MATHE y cols., 1968, 1969a, 1969b, 1972, 1973) y del melanoma (MORTON y

'cols.,1970a, 1974), por la técnica de escarificación.

El corynebacterium Parvum y otros diversos agentes han sido utilizados con los mismos principios generales que la BCG (ISRAEL y cols.,1972;FISHER y cols.,1974; SCOTT,1974; LIKHITE,1974).

En el cáncer ginecológico SONKIN y cols. (1972) no hallan diferencias significativas entre dos grupos de pacientes con neoplasias avanzadas al comparar el tratamiento con quimioterapia más BCG y con quimioterapia sola. Refieren los autores que si bien la escarificación con BCG permite una mejor tolerancia a los quimioterápicos, los períodos de supervivencia son sólo muy discretamente superiores en el grupo sometido a inmunoterapia.

Un tipo de inmunoterapia activa más específica se basa en la inyección al paciente de sus propias células tumorales (muertas) o las de otro paciente con el mismo tipo de tumor, no sólo con fines terapéuticos sino también inmunoprolifácticos (GLYNN y cols.,1963;NADLER y MOORE, 1966; CURRIE y BAGSHAWE,1969; MATHE y cols.,1969b;DORE y cols.,1970; KREMENTZ y cols.,1971; PARR,1972;PRAGER y BAECHEL,1973).

La inmunoterapia pasiva(seroterapia tiene poco valor y sólo ha probado ser útil en algunos casos de melanoma tratados con suero obtenido de pacientes en fase

de remisión de la enfermedad (HELLSTROM y HELLSTROM,1971c).

La inmunoterapia adoptiva mediante transfusión de linfocitos sensibilizados frente al tumor es útil en teoría (FEFER,1974)pero el problema está en la inmunización del dador.

Otra posibilidad sería la transferencia de RNA "inmune" frente al tumor. El RNA extraído de los linfocitos de un huésped animal inmunizado frente al tumor podría ser útil en el tratamiento de la neoplasia al transferir la información al receptor (ALEXANDER y cols.,1967;THOR y DRAY, 1968). Pero el principal problema para ello lo constituye en el hombre la enorme cantidad de RNA que habría de ser transferido para superar a la gran carga celular tumoral existente. Y además dado que el RNA "inmune" codifica otras diversas proteínas aparte de las dirigidas contra el tumor,se corre el riesgo de que se produzca una reacción de tipo anafiláctico.

Se ha intentado también el empleo del factor de transferencia obtenido de personas inmunizadas "de forma natural",para la inmunoterapia adoptiva. Este factor es una sustancia de bajo peso molecular (< 10.000),disociable de los antígenos de trasplatación , que se obtiene por diálisis a partir de los leucocitos periféricos lisados,

resiste la RNAsa pancreática, tiene una composición de polipeptido/polinucleótido y convierte a los linfocitos normales in vitro e in vivo al estado de respuesta antigénica (LAWRENCE, 1971). Descrito por este autor (factor de transferencia de Lawrence), tiene la propiedad de transferir la inmunidad de tipo celular mediada pero no la capacidad para producir anticuerpos. Si bien este procedimiento ha tenido éxito para el tratamiento de cuadros no tumorales como por ejemplo la candidiasis mucocutánea (FUDENBERG y cols., 1974), tuberculosis (GROB, 1974), esclerosis múltiple (KIRKPATRICK y cols., 1972), hepatitis crónica (LAWRENCE, 1969), etc., no se ha demostrado eficaz en el caso de las neoplasias (LOBUGLIO y cols., 1973; HILBERG y cols., 1973).

El empleo de extractos o derivados del timo a fin de inducir un aumento en el número de linfocitos T tiene una base teórica aceptable y prometedora (FRIEDMAN, 1975), pero queda por ver si las hormonas tímicas son capaces de potenciar la inmunidad tumor-específica.

Los trasplantes de médula ósea se utilizan principalmente para el tratamiento de las leucemias y de los casos de aplasia medular (THOMAS y cols., 1975). Su utilidad en los tumores sólidos radicaría en el tratamiento de la hipoplasia o depresión medular inducida por la quimioterapia o radioterapia.

Pero todos estos diferentes tipos de inmunoterapia no están exentos de inconvenientes.

Así la inmunoterapia activa puede enfrentarse al problema de un huésped tolerante frente a los antígenos tumorales o con un bajo índice de inmunocompetencia; puede ocurrir que las células tumorales posean una débil especificidad antigénica; y lo que es más grave, la inmunoterapia activa puede en ocasiones potenciar el crecimiento de la neoplasia al estimular la producción de anticuerpos que bloquean la acción de los linfocitos citotóxicos del huésped (fenómeno de la facilitación o favorecimiento tumoral), hecho que ha sido comprobado en experimentos animales (PIESSENS y cols., 1971; DONNER y cols., 1972; MATHE y cols., 1975; BERD y cols., 1975).

La inmunoterapia pasiva tiene el inconveniente de su corta duración y de poder favorecer también el crecimiento tumoral. Precisamente fué así como se descubrió este fenómeno: administrando suero en un intento de tratar al enfermo y desencadenando por el contrario un desarrollo más rápido del tumor.

La inmunoterapia adoptiva presenta como principales problemas el del rechazo, ya sea del injerto de médula ósea, ya sea de los linfocitos transferidos al

huésped, o pero aún, el desencadenamiento de una reacción de "injerto contra huésped". Este fenómeno ocurre cuando al inocular las células linfoides competentes en un huésped inmunodeprimido (como el paciente canceroso) incapaz de reaccionar contra ellas, las células injertadas están en libertad de reaccionar contra los antígenos de las células del huésped, que ellas reconocen como extrañas. La reacción resultante puede ser fatal.

Los riesgos de la inmunoterapia no son pues escasos y muchos de ellos van implícitos en cada modalidad de la misma. De forma general podemos decir que la inmunoterapia está especialmente indicada para el tratamiento directo de las masas tumorales intradérmicas, pero puede ser útil también como coadyuvante de otras modalidades más convencionales de terapéutica cuando se ha conseguido aparentemente la extirpación completa de la masa tumoral. Es en el momento en que exista la mínima cantidad de células neoplásicas posibles cuando se aconseja aplicar la inmunoterapia (PATTILLO, 1976 b), a fin de obtener unos resultados positivos.

Conseguir una mayor especificidad en el tratamiento y llevar a cabo una cuidadosa "monitorización inmunológica" del paciente canceroso, constituyen los requisitos fundamentales para seguir avanzando en este terreno.

2. ANTIGENICIDAD TUMORAL.



El concepto de "supervisión inmunológica" establecido por BURNETT (1965) se ha convertido hoy en el dogma central en el terreno de la inmunología y cáncer. El desarrollo de una neoplasia supone el fracaso de este mecanismo de "vigilancia".

Pero para que este sistema funcione es necesario que las células cancerosas presenten en su superficie un nuevo antígeno que pueda ser reconocido por las células linfoides inmunocompetentes.

Actualmente podemos afirmar que las células cancerosas presentan estos neoantígenos cuya aparición va implícita en su transformación neoplásica y que las diferencian de las demás células normales.

La información genética necesaria para la especificidad de esos nuevos antígenos puede tener dos orígenes.

nes (ver tabla II): extrínseco, por virus oncogénicos incorporados a los cromosomas celulares, o intrínseco, por alteraciones del genoma celular debido a agentes diversos, (según BOYSE y cols., 1968).

La infección por un virus exógeno oncogénico introduce una información genética nueva en los cromosomas celulares, que codifica para una serie de antígenos específicos localizados principalmente en la membrana de la célula o en el interior del núcleo (caso de los virus DNA). Esta es la razón por la que los diferentes tumores inducidos por el mismo virus muestran, como veremos posteriormente, una amplia antigenicidad cruzada.

Por el contrario los tumores inducidos por agentes físico-químicos presenta unos antígenos propios y específicos para cada tumor y no existen reacciones cruzadas entre ellos. Ello puede explicarse por la afectación de diferentes genes celulares al azar.

Por otra parte existe la posibilidad de que se produzca una activación o derepresión de genes activos normalmente durante la vida fetal que dan lugar a la aparición de los denominados antígenos oncofetales. Tal es el caso de la alfafetoproteína para el cáncer de hígado (ABELEV 1968) y del antígeno carcinoembrionario para las neoplasias digestivas (GOLD y FRIDMAN, 1965 a, 1965 b). La activación

TABLA II

Origen de la información para la especificidad los neo-
antígenos tumorales.

A.- extrínseco: por virus oncogénicos incorporados a
los cromosomas celulares.

B.- intrínseco: alteración del genoma celular por:

1-mutaciones- agentes químicos, radiaciones, etc.
que modifican el código estructural de genes para
la superficie de la célula.

2-activación o derepresión de genes silentes-

a) normalmente activos sólo durante la vida em
brionaria (antígenos onco-fetales)

b) normalmente presentes en otros tejidos ("ac-
tivación de genes ectópicos"; producción de
sustancias-"like").

de genes ectópicos tiene claros ejemplos en una serie de síndromes de producción anormal de hormonas asociados a tumores malignos, como es el caso de neoplasias bronquiales secretoras de sustancias ACTH-like (ANDERSON,1973).

La posible aplicación de estos antígenos en el diagnóstico del cáncer mediante su detección en el suero o en otros líquidos orgánicos, y la posibilidad de que el huésped presente una reacción inmunitaria valorable con vistas a establecer un pronóstico y/o una inmunoterapia en el paciente canceroso, ha hecho que la identificación y caracterización de estos antígenos tumorales tanto en neoplasias humanas como experimentales, hayan sido objeto de múltiples investigaciones y experimentos durante los últimos años.

Sin embargo la idea de que la resistencia del huésped al crecimiento tumoral pudiera constituir, al menos en parte, una manifestación de respuesta inmunológica frente a los antígenos de las células tumorales, fué sugerida ya hace casi cien años, y el interés por la patología tumoral existente en aquella época llevó al desarrollo de diversas técnicas de trasplante de tumores en diferentes animales de experimentación.

Una objeción a esta serie de experimentos iniciales ha sido de que los trasplantes se realizaron entre

animales alogénicos, esto es, miembros de la misma especie pero de diferente constitución genética, y no con animales sin génicos (de constitución genética idéntica; de la misma línea pura) como sería de desear. Incluso en la actualidad deben tenerse en cuenta confusiones posibles entre los antígenos de histocompatibilidad (antígenos de trasplante normales) y los antígenos de trasplatación tumor específicos (T.S.T.A.) ligados a la transformación neoplásica de la célula, en la evaluación de los resultados experimentales.

Evidentemente la falta de una homogenicidad genética entre los animales utilizados puede conducir a unos resultados falsos, pero un segundo injerto tumoral en aquellos animales que habían rechazado el tumor ponía de manifiesto una resistencia frente al desarrollo de la neoplasia, que parecía ser específica desde el punto de vista inmunológico.

Basados en sus propios estudios sobre la inmunología bacteriana, algunos investigadores llevaron los primeros intentos de inmunoterapia pasiva (seroterapia) en el cáncer humano mediante la preparación de antisueros anti tumorales a pesar de los malos resultados obtenidos en los experimentos animales. Así ya en 1895 HERICOURT y RICHET trataron a 50 pacientes cancerosos con antisuero antitumoral obtenido a partir de perros y caballos, y si bien estos au-

tores señalaron (aunque de manera escasamente documentada) haber conseguido efectos beneficiosos con esta terapéutica no pudo demostrarse una regresión objetiva de la neoplasia.

Quizás la primera y mejor descripción de un proceso inmunológico de resistencia frente al tumor y que indirectamente señalaba la existencia de antígenos tumor es pecíficos en las neoplasias animales, haya sido la proporcionada por CLOWES y BAESLACK (1905) que disponiendo de una serie de animales en los que la regresión de los tumores trasplantados era un fenómeno común, demostraron que cuando se injertaban tejidos de la misma línea tumoral a los animales en los que el tumor había regresado, el injerto era rechazado. Este modelo experimental fué examinado por diferentes investigadores, llegándose a la conclusión general de que esta resistencia frente al tumor no era hereditaria ni podía ser transferida a través del suero, y aceptándose que la inmunidad frente al trasplante tumoral constituía un fenómeno distinto al de la inmunidad bacteriana que por aquel entonces se creía mediada única y exclusivamente a través del suero. EHRLICH (1906) atribuyó la resistencia antitumoral a factores nutricios pero este concepto fué posteriormente rechazado por otros autores en favor de la existencia de mecanismos inmunológicos específicos. En este mismo año BASHFORD señalaba que el trasplanta

te de adenocarcinoma mamario en los ratones fracasaba si previamente se inoculaban células tumorales al receptor.

Los estudios encaminados a encontrar y desarrollar un método inmunológico específico para el tratamiento del cáncer, prosiguieron tanto en animales como en el hombre, pero un mordaz artículo aparecido en 1929 publicado por WOGLOM y en el que se recogían alrededor de cien artículos acerca de la supuesta existencia de los antígenos tumor-específicos, dió al traste con los resultados obtenidos hasta aquel momento en la experimentación con tumores animales al constatar la falta de homogeneidad genética existente entre los animales utilizados. Este autor concluía tras su extensa revisión que no habían pruebas fehacientes para asegurar la existencia de una respuesta inmunológica tumor-específica en el huésped.

Quizás lo más destacable en estos oscuros días de la inmunología tumoral y que sobrevivió a la aguda crítica de WOGLOM, sean los hallazgos de MURPHY (1926) que implicaban al linfocito en las reacciones inmunes frente al tumor . Se señalaba así por vez primera la posibilidad de que mecanismos celular-mediados y en ausencia de cualquier proceso humoral, pudieran estar implicados en la inmunidad tumoral.

La confirmación de esta por aquel entonces

radical y revolucionaria idea, tuvo que aguardar a la descripción del fenómeno de rechazo entre tejidos alogénicos y al esclarecimiento de los mecanismos de histocompatibilidad, todo lo cual a su vez fué posible al conseguirse animales de la misma línea pura, genéticamente idénticos (sinegénicos).

Así pues la inmunología tumoral toma especial interés con el estudio de las bases inmunogenéticas y biológicas de los trasplantes, y actualmente disponemos de datos que apoyan la existencia de una respuesta inmune del huésped frente a los antígenos tumorales, tanto humanos como de experimentación animal.

2.1.- Antígenos en tumores de experimentación animal.

El primer acontecimiento importante en la identificación de antígenos tumor-específicos lo constituyen los trabajos de Ludwik GROSS (1943) quien repitió el mismo protocolo de estudio que cuarenta años antes llevaron a cabo CLOWES y BAESLACK, pero trabajando con una nueva línea pura de ratones, la C3H, obtenida en los Laboratorios Jackson de Bar Harbour, y que sigue utilizándose aún.

En esta "cepa certificada" de animales sin diferencias de histocompatibilidad entre los mismos GROSS provocó la aparición de sarcomas con metilcolantreno y trasplantó los tumores resultantes a ratones singénicos por inoculación intradérmica. Aproximadamente un veinte por ciento de los tumores inoculados crecieron durante algún tiempo y luego regresaron. Gross pudo demostrar entonces que estos animales en los que el tumor había regresado, eran resistentes a una inoculación posterior con la misma línea tumoral. En algunos de los ratones resistentes al sarcoma, se desarrollaron tumores mamarios (provocados por el mismo agente cancerígeno) en la frecuencia esperada. Pudo así llegar a la conclusión de que la resistencia frente al tumor era inmunológicamente específica y por deducción confirmaba la existencia de antígenos tumorales especí-

ficos.

Como quiera que el material estudiado por GROSS era limitado y había escasez de controles en sus experimentos, sus descubrimientos fueron ignorados durante mucho tiempo desde su publicación, pero posteriormente sus trabajos fueron confirmados y ampliados por otros autores. Así en 1953, FOLEY llegó a conclusiones similares tras inocular ratones cuyos tumores habían sido extirpados. Pero también los trabajos de FOLEY fueron criticados en el sentido de que pudiera existir una heterocigosidad en una raza pura responsable de que los animales no fueran genéticamente homogéneos.

Pero el escepticismo cesó cuando PREHN y MAIN (1957) demostraron que no sólo existía una inmunización del ratón contra un tumor químicamente inducido, sino que el ratón que rechaza el injerto de tumor podía aceptar un injerto de piel del animal en que el tumor fué originado. Este fué el primer experimento bien controlado en que antígenos responsables de la inmunización eran tumor-específicos, demostrándose además que diferentes sarcomas inducidos con metilcolantreno tenían antígenos individualmente distintos que carecían de reacción cruzada de acuerdo con los tests de trasplantes.

Incluso ésta clara demostración no fué universalmente aceptada, por lo que el grupo de George KLEIN

(1960) en Estocolmo transformó los experimentos con el objeto de estudiar la respuesta inmunológica en tumores autóctonos (originados por el propio huésped) del animal. Con ello la posibilidad de variabilidad genética por existencia de heterocigotos en una raza pura era eliminada. Para esto KLEIN indujo un sarcoma en la pata de un ratón; amputó la pata y trasplantó el sarcoma a otro ratón de la misma es tirpe. Tomó después células de este tumor y las irradió, administró al animal original en el que fué inducido el sarcoma varias inyecciones de células tumorales irradiadas y reimplantó el tumor en la rata que previamente había inmunizado. Se evidenció un importante grado de inmunidad.

A partir de este momento surgieron numerosos trabajos acerca de tumores inducidos por agentes químicos cancerígenos diversos (metilcolantreno, benzopireno, dimetilbenzantraceno, etc.) entre los cuales caben destacar los de BALDWIN (1955), PREHN (1960) KLEIN y cols. (1960) KOLDOVSKI (1961), OLD y cols. (1962) OLD y BOYSE (1964), KLEIN (1966 a) BALDWIN y MOORE (1969), LAW (1970), y un ex celente artículo de revisión sobre el tema de OLD y BOYSE (1966).

Los antígenos tumorales inducidos por agen tes químicos son específicos del tumor y no del agente em pleado para la inducción, pudiendo provocar la aparición de

varios tumores en un mismo animal y en lugares diferentes con la misma sustancia química cancerígena, desarrollando cada tumor unos antígenos diferentes, por lo que con los preparados antigénicos de estos tumores no podrán conseguirse fenómenos de inmunidad cruzada y no existirá por tanto resistencia a la implantación de nuevos tumores (PREHN y MAIN, 1957; KLEIN y KLEIN, 1962; OLD y cols., 1962; BALDWIN y BARKER, 1967; KLEIN 1968; BALDWIN, 1970).

Utilizando las técnicas físico-químicas descritas originalmente para el aislamiento de los antígenos de trasplante, los T.S.T.A. (antígenos de trasplante tumor específico) pueden ser aislados a partir de la membrana celular como complejos solubles polisacáridos-lípidos-proteínas y con un peso molecular del orden de 40.000-50.000 (BALDWIN, 1972). Tanto el peso molecular como la composición aminoácida son parecidos a los señalados para los antígenos de histocompatibilidad HL-A del hombre y H-2 del ratón. Además es posible demostrar mediante técnicas sensibles de radioinmunoensayo que los T.S.T.A. solubles son liberados en la circulación del huésped tras el trasplante tumoral y se mantienen en aquella mientras persiste el tumor, pero desaparecen completamente en un plazo de 48 horas tras la resección de aquel. Existen tres posibles explicaciones a esta liberación de los T.S.T.A. desde la célula

tumoral a la circulación : 1) una liberación espontánea de antígeno como resultado de los procesos metabólicos normales existentes en la superficie celular; 2) liberación a partir de células tumorales muertas o necróticas, o 3) como consecuencia de reacciones humerales o celular-mediadas acontecidas en la superficie celular (THOMPSON y cols.1973 a).

Paralelamente a los estudios de la carcinogénesis por agentes químicos, se llevaron a cabo trabajos experimentales con tumores inducidos por virus, que contribuyeron igualmente al mejor entendimiento y progreso de la inmunología tumoral.

Entre estos estudios pioneros destacan los de SJOGREN y cols. (1961,1965, 1971a, y b), en los cuales se estudió el comportamiento de los tumores inducidos por polioma virus. Se demostró que el ratón puede ser inmunizado tanto con el virus como con las células tumorales, pudiéndose establecer una buena resistencia al trasplante del tumor. Más todavía: no sólo se obtenía respuesta frente a un determinado tumor, sino que un ratón pudo ser inmunizado con células del tumor A y presentar resistencia al tumor B. En contraste con el tumor químicamente inducido, los tumores víricos presentan antígenos cruzados.

Trabajos posteriores confirmaron los ha-

hallazgos de estos estudios iniciales del grupo de SJOGREN y los estudios paralelos de HABEL (1961), Se demostró que todos los tumores víricos estudiados poseen antígenos comunes para los tumores inducidos por el mismo virus, y distintos para los tumores inducidos por diferentes virus. La antigenicidad común parece ser determinada por el virus; así, por ejemplo, los tumores inducidos por el polioma virus en ratón, rata y hamster presentan un antígeno común. Los tumores inducidos por virus afines (por ej. adenovirus 3,7,12,14 y 18) a veces tienen reactividad cruzada. (HELLSTROM y HELLSTROM, 1971 b).

Es obvio que la existencia de inmunidad cruzada frente a virus oncógenos, en animales tiene sumo interés en relación con los esfuerzos para establecer la etiología vírica de ciertos cánceres en el hombre. Incluso puede llegar a afirmar que si se puede encontrar un antígeno común entre los tumores humanos, como ha sido demostrado por KLEIN (1966 a, 1966 b) en el linfoma de Burkitt, y para los melanomas y los sarcomas osteogénicos por MORTON y MALGREM (1968), tendremos datos para suponer una etiología vírica en los mismos.

Esta afirmación que a primera vista puede considerarse válida necesita algunas aclaraciones. Primera, las células del tumor (como las células normales) pueden desarrollar nuevos antígenos en el trans

curso de la infección por el virus sin que ello indique que el virus indujo la transformación neoplásica. Por ejemplo, un ratón con leucemia inducida por virus Moloney puede desarrollar el antígeno del tumor debido a polioma, secundario a la infección por el polioma virus. Además los estudios de GOLD y FRIEDMAN (1965) en Montreal, han demostrado un antígeno común en los carcinomas de colon humanos que está ausente en el colon normal, pero que se halla en el epitelio intestinal embrionario. La presencia de semejante antígeno carcino-embrionario puede ser interpretada como un signo de derepresión genética y no implica que el virus este necesariamente involucrado.

Sin embargo, los virus se han citado como posibles agentes causales de algunos tumores espontáneos (HUEBNER y TODARO, 1969.)

Tanto los virus DNA (polioma, que producen diferentes tipos de tumores; SV-40 que da lugar a sarcomas y carcinomas; adenovirus que ocasionan linfomas y sarcomas) como los RNA (agentes del sarcoma de Rous, linfoma de Friend, linfoma de Moloney, eritroleucemia, linfoma de Rauscher, leucemia de Graffi, etc.), son oncogénicos y han sido objeto de múltiples estudios que han demostrado que presentan también T. S. T. A. asociados, (KLEIN,

1966; HABEL, 1968; HAUGTON y AMOS, 1968; LAW, 1970; MATHE, 1976).

Sin embargo todos estos antígenos tumorales viro-inducidos tienen características muy diferentes a los que aparecen en los tumores debidos a carcinógenos químicos (KLEIN y cols., 1966 a; OLD y cols., 1962).

De forma general podemos afirmar que en los tumores producidos por virus la célula neoplásica desarrolla unos antígenos comunes en todos los tumores producidos por ese virus. Es decir, los antígenos tumorales viro-inducidos son específicos del virus oncogénico y no del tumor (SMITH, 1968; HEPPNER y PIERCE, 1969) siendo idénticos aun que la localización tumoral sea diferente (hueso, piel, músculo, etc.) y aunque la implantación tumoral sea hecha a diferentes cepas de animales, teniendo gran importancia la existencia de reacciones cruzadas, de manera que con preparados antigénicos de estos tumores se puede proteger a los animales de experimentación frente a la implantación de nuevos tumores (KLEIN, 1968; LAW, 1970).

Los T.S.T.A. viro-inducidos pueden ser de dos tipos. Las células infectadas con virus oncogénicos muestran usualmente dos nuevos antígenos en su superficie que son característicos del virus infectante. Uno es el mismo que un antígeno estructural del virus (V) y el otro es

un producto del genoma viral y sólo está presente en las células infectadas (I) (ROITT, 1977). Este último se comporta como un fuerte antígeno de trasplante y genera células T citotóxicas específicas; sin embargo, no se ha resultado si este antígeno I está asociado con antígenos de histocompatibilidad o es uno de ellos o es totalmente distinto. Lo más probable es que tanto el antígeno V como el I sean responsables del ataque al tumor mediante mecanismos dependientes de anticuerpos. Todos los tumores singénicos que están inducidos por el mismo virus dan los mismos antígenos de superficie, sea cual sea la célula original; por ello la inmunización con uno de estos tumores confiere resistencia contra otros producidos por el mismo virus. Esto es una característica totalmente opuesta a lo que ocurre con los carcinógenos químicos que aún cuando produzcan dos tumores primarios en el mismo animal, cada uno tiene diferentes especificidades antigénicas y no confieren resistencia cruzada tras la inmunización.

BURNET (1970) ha propuesto un nuevo punto de vista al respecto. El carcinógeno podría haber inducido la síntesis de un nuevo antígeno (punto vista lamarkiano), en cuyo caso es difícil comprender por qué cada tumor expresa un antígeno individual a menos que cada uno de ellos represente la activación de un diferente virus onco-

génico o el producto de una nueva mutación; o bien el antígeno preexistía en unas pocas células y sólo se detectaría cuando estas células se multiplicaran (una teoría selectiva darwiniana),

Apoyándose en esta última hipótesis, BURNET postuló que regiones de ciertos antígenos de trasplante pudieran estar sujetas a un alto grado de mutación, generando una amplia variedad de especificidades. Esto puede ser tomado como complementario a la generación de la diversidad de anticuerpos en las células linfoides, que son, por lo tanto, capaces de reconocer las especificidades antigénicas de trasplante producidas de novo. No lo hacen en condiciones normales, porque sólo muy pocas células tienen cada una de las especificidades antigénicas y no son suficientes para producir una respuesta inmune (o tolerancia). Sin embargo, si una célula es seleccionada por el carcinógeno y se divide, llegando a formar un gran clon de células neoplásicas, el antígeno clonal puede ahora ser reconocido (por nosotros como un antígeno específico tumoral) y el mecanismo de supervisión inmunológica entra en juego.

Pero entretanto, los diferentes patrones de antigenicidad existentes entre los tumores inducidos por virus y por carcinógenos químicos constituyen el principal obstáculo para conseguir una teoría unificada acerca de la

etiología del cáncer.

Como vemos la mayoría de los datos experimentales encaminados a la demostración de antígenos tumor-específicos se han basado en agentes químicos o virus oncogénicos. Pero existen también tumores (sarcomas) inducidos por otros agentes como plásticos (discos de celofán, etc.) rayos X, etc., que dan lugar a la aparición de antígenos de trasplatación tumor-específicos (T.S.T.A.) según un patrón similar a lo que ocurre con los carcinógenos químicos, esto es, existe una especificidad individual de T.S.T.A. para cada tumor, si bien se comportan como inmunizadores más débiles (KLEIN y cols. 1963; HELLSTROM y HELLSTROM, 1967; CURRIE, 1974).

Por otra parte hay tumores experimentales que surgen sin aparentemente ningún estímulo carcinógeno. Ello no quiere decir que no exista, sino simplemente que es desconocido. En un principio se pensaba que los tumores espontáneos carecían de T.S.T.A., pero posteriormente se ha comprobado su presencia en una serie de ellos aunque al parecer son antígenos débiles, con escasa capacidad antigénica. (CURRIE, 1974).

Resumiendo todo lo que hemos dicho hasta aquí podemos concluir afirmando que existen una serie de datos experimentales que apoyan la hipótesis de que en los tumores provocados por virus y sustancias químicas existen unos neoantígenos que han sido denominados "antígenos de trasplante tumorespecíficos" (T.S.T.A.) que actúan y son reconocidos como verdaderos antígenos extraños por el huésped y son capaces de provocar respuestas de rechazo de intensidad variable en receptores compatibles (singénicos). Actuarían por tanto de manera análoga a los antígenos de histocompatibilidad que provocan el rechazo de injertos de un individuo a otro de la misma especie (aloinjerto). (HELLSTROM y HELLS-TROM, 1969).

El rechazo del injerto tumoral es por tanto la mejor manera de evidenciar la existencia de estos antígenos (T.S.T.A.) que se hallan en la superficie tumoral y son los responsables de los fenómenos inmunitarios de resistencia frente al tumor.

Estos antígenos aparecen gracias al proceso de transformación que sufren las células normales al pasar al estado neoplásico. La célula cancerosa es diferente a las células normales del huésped y presenta además de los antígenos de histocompatibilidad normales, unos neoantígenos específicos que caracterizan su estado neoplásico,

(PATTILLO,1976b;MITCHELL, 1976). Pero si bien de estos neo-
antígenos tumorales los T.S.T.A. son los más interesantes
desde el punto de vista inmunológico por cuanto están rela-
cionados con el rechazo tumoral, existen otros antígenos
que no pueden ser catalogados estrictamente como T.S.T.A.
dado que no sabemos si intervienen en la resistencia fren-
te al trasplante del tumor. Dichos antígenos pueden locali-
zarse en la superficie celular o en el interior de la cêlu-
la, tanto en el núcleo como en el citoplasma (MATHE,1976)
y se conocen con el nombre de "antígenos tumor-asociados"
(TAA) o "antígenos tumor-específicos" (TSA).

Estos TSA pueden detectarse mediante téc-
nicas in vitro que no nos informan acerca de si dichos
antígenos intervienen o no en el fenómeno de rechazo tumo-
ral, aunque algunos autores suponen que sí (CURRIE, 1974).

De las diversas técnicas utilizadas (inmu-
nofluorescencia, fijación del complemento, inmunodifusión,
citotoxicidad,etc.), ha sido ésta última la empleada con
más frecuencia, tanto en tumores animales (BALDWIN y EMBLE-
TON, 1971; DATTA y VANDEPUTTE, 1971; HELLSTROM y HELLSTROM
1967, 1969 a, b y c, 1970 a y b, 1971 a; HEPPNER, 1969,SJO-
GREN y BORUM, 1971; CURRIE y GAGE, 1973) como en tumores
humanos (HELLSTROM y HELLSTROM y cols.,1968 a y b, 1970 a,
b y c, 1971 a y b).

El test de citotoxicidad que vino a reemplazar el primitivo test de inhibición de colonias, ha sido ampliamente puesto en práctica por HELLSTROM y HELLSTROM y será descrito posteriormente.

La detección de anticuerpos en animales inmunizados para el estudio de estos TSA ha demostrado tener poco valor ya que depende de la concentración de determinantes antigénicos en la superficie de la célula tumoral.

Los tests de citotoxicidad complemento-dependientes en suero de animales inmunizados son útiles para la detección de antígenos en las células de tumores inducidos por la mayoría de virus RNA oncogénicos; pero con tumores químicamente inducidos los resultados son casi siempre negativos. Las células de tumores producidos por virus DNA son también resistentes a los anticuerpos citotóxicos complemento dependientes.

Sin embargo, en diversos tipos de tumores, tanto humanos (linfoma de Burkitt; KLEIN y cols., 1966 b) como animales, incluyendo los sarcomas por metilcolantreno y los tumores inducidos por virus DNA, pueden visualizarse antígenos celulares superficiales por técnicas de inmunofluorescencia (CURRIE, 1974).

En animales adecuadamente inmunizados es posible desencadenar reacciones de hipersensibilidad cutánea

retardada mediante la inyección de células tumorales (CHURCHILL, y cols., 1968). Esta técnica que se lleva a cabo normalmente en cobayas ha sido utilizada para la extracción y aislamiento de antígenos tumorales celulares libres. HOLMES y cols., (1973) aislaron una preparación relativamente pura de T.S.T.A. "soluble" de tumores químicamente inducidos en cobayas; con ello se desencadenan de manera específica, reacciones de hipersensibilidad retardada en animales adecuadamente sensibilizados. Por el contrario esta preparación antigénica no se mostró activa ni en cobayas normales ni en aquellos inmunizados con otro tipo de tumor. A pesar de la intensa purificación a que fué sometido este material antigénico no pudo conseguirse más que una mezcla de macromoléculas, pero estas técnicas representan una posibilidad para llegar al aislamiento de moléculas puras de T.S.T.A. que constituirían una importante ayuda en el estudio de la inmunidad tumoral.

THOMSON y cols. (1973 b) utilizaron una técnica de cromatografía de afinidad para la extracción de determinantes antigénicos a partir de homogenados tumorales para conseguir el aislamiento de antígenos tumorales. El procedimiento es un tanto sofisticado y esquemáticamente consiste en crear un antisuero hiperinmune frente a un sarcoma en una rata a la que se le inyectan repetidamente cé-

lulas tumorales tras amputarle el tumor. El antisuero se absorbe posteriormente con un homogenado tumoral y todo el material que queda libre es luego despreciado. Tras la disociación de los complejos inmunes puede obtenerse un material altamente purificado con actividad TSA. Esta compleja técnica ha permitido el desarrollo de un método de radioinmunoensayo para la detección y cuantificación de los TSA específicos en forma soluble y constituirá un importante paso para el estudio de la inmunidad tumoral humana si puede llegar a ser aplicada.

Podemos resumir diciendo que la presencia de antígenos en las células de tumores animales puede ser demostrada por una serie de pruebas tanto in vivo, como in vitro. Sin embargo la mayoría de estos métodos son poco sensibles y algunos poco apropiados para los problemas que deben resolverse. Son necesarias técnicas para la detección de anticuerpos dirigidos contra los TSA, ya que poseen un mayor grado de sensibilidad y reproducibilidad, y permitirían una correcta caracterización de estos antígenos igual que se ha conseguido para los antígenos de histocompatibilidad en una gran variedad de tipos celulares. Estos métodos serológicos in vitro no son útiles cuando se aplican al estudio de las reacciones tumor-específicas y en consecuencia existe la urgente necesidad de

desarrollar técnicas serológicas adecuadas, altamente sensibles capaces de detectar los TSA. Los anticuerpos frente a los TSA existen ya en el suero de animales inmunizados desde las primeras fases del crecimiento tumoral, pero desgraciadamente los métodos convencionales como la inmunofluorescencia indirecta de membrana o la citotoxicidad complemento-dependiente no son adecuados para su detección. Otras técnicas menos convencionales y más complejas como la acción de los anticuerpos séricos sobre la motilidad de las células tumorales (CURRIE y SIME, 1973) y la citotoxicidad celular-dependiente (BASHAM y CURRIE, 1974), son mucho más sensibles pero tampoco constituyen los métodos ideales.

La transformación celular maligna conlleva pues la aparición de unos neoantígenos (T.S.T.A., TSA) evidenciables por una serie de procedimientos más o menos complejos.

Sin embargo el problema de la antigenicidad tumoral no acaba aquí si se tiene en cuenta que en algunos tipos de tumores experimentales se ha detectado la presencia de antígenos tisulares normales "expresados de forma inadecuada", los cuales parecen estar en relación con el estado de diferenciación alcanzado por las células implicadas en el proceso tumoral.

Ahora bien la existencia de estos antígenos de diferenciación en la superficie de las células tumorales no significa en modo alguno que sean tumor-específicos y que tengan valor frente a una supuesta inmunoterapia. Sin em bargo su existencia puede suponer importantes implicaciones cara al mejor conocimiento de la biología de la transforma ción celular maligna, especialmente en sus aspectos genéti cos, y una precisa definición serológica de estos antígenos podría ser de considerable interés para los aspectos diag-nósticos en oncología clínica.

Por otra parte la presencia de dichos anti-genos de diferenciación "normales" en la célula cancerosa suscita la cuestión de la derepresión genética como condi ción sine qua non del proceso neoplásico maligno. Los an tígenos embrionarios podrían muy bien representar otro es tadío en este proceso de derepresión.

La posibilidad de que las células adultas puedan revertir a la producción de constituyentes antigé nicos primitivos como consecuencia de su transformación maligna, viene suscitándose ya desde hace algunos años. La teoría de la reversión antigénica establece que durante el proceso de diferenciación y organización que tiene lu gar en el transcurso de la vida embrionaria, los tejidos en desarrollo contienen de forma transitoria una serie de com ponentes antigénicos que posteriormente, en los últimos esta

díos de la gestación desaparecen y por ello normalmente no son detectables en el adulto. Sin embargo, durante los cambios de desdiferenciación y desorganización que van asociados a la transformación neoplásica, dichos componentes reaparecen como antígenos tumor-específicos, ausentes en los tejidos similares normales. La combinación de sofisticadas técnicas inmunológicas y sistemas tumorales singénicos han permitido recientemente acumular los datos suficientes para comprobar el concepto de reversión antigénica en los animales de experimentación. Por todo ello el estudio de los antígenos embrionarios ha adquirido un especial interés en oncología.

La relación existente entre antígenos embrionarios y tumorales se pone de manifiesto si tenemos en cuenta una serie de hechos descritos por algunos autores.

Así PREHN (1967) señala que la inmunización con tejido embrionario en los ratones puede proteger a estos animales frente a una inoculación posterior de células tumorales de un tumor inducido con metilcolantreno.

Por su parte BRAUN (1970) halla que las células de los ganglios linfáticos de ratones hembras multíparas, son citotóxicas frente a células de diversos tipos de sarcomas químicamente-inducidos y antigénicamente distintos. Este efecto citotóxico se limita a las célu-

las tumorales y es consecuencia de la multiparidad.

COGGIN y cols. (1970) han demostrado que la inmunización de hamsters machos con células embrionarias confiere resistencia a estos animales frente a la inoculación con células de tumores inducidos por virus SV 40, lo que sugiere que las células tumorales presentan algún componente antigénico común con las células embrionarias de estadios precoces. La edad del embrión parece ser de capital importancia para la aparición de este determinante antigénico y además estos autores demostraron que en los hamsters inmunizados con estas células del embrión precoz, aparecen anticuerpos y linfocitos citotóxicos específicos frente a un antígeno existente en las células de hamster transformadas por la inoculación del SV 40.

Los hepatomas químicamente-inducidos en el ratón sintetizan alfa₁-fetoproteína (AFP), una alfa₁-globulina que se halla normalmente en el suero y en los tejidos de los embriones de este animal, pero que está ausente de los órganos de los ratones normales adultos (ABELEV, 1971). Sin embargo, la aparición de la AFP no es específica para la transformación neoplásica de la célula ya que puede ser detectada también en el suero de ratones no cancerosos durante el proceso de regeneración hepática cuando

se ha practicado una hepatectomía parcial.

Se ha demostrado también en la rata que algunos antígenos superficiales de la célula tumoral, se hallan asimismo presentes en los tejidos embrionarios precoces del animal. BALDWIN (1972) trabajando con hepatomas inducidos por dimetilaminoazobenceno, describe además de los T.S.T.A., la existencia de antígenos embrionarios con reactividad crzada, que a diferencia de aquellos antígenos de transplantación tumor-específicos no son únicos para cada tumor sino que se presentan en la mayoría de hepatomas químicamente-inducidos así como en los tejidos de embriones precoces de animales singénicos. De forma similar THOMSON y ALEXANDER (1973) utilizando sarcomas inducidos por aquella misma sustancia química en ratas, detectaron en la superficie celular otros dos componentes antigénicos "onco-embrionarios" que no se mostraron inmunogénicos en animales singénicos. El antígeno, al que denominaron OEA₁, inmunogénico en el huesped, podría ser detectado en todos los sarcomas estudiados, pero era distinto al T.S.T.A. Así pues se probaba la existencia de un antígeno T.S.T.A. individual y específico para cada tumor, y de otro TSA común que podía estar relacionado en alguna manera con los determinantes antigénicos existentes en la superficie celular de las células embrionarias en estadios muy precoces. ALEXANDER (1972) ha dado el nombre

de "antígenos onco-fetales" (OFA) a dichos determinantes em
brionarios.

El papel de estos antígenos, si es que tienen alguno, en el fenómeno de rechazo tumoral parece poco impor
tante. La inmunización del huésped con células embrionarias produce una débil respuesta de rechazo frente al tumor en los casos de hepatomas inducidos en ratas mediante dimetila
minazobenceno, lo que confiere poco valor a los antígenos embrionarios en la reacción inmunitaria frente al tumor (BALDWIN, 1972). La débil inmunogenicidad de estos antígenos podría estar en relación con su origen intracelular, ya que existen datos que indican que se trata de proteínas so
lubles, quizás similares a la AFP, que permanecen sólo pasajera
mente en la superficie celular durante su paso desde el citoplasma al exterior de la célula. Sin embargo en algunos sistemas tumorales viro-inducidos los antígenos embrionarios pueden ser, como hemos visto anteriormente (COGGIN y cols., 1970), mucho más potentes en este sentido.

Por su parte PREHN (1969) ha especulado acerca del posible papel de las reacciones inmunológicas específicas frente a los T.S.T.A. e indirectamente su posible relación con los antígenos embrionarios, desde un punto de vis
ta filogenético.

La capacidad de rechazar células extrañas de

una manera inmunológicamente específica es al parecer deficiente en los vertebrados situados por debajo del "hagfish" (pez bruja) en la escala evolutiva. En la mayoría de mamíferos, el desarrollo de tal capacidad no aparece hasta las etapas tardías de la vida embrionaria. Los tumores malignos son raros en los animales situados a un nivel más bajo de la escala filogenética. La administración de carcinógenos químicos a los anfibios y a sus larvas raramente induce la aparición de tumores: la respuesta habitual es la aparición y desarrollo de miembros accesorios (BREEDIS, 1952). La susceptibilidad a la carcinogénesis es escasa o no existe en los animales capaces de experimentar esta regeneración de algún miembro.

Por todo ello PREHN postula que el desarrollo de un tumor maligno en los mamíferos representa "una tentativa" perversa y patológica para establecer el blastema de regeneración! Esta hipótesis podría implicar que el desarrollo de los T.S.T.A. en las células de un tumor maligno puede muy bien encontrar su equivalente filogenético, ontogénico y posiblemente inmunológico en las células del embrión que experimentan un rápido crecimiento y diferenciación.

De todo lo expuesto hasta aquí sobre la an-

·togenicidad tumoral podemos concluir diciendo que en los animales de experimentación la transformación neoplásica se acompaña de una serie de alteraciones y cambios especialmente a nivel de la superficie celular que conducen a la aparición de varios tipos de neoantígenos: los "antígenos de trasplante tumor-específicos" para cada tipo de neoplasia (caso de los tumores inducidos por carcinógenos químicos), los T.S.T.A. con reactividad crucada (característicos de los tumores viro-inducidos), los TSA que pueden ser detectados mediante diferentes técnicas in vitro, y los antígenos embrionarios que pueden surgir como consecuencia de la reexpresión de genes sólo activos normalmente durante la vida fetal.

2.2.- Antígenos en tumores humanos.

La suposición de que pueda existir en los humanos una reacción inmunitaria del huésped frente a su propio tumor de manera similar a lo que ocurre en los animales, ha conducido a la búsqueda de antígenos tumorales en los tejidos neoplásicos del hombre (GOLD,1970).

Los datos procedentes de la experimentación animal fueron obtenidos prácticamente todos mediante experimentos que estudiaban la resistencia del animal sano frente al trasplante tumoral y la ulterior transferencia de inmunidad tumoral específica mediante células linfoides. En el contexto puramente experimental, este resulta simple y proporciona abundante información, pero ninguna de estas cualidades puede ser aplicada a los estudios realizados en tumorens humanos, de los cuales disponemos de muy pocos datos obtenidos in vivo.

Así por ejemplo, el empleo de la inmunoterapia en el tratamiento del cáncer humano tiene como premisa básica la suposición de que los tumores humanos son inmunogénicos y que el huésped es capaz de reaccionar de forma inmunológicamente específica contra su propio tumor. Pero desgraciadamente a pesar de los numerosos estudios clínicos llevados a cabo, la inmunoterapia deja todavía mucho que

desear y como hemos visto anteriormente tampoco está exenta de inconvenientes. Evidentemente que un éxito inequívoco de la inmunoterapia hubiera justificado la existencia de una respuesta inmune tumor-específica en el hombre, pero ello no ha sido así.

Otro estudio acerca de la antigenicidad de los tumores humanos realizado in vivo y que si bien es interesante desde el punto de vista científico, es éticamente dudoso, fué el realizado por SOUTHAM y cols. (1962, 1965) mediante autotrasplante de células tumorales vivas en pacientes portadores de un tumor. Para ello inoculaban las células tumorales en la piel del paciente y comprobaron por una parte que 10^8 células cancerosas producen indefectiblemente la aparición de un nódulo cutáneo tumoral, mientras que 10^4 células no lo consiguen. Parece existir un intervalo crítico para la aceptación o rechazo de las células tumorales, comprendido entre valores de 10^5 a 10^7 células, y que dependería del estado inmunológico del huésped. Por otra parte estos autores comprobaron que cuando mezclaban las células tumorales que iban a ser autotrasplantadas con los linfocitos del propio paciente, la capacidad de aquellas para "prender" quedaba drásticamente disminuida. Por el contrario el plasma autólogo carecía de esta propiedad inhibitoria.

Esta serie de estudios proporcionan datos acerca de la existencia de reacciones inmunológicas celular-mediadas frente a los antígenos de las células tumorales, pero no constituyen una prueba concluyente de la existencia de los mismos. Y si bien desde el punto de vista experimental estos trabajos poseen un considerable interés, éticamente son difícilmente justificables y por consiguiente han sido abandonados.

Por todo ello han tenido que emplearse otras técnicas menos directas y que en su mayoría consisten en el estudio de las interacciones de las células tumorales con los diferentes brazos efectores de la respuesta inmunitaria. Estas técnicas, casi todas ellas *in vitro*, permiten estudiar tanto la respuesta humoral como la celular-mediada frente a los tumores.

Por otra parte la antigenicidad de los tumores humanos puede venir apoyada por otros tres hechos: 1) el estudio de aloinjertos tumorales humanos, 2) la detección de hormonas de origen tumoral, y 3) la detección de antígenos oncofetales.

Pasemos pues a tratar cada uno de estos cuatro puntos, comenzando por las técnicas de estudio de la respuesta inmunitaria en el huésped frente a los antígenos tumor-asociados.

2.2.1.- Métodos para la detección de reacciones inmunológicas tumor-específicas en el paciente canceroso.

OETTGEN y cols. (1971) han realizado una completa revisión y descripción de estas técnicas que a continuación resumimos y comentamos:

a) Reacciones de hipersensibilidad cutánea retardada frente a extractos o células tumorales. Pueden tener correlación pronóstica pero la especificidad es difícil de probar y existen riesgos de contaminación bacteriana.

b) Autotrasplante tumoral, con adición de suero o leucocitos autólogos. Los leucocitos inhiben el desarrollo del nódulo cutáneo, pero el suero no. Esta técnica es poco correcta desde el punto de vista ético.

c) Estudio de la blastogénesis linfocitaria al mezclar los linfocitos con células tumorales en cultivo. El resultado puede ser positivo en leucemias, sarcomas y otros tumores sólidos, pero este efecto puede ser "bloqueado" por factores séricos de los que más tarde trataremos. Sin embargo esta técnica no distingue entre linfocitos sensibilizados y no sensibilizados y si

bien detecta antígenos no cuantifica el estado de inmunidad.

d) Inhibición de la migración celular. Los extractos antigénicos inducen la inhibición en algunos casos, pero esta prueba es de difícil interpretación.

e) Inhibición de colonias. Los linfocitos del paciente canceroso pueden inhibir la formación de colonias por las células tumorales. Este efecto puede ser "bloqueado" por el suero del propio paciente. Esta técnica ha sido superada por el test de microcitotoxicidad.

f) Microcitotoxicidad linfocitaria. Los linfocitos del portador de la neoplasia destruyen las células tumorales de los tumores del mismo origen histológico. También esto puede ser "bloqueado" por factores séricos. Esta técnica, si bien difícil de realizar, es la más utilizada por el momento.

g) Inmunofluorescencia de membrana para la detección de anticuerpos tumor-específicos. Los resultados son positivos en algunas neoplasias como linfoma de Burkitt, carcinoma nasofaríngeo y melanoma. La especificidad y sensibilidad de esta prueba a menudo son puestas en duda.

h) Citotoxicidad del suero complemento-dependiente. Se detecta en los estadios precoces o tras la remisión de la enfermedad en casos de melanomas, neuroblastomas y sarcomas. Igual que la técnica anterior, posee poca especificidad y es poco sensible.

Pero ante esta serie de pruebas se nos plantean cuestiones acerca de la especificidad de las reacciones observadas, de la relación existente entre las diferentes pruebas, y de su relación con la evolución clínica del paciente y con una posible inmunoterapia.

- Especificidad de las reacciones observadas: ¿ se detectan antígenos tumor-específicos? ,¿ Están los mismos antígenos presentes en todos los tumores de un tipo histológico dado? ,¿ Debe de ser esta reacción totalmente tumor-específica para ser útil al paciente canceroso, o puede ser simplemente tumor-agresiva? .

- Relación entre las diferentes técnicas: ¿ cual es el grado de correlación existente entre las mismas? ,¿ detectan los mismos antígenos? ,¿ Reflejan las mismas o diferentes áreas de la respuesta inmunitaria a los antígenos tumorales? .

- Relación de los resultados obtenidos

con la clínica: ¿ existe relación entre los mismos y la resistencia del huésped frente al tumor y tienen por tanto un valor pronóstico ?, ¿ son útiles para la monitorización de los procedimientos inmunoterápicos ? .

En lo que sigue intentaremos responder, al menos en parte, a estas complejas cuestiones. Pero la utilización de pruebas in vitro para la detección de reacciones inmunitarias tumor-específicas en el hombre resulta problemática además por otra razón. Al estudiar los brazos efectores de una supuesta respuesta inmunitaria en un paciente canceroso estamos, por definición, investigando una reacción que ha fallado.

2.2.1.1.- Respuesta humoral inmunitaria frente al tumor.

La detección de los anticuerpos que reaccionan específicamente con los componentes antigénicos de la célula tumoral, constituye una tarea extremadamente compleja. En realidad los anticuerpos no son difíciles de detectar, pero probar su especificidad puede resultar sumamente difícil y en ocasiones imposible.

La inmunofluorescencia indirecta constituye la técnica más comúnmente utilizada para este fin. Para ello las células tumorales son puestas en contacto con el suero del paciente tras lo cual son sometidas a un lavado y la presencia de inmunoglobulinas fijadas por las mismas se detectan por adición de anticuerpos antiinmunoglobulina que han sido previamente marcados con fluorescencia.

A pesar de que en ocasiones esta técnica se ha mostrado poco específica y sensible, KLEIN y cols. (1966, 1971), han llevado a cabo una de las mejores aplicaciones de la inmunofluorescencia trabajando con el linfoma de BURKITT.

Las células de este linfoma crecen fácilmente en los cultivos tisulares y constituyen un excelente sistema de prueba para las técnicas de inmunofluores

cencia. En el 80% por lo menos de sueros de personas normales en Africa y América, pueden detectarse anticuerpos que reaccionan frente a células fijadas del linfoma de Burkitt. Los pacientes con un linfoma en desarrollo presentan el mismo anticuerpo pero a títulos mucho mayores. Dicho anticuerpo va dirigido contra un componente citoplasmático de las células del linfoma y presenta una especial afinidad por las células que contienen el virus de Epstein-Barr.

Pero cuando se realiza el test sobre células tumorales vivas es posible detectar en el suero de pacientes con linfoma, un anticuerpo diferente, que se fija a la membrana celular. Un anticuerpo similar es de tectable a títulos elevados en los africanos afectados de un carcinoma nasofaríngeo.

HENLE y cols. (1968) han demostrado que la aparición, en el suero de colegiales, de anticuerpos frente a las células infectadas por el virus de Epstein-Barr se asociaba al desarrollo de una mononucleosis infecciosa. Además demostraron que la presencia de dichos anticuerpos tenían un efecto protector, ya que las personas que los presentaban no desarrollaban posteriormente una mononucleosis infecciosa en la misma proporción que las personas que carecían de ellos.

Enfrentando el suero de pacientes con linfoma a células de este tumor se han descrito en estas una serie de diferentes antígenos (asociados a la membrana celular, antígenos solubles, un componente de la capsida del virus y el denominado "early antigen" EA) que pueden aparecer como consecuencia de la infección de estas células por el virus. Sin embargo el significado de los anticuerpos dirigidos frente a estos determinantes antigénicos no está claro, pero aparecen en el linfoma de Burkitt, carcinoma nasofaríngeo y mononucleosis infecciosa, habiéndose hallado en ocasiones en el suero de pacientes con enfermedad de Hodgkin y con leucemia aguda. El papel del virus Epstein-Barr en la patogénesis de estas enfermedades no está nada claro y se ha sugerido la hipótesis de que el mismo virus actúe como agente infeccioso primario común para todas ellas y que la manifestación de una u otra dependería de factores modificantes locales. Así la infección por el virus en los europeos conduce al conocido síndrome benigno de la mononucleosis infecciosa, mientras que en los niños africanos malnutridos con malaria crónica, el resultado final es el tipo de proliferación maligna de las células linfoides conocido clínicamente como linfoma de Burkitt.

Los anticuerpos frente al antígeno EA son los que parecen tener una mejor correlación con la evolu-

cción clínica del linfoma de Burkitt, ya que se detectan fácilmente en el suero de portadores de este tumor y de carcinoma nasofaríngeo, pero tienden a desaparecer en los pacientes en que el linfoma experimenta una regresión a largo plazo. Estos anticuerpos tampoco se detectan en el suero de personas normales.

El papel de los diferentes tipos de anticuerpos existentes en el suero de los pacientes con linfoma en la biología de esta enfermedad permanece oscuro hasta el momento actual. En realidad pueden tener una acción citotóxica o de inhibición del crecimiento sobre células tumorales, pero también es posible que favorezcan el desarrollo de la neoplasia. En otras palabras, pueden proteger a las células "diana" tumorales frente a los linfocitos citotóxicos; pero este hecho paradójico puede aplicarse también, como veremos posteriormente, a otros tipos de neoplasia.

También en el melanoma maligno humano se han aplicado las técnicas de inmunofluorescencia indirecta y han sido descritos antígenos característicos de forma independiente por diferentes autores (MORTON y cols.1968; LEWIS, y cols.1969,1972). Por otra parte los estudios realizados con células de melanomas fijadas han revelado la existencia de como mínimo dos antígenos citoplasmáticos

comunes que al parecer no se encuentran en las células cu
táneas normales. En la mayoría de pacientes con melanoma
y en aproximadamente el 20% de sueros normales, se detec-
tan anticuerpos frente a estos antígenos. El estudio me-
diante células vivas ha demostrado la presencia de antígen
os en la membrana celular y la existencia de anticuerpos
frente a los mismos parece estar en correlación con el es
tado clínico, de manera que sólo se detectan en los casos
de enfermedad localizada (LEWIS y cols., 1969).

Es obvio que un antígeno localizado en la
membrana celular constituye una "diana" más asequible a
las reacciones inmunitarias del huésped que los antígenos
intracelulares. El significado de los anticuerpos frente
al citoplasma celular no está claro y es posible que su
aparición sea simplemente consecuencia de la muerte celul
ar sin estar relacionados en absoluto con la resisten-
cia del huésped frente al tumor.

WOOD y MORTON (1968) han demostrado tam-
bién por inmunofluorescencia indirecta la existencia de
anticuerpos frente a antígenos comunes en el sarcoma human
o. Ello se confirmó posteriormente por técnicas de fija-
ción del complemento y de citotoxicidad sérica complemento-
dependiente.

Ya hemos dicho antes que demostrar la espe

pecificidad tumoral para cualquier tipo de anticuerpo detectado en el suero de un paciente canceroso constituye un complejo problema. Pero, por otra parte, desde hace algún tiempo se conoce el hecho de que los pacientes con enfermedades malignas tienden a presentar una elevada incidencia de autoanticuerpos frente a los tejidos normales en su suero (WHITEHOUSE y HOLBORW, 1971). Mediante técnicas de inmunofluorescencia estos autores detectaron autoanticuerpos en un 70% aproximadamente de pacientes cancerosos, entre los que se incluyen anticuerpos antinucleares, anticuerpos frente a las células gástricas parietales y frente al músculo liso.

2.2.1.2.- Respuesta celular-mediada frente a los tumores humanos,

La resistencia frente a las células tumorales singénicas en la experimentación animal constituye un fenómeno comparable al de la inmunidad en el trasplante de un aloinjerto, dado que en ambas situaciones nos hallamos frente a una reacción inmunitaria celular del tipo de la hipersensibilidad retardada, la cual es susceptible de ser transferida por medio de las células linfoides pero no a través del suero.

a) Hipersensibilidad cutánea retardada.

Algunos autores han realizado una valoración de la hipersensibilidad retardada a través de tests cutáneos utilizando extractos o células tumorales autólogos como antígeno. HUGUES y LYTTON (1964) y STEWART (1968,1969) estudiaron diversos tipos de tumores humanos hallando una incidencia de reacciones positivas del 25% pero esta capacidad de reacción frente al antígeno tumoral no guarda una buena correlación con el estado clínico del paciente. Por otra parte la especificidad de las reacciones era baja, ya que aparecieron también positividades frente a algunos extractos tisulares empleados como control. Además la fá-

cil contaminación bacteriana de los extractos tumorales puede falsear los resultados observados.

FASS y cols. (1970 a, 1970b,) realizaron esta prueba en una serie de pacientes con linfoma de Burkitt inoculando extractos de membrana celular de células tumorales autólogas y de linfocitos normales. En este caso hubo una correlación entre la capacidad de reacción y el estado clínico y pronóstico. Antes del tratamiento sólo uno de los doce pacientes presentó una reacción positiva, mientras que por el contrario, siete de los doce pacientes estudiados durante la fase de remisión clínica de la enfermedad, manifestaron reacciones positivas frente a los extractos tumorales autólogos. Los pacientes con reacción positiva permanecieron en fase de regresión durante largo tiempo, mientras que en cuatro de los cinco pacientes negativos se produjo la recidiva precozmente. La mayoría de los pacientes que reaccionaron frente a sus extractos tumorales, no manifestaron ningún tipo de respuesta a los extractos de sus propios linfocitos. Es probable por tanto que lo que se detecta fuera una respuesta a los antígenos tumor-específicos. El principal inconveniente de este estudio fué que no se controló estrictamente la concentración proteica de los

extractos, lo cual podría explicar algunas de las variaciones en la capacidad de respuesta. En un estudio posterior, también con pacientes afectados del linfoma de Burkitt, el mismo grupo de autores llevaron a cabo esta prueba pero controlando ahora la concentración de proteínas (BLUMING y cols. 1971). De nuevo hubo relación con la evolución clínica; los pacientes con reacciones positivas se mantuvieron en fase de remisión de la enfermedad durante un período de tiempo significativamente más largo que los pacientes con reacción negativa. Siete paciente con positividades durante la fase de remisión, presentaron una reacción negativa cuando fueron estudiados de nuevo al ~~aparecer~~ la recidiva. Los extractos de linfocitos normales con un contenido igual de proteínas no indujeron ninguna positividad en los pacientes con enfermedad activa. Sin embargo 7 de los 37 pacientes estudiados en la fase de remisión, mostraron reacciones positivas tanto al extracto tumoral como al control. No está clara la naturaleza de estas reacciones frente a los extractos de linfocitos aparentemente normales, pero es posible que estuvieran dirigidas contra antígenos de histocompatibilidad.

Posteriormente se ha llevado a cabo esta prueba con extractos alogénicos de linfoma de Burkitt (ZIEGLER, 1973) y el índice de positividades es muy bajo,

lo cual resulta sorprendente si se tiene en cuenta la probable asociación del virus Epstein-Barr con el linfoma de Burkitt y la existencia de antígenos de membrana comunes detectados por inmunofluorescencia (KLEIN, 1971) como se ha visto anteriormente.

En pacientes con leucemia aguda se han observado también reacciones cutáneas positivas frente a extractos de membrana celular de células autólogas (OREN y HERBERMAN, 1971; LEVENTHAL y cols. 1972). La reactividad cutánea mostró una estrecha correlación con el estado clínico de la enfermedad: 18 de 23 pacientes estudiados en fase de remisión fueron positivos, mientras que 16 de 22 pruebas practicadas en casos de recidiva fueron negativas. En dos pacientes en los que se realizaron los tests cutáneos de forma seriada, la reactividad cambió de positiva a negativa y luego de nuevo a positiva coincidiendo con la evolución de los pacientes que pasaron de una fase de remisión a la recidiva para volver a mejorar posteriormente. Posteriormente se comprobó (HERBERMAN, 1973) que más de la mitad de 18 pacientes en los que se realizó la prueba con extractos celulares neoplásicos alogénicos, reaccionaron positivamente, lo que indica que en la leucemia aguda pueden existir antígenos tumor-asociados comunes, e incluso se ha intentado preparar en forma

soluble los antígenos asociados a la leucemia, tratando los extractos de membrana celular con papaina (HOLLINSHEAD y HERBERMAN, 1973), pero la especificidad conseguida ha sido escasa.

También se han detectado por medio de estos tests cutáneos, antígenos tumor-asociados en el cáncer intestinal (HOLLINSHEAD y cols. 1970; HERBERMAN y cols. 1971). La inyección de las fracciones solubles (obtenidas por sonicación a baja frecuencia) de los extractos de membrana de células cancerosas intestinales y fetales, provocaron reacciones positivas en pacientes autólogos y alógenos con cáncer de colon. En cambio, pacientes afectados de otros tipos de neoplasias no reaccionaron frente a estas fracciones antigénicas, y fracciones comparables obtenidas a partir de mucosa intestinal normal siempre dieron reacciones negativas. Tras la separación de Sephadex G-200, se pudo comprobar que aquellas fracciones reactivas contenían el antígeno carcino-embriónico de Gold, que describiremos posteriormente, y al principio se pensó que este antígeno pudiera ser idéntico al que inducía la reacción cutánea. Sin embargo con un mejor fraccionamiento mediante electroforesis en gel de poliacrilamida, se pudieron separar ambos antígenos (HOLLINSHEAD y cols., 1972a).

HELLSTROM y cols. (1970 c) detectaron también un antígeno carcinoembriónico en el cáncer intestinal mediante su test de inhibición de colonias. Sería interesante comprobar si este antígeno es el mismo que el hallado por HERBERMAN y cols., o bien se trata de un tercer tipo de antígeno carcinoembrionario en las neoplasias intestinales.

También en el melanoma maligno se ha estudiado la hipersensibilidad cutánea retardada frente a extractos tumorales. En un primer estudio de FASS y cols. (1970 c) llevado a cabo en Uganda, se observaron reacciones positivas a extractos tumorales autólogos en tres pacientes con enfermedad localizada. En cambio los extractos de linfocitos autólogos resultaron negativos, por lo que se pensó que el antígeno detectado era tumor-específico. Sin embargo, en un estudio posterior, pacientes de aquella misma nación fueron inoculados con extractos autólogos de piel normal y de melanoma (BLUMING y cols., 1972). Seis de los nueve pacientes que reaccionaron positivamente frente al extracto tumoral, lo hicieron también con los extractos cutáneos normales, lo que indica que al menos parte de las reacciones observadas iban dirigidas contra antígenos de histocompatibilidad, probablemente presentes en la piel nor-

mal y ausentes en los linfocitos. Este hecho señala la necesidad existente de disponer de unos adecuados extractos tisurales de control lo más parecidos posible al tejido tumoral a fin de distinguir entre antígenos tumor-asociados y antígenos de histocompatibilidad. Este inconveniente constituye una de las principales objeciones a esta técnica.

BLACK y LEIS (1971) estudiaron las reacciones obtenidas en pacientes con cáncer de mama, las cuales reaccionaron positivamente frente a su propio tejido canceroso pero no al tejido mamario normal. Se halló cierta correlación con la evolución clínica de la paciente, obteniéndose positividades con más frecuencia en las pacientes que habían sido operadas con anterioridad a 30 días; las pacientes con extensa invasión tumoral reaccionaron más débilmente.

b) Tests de inhibición de colonias y de citotoxicidad.

Estas pruebas, descritas por HELLSTROM y HELLSTROM, constituyen seguramente el procedimiento empleado con más frecuencia para el estudio de la inmunidad dependiente del linfocito y dirigida específicamente contra los antígenos tumorales.

El principio básico de estos tests radica en enfrentar células tumorales sembradas en placas de Petri a los linfocitos inmunizados frente a los antígenos tumor-específicos, para poder observar si se produce una inhibición de la formación de colonias de células tumorales (HELLSTROM, 1967) o una destrucción de dichas células (HELLSTROM y HELLSTROM, 1971 a) por acción linfocitaria. Si bien inicialmente se utilizaba la prueba de inhibición colonial, la posterior descripción y desarrollo del test de microcitotoxicidad ha desplazado a aquel primer procedimiento. Ambas pruebas permiten también investigar la existencia de factores séricos que pueden interferir la inmunidad antitumoral celular-mediada y favorecer así el crecimiento de la neoplasia. De ello trataremos más ampliamente al describir los posibles mecanismos del "escape" tumoral.

Como hemos citado anteriormente, estas técnicas fueron aplicadas en principio al estudio de tumores en animales, pero más tarde se investigaron también diversos tipos de neoplasias humanas. La primera de ellas fué el neuroblastoma (HELLSTROM y HELLSTROM y cols., 1968 a, 1970 a) y se eligió este tumor por dos razones: sus células crecen fácilmente in vitro con una morfología carac

terística y porque el neuroblastoma pertenece al reducido grupo de tumores en los que está comprobado que ocasionalmente puede regresar de forma espontánea, lo cual indica que al menos alguno de ellos puede ser inmunogénico.

Se comprobó que los linfocitos de los pacientes cancerosos inhibían el crecimiento de las células del neuroblastoma, pero los mismos resultados con estas técnicas se hallaron en diversos tipos de tumores diferentes como carcinomas de colon (HELLSTROM y HELLSTROM y cols., 1970 b, 1970 c), carcinomas nasofaríngeos (CHU y cols., 1967), neoplasias de vejiga urinaria (BUBENIK y cols., 1970) cáncer de mama (HELLSTROM y HELLSTROM y cols. 1971 a), cáncer de pulmón (HELLSTROM y HELLSTROM y cols. 1971 a), neoplasias renales (DIEHL y cols., 1971) testiculares, de endometrio y de ovario (HELLSTROM y HELLSTROM y cols., 1971 a), melanomas malignos (JAGARLAMOODY y cols. 1971; FOSSATI y cols. 1971), linfomas y sarcomas (SINKOVICS y cols., 1971).

Los linfocitos se mostraron citotóxicos tanto sobre las células tumorales del propio paciente, como sobre las de tumores del mismo tipo histológico procedentes de otros enfermos, lo que sugiere la posibilidad de

que cada una de estas neoplasias presenten unos antígenos tumor-asociados (específicos ?) comunes para cada tipo histológico. Por el contrario los cultivos de fibroblastos normales o de células tumorales de un tumor histológicamente distinto, no era inhibidos. Sin embargo, en diversas ocasiones estos autores no pudieron establecer de forma definitiva la especificidad de estas reacciones dado que no se disponía de cultivos de tejidos normales del mismo tipo histológico.

La acción citotóxica pudo observarse tanto en pacientes con la enfermedad en fase activa como en fase de remisión (HELLSTROM y HELLSTROM, y cols., 1971 a). En cambio hasta cierto punto parecía guardar relación con la evolución clínica del paciente, la existencia en su suero de factores con acción bloqueante (HELLSTROM y HELLSTROM, y cols., 1971 b) o desbloqueante (HELLSTROM y HELLSTROM y cols., 1971 c) del linfocito citotóxico.

Son necesarios más estudios, incluyendo la práctica seriada de estas pruebas en los pacientes durante largos períodos de tiempo, a fin de determinar su grado de correlación con la clínica. Sería interesante asimismo averiguar el valor de estos tests para un posible inmunodiagnóstico del cáncer, para lo cual es necesario

examinar un importante número de controles que permitan diferenciar fácilmente las reacciones observadas en el paciente canceroso.

Disponemos de pocos estudios hasta el momento realizados en este sentido. HELLSTROM y HELLSTROM y cols., (1971 a) observaron que en algunos tipos de tumores los linfocitos de sujetos normales controles carecían de acción citotóxica. Sin embargo, en casos de neoplasias de vejiga urinaria, los linfocitos de algunos controles ejercieron un marcado efecto inhibitorio sobre las células tumorales, en comparación con otros controles (BUBENIK y cols., 1970). Por su parte SINKOVICS y cols. (1971) comprobaron que los linfocitos de personas normales adquirirían capacidad citotóxica tras la incubación con células neoplásicas en cultivo.

Todos estos tests de citotoxicidad descritos hasta aquí utilizan células tumorales en cultivo y requieren como mínimo dos días de incubación con los linfocitos inmunes. CANTY y WUNDERLICH (1970) han descrito una prueba cuantitativa in vitro que estudia las reacciones celulares inmunes de tipo citotóxico frente a células tumorales "frescas" o mantenidas en estado viable por congelación. Para ello las células

"diana" son marcadas con Cr^{51} e incubadas con los linfocitos inmunes durante 4 horas solamente. Este procedimiento se ha utilizado en casos de leucemia (LEVENTHAL y cols., 1972) linfosarcoma y enfermedad de Hodgkin (HERBERMAN, 1973).

c) Estudio de la blastogénesis linfocitaria.

La estimulación del linfocito por medio de extractos o células tumorales constituye otra técnica útil en el estudio de la inmunidad celular frente a los antígenos tumor-
asociados.

El linfocito T parece ser la célula mediadora más importante de la inmunidad celular. Tras reaccionar con el antígeno el linfocito T está implicado directa o indirectamente en la destrucción del tumor o de cualquier otra célula que presente dicho antígeno (OETTGEN y cols., 1971). Pero además de destruir las células "diana" el linfocito que ha sido estimulado por el antígeno experimenta una transformación morfológica ("blástica") y mitosis, que se acompañan de un aumento de la síntesis del material intracelular (ácidos nucleicos), fenómeno que puede ser cuantificado mediante la incorporación de precursores radioactivos (LAWRENCE y LANDY, 1969), como por ejemplo timidina tritiada. Así se ha demostrado en dife-

rentes tipos de neoplasia que los linfocitos del paciente canceroso experimentan una transformación a linfoblastos e incorporan importantes cantidades de timidina cuando son incubados con extractos o células tumorales autólogas.

Utilizando células neoplásicas "frescas" o congeladas como estímulo antigénico se han comprobado reacciones psotivas en casos de linfoma de Burkitt (STJERNSWARD y cols., 1968), sarcoma (VANKY y cols., 1971 a) y carcinomas renales (STJERNSWARD y cols. 1970 a) pulmonares (STJERNSWARD y cols., 1970 b), y testiculares (STJERNSWARD y CLIFFORD, 1970). Sin embargo en estos estudios no se observó una buena correlación entre el test de transformación linfoblástica y el estado clínico del paciente. La especificidad de la prueba se evidenció en el caso del carcinoma renal al no ser estimulados los linfocitos por el tejido renal normal.

El test de estimulación linfocitaria se ha practicado también mediante extractos de tumores sólidos, habiéndose comprobado en una serie de 56 casos de neoplasias diversas, que los siete pacientes que presentaron una respuesta positiva, tuvieron un pronóstico relativamente bueno (SAVEL, 1969). FISCHER y cols., (1969)

mezclaron extractos de tejido neoplásico mamario con linfocitos autólogos y alogénicos de pacientes afectas de dicha neoplasia. Dos de las cinco interacciones autólogas, y ocho de las doce alógenicas practicadas, resultaron positivas; sin embargo estas últimas pudieron haberse debido a los antígenos HL-A, dado que cuatro de los veinte controles normales fueron también positivos. De forma global podemos decir que en todos estos estudios llevados a cabo mediante extractos tumorales, no queda bien establecida la especificidad de las reacciones observadas, dado que no se compararon los resultados con los que se hubieran obtenido con la estimulación de los linfocitos mediante extractos de tejidos normales.

Los linfocitos "normales" de pacientes con leucemia aguda en fase de remisión de la enfermedad pueden ser estimulados por células blásticas viables que han sido mantenidas en estado de congelación (FRIDMAN y KOURILSKY, 1969; VIZA y cols. 1969; POWLES y cols., 1971; LEVENTHAL y cols., 1972). La especificidad de esta interacción se comprobó incubando los linfocitos con células de la médula ósea de pacientes en remisión de la enfermedad y con las de otros que presentaban recidi-

vas . LEVENTHAL y cols. señalan que la estimulación antigénica fué mucho más intensa en el caso de la médula que contenía células blásticas. Sin embargo estos autores señalan una falta de correlación con la clínica, aunque hubo concordancia con el momento en que había finalizado la quimioterapia; la respuesta máxima fué a los 16-20 días de acabada la terapéutica.

Para acabar digamos que si bien esta prueba detecta la existencia de antígenos en la superficie de las células tumorales, no distingue entre linfocitos sensibilizados y no sensibilizados, o sea, entre respuesta inmunitaria primaria y secundaria. Por ello no puede proporcionarnos ninguna información específica acerca del estado inmunitario del paciente frente a su propio tumor. Pero VANKY y cols. (1971 b) señalan que constituye una técnica útil para la detección de factores bloqueantes en el suero de los pacientes cancerosos.

d) Test de inhibición de la migración celular.

Cuando los linfocitos sensibilizados entran en contacto con el antígeno específico adecuado, liberan una serie de mediadores químicos conocidos con el nombre de

"linfoquines" entre los que se encuentra una sustancia capaz de inhibir la migración de los macrófagos y de los leucocitos.

Dado que es una técnica de difícil interpretación y la cuantificación de la respuesta celular-mediada es prácticamente imposible con ella, esta prueba ha tenido poca aplicación y en los casos en que se ha practicado los resultados han sido muy variables.

ANDERSON y cols. (1969, 1970) aplicaron dicha técnica para detectar la existencia de linfocitos sensibilizados en el cáncer de mama. Los extractos de tejido neoplásico mamario inhibieron la migración de los leucocitos autólogos en 8 de 22 pacientes. La especificidad de la reacción se comprobó porque los extractos tumorales no inhibieron la migración de los leucocitos de personas normales y a su vez el tejido mamario sano (autólogo) no indujo la migración de los leucocitos de la paciente. No hubo correlación con el estadio clínico de la enfermedad.

Otros autores (WOLBERG y cols., 1971; ROSENBERG y cols., 1971) han hallado también inhibición de la migración celular en el cáncer de mama.

SEGALL y cols. (1972) aplicaron la prue-

ba en 57 pacientes afectos de neoplasias diversas hallando un 58% de positividades, pero los autores señalan la posibilidad de que hubieran reacciones histológicas cruzadas y no existió correlación con la clínica.

Por su parte COCHRAN y cols. (1973) investigaron 55 pacientes con melanoma maligno, 73 cánceres de mama y 162 controles normales. Señalan también la existencia de reacciones cruzadas de tipo histogénico, pero hablan de una correlación con los hallazgos clínicos dado que los pacientes que presentaban metástasis, en general no respondieron a esta prueba.

e) Test de movilidad electroforética de los macrófagos.

Emparentado con la prueba anterior pero más reciente y mucho más sofisticado, este test ha sido descrito por sus creadores FIELD y CASPARY como un test general para malignidad (1970). Estos autores señalaron que los linfocitos de pacientes cancerosos podían ser estimulados por un "factor encefalitogénico" (una proteína derivada de la mielina humana, que puede ser obtenida de un cerebro humano cuatro horas post-mortem) de manera que al ser incubados con dicho factor liberan una sustancia denominada "enlentecedora de los macrófagos", ya que disminuye la movilidad

electroforética de los macrófagos del cobaya. Según DUMONDE (1970) esta sustancia podría ser idéntica al factor de inhibición de la migración de los macrófagos. La sensibilización de los linfocitos a esta proteína básica cerebral humana prodría explicarse por la existencia de una reactividad cruzada con un antígeno tumoral localizado en la superficie de todas las células neoplásicas (FIELD y CASPARY, 1972).

No se ha probado la especificidad histogénica de esta prueba y si bien en ocasiones se ha mostrado en contradicción con los resultados obtenidos por otros investigadores estudiando la actividad citotóxica de los linfocitos sobre las células tumorales, y los propios FIELD y CASPARY (1970) han hallado positividades con su test en procesos no malignos tales como sarcoidosis, lupus eritematoso diseminado, algunas enfermedades nerviosas y tuberculosis, estos autores afirman que esta prueba es mucho más sensible que ninguna otra descrita y que detectan una reacción inmunológica especifica no detectable por los demás medios convencionales; sería un test general para malignidad.

La interpretación de esta prueba, que según sus autores no se modifica por la acción de la te-

rapéutica persistiendo la sensibilización incluso años después del tratamiento de la neoplasia, puede resumirse como sigue: si no hay inhibición de la movilidad electroforética de los macrófagos, muy probablemente no existe ninguna neoplasia; si se produce la inhibición hay que estudiar adecuadamente al paciente.

PRITCHARD y cols. (1972) han empleado de manera satisfactoria este test en diversos tipos de neoplasia, y KLAUSCH y cols. (1974) la han aplicado en el cáncer ginecológico estudiando 39 pacientes afectadas de neoplasias de cuello uterino, endometrio, ovario y vagina en diferentes estadios y en todos los casos hallaron valores de inhibición superiores a los de las pacientes control. Ni la cirugía ni el tratamiento radioterápico modificaron los resultados.

A pesar de estos resultados esta prueba no está exenta de inconvenientes. En primer lugar no informa acerca de la localización de la neoplasia y además dada su complejidad no es útil como método de screening. Por otra parte el hecho de que la sensibilización de los linfocitos persista largo tiempo, invalida la utilidad de este test en el diagnóstico de las recidivas.

f) Interrelación entre las diferentes pruebas.

De las tres cuestiones que nos hemos planteado al principio acerca de los métodos para la detección de reacciones inmunológicas frente a antígenos tumor-específicos en el paciente canceroso, las referentes a la especificidad de las reacciones observadas y a su correlación con la evolución clínica del paciente, han sido ya comentadas a lo largo de esta exposición. Nos queda por responder, o intentarlo al menos, una tercera, ¿ existe correlación entre estos métodos ?.

Actualmente disponemos de datos obtenidos de la experimentación en sistemas no tumorales que indican que los diferentes métodos de estudio de la inmunidad celular pueden estar valorando respuestas a especificidades antigénicas distintas, o pueden reflejar la participación de efectores diferentes de la respuesta inmune (CHAPARAS y cols., 1970; ROCKLIN y cols., 1970).

Estudiando la inmunidad celular en la leucemia aguda LEVENTHAL y cols. (1972) hallaron una sorprendente y notable falta de correlación entre los resultados obtenidos mediante tres pruebas diferentes: citotoxicidad celular, estudio de la hipersensibilidad cutánea retardada y test de transformación linfocítica. Y de

las tres, sólo las pruebas cutáneas guardaron correlación con la evolución clínica del paciente. Al porqué de estas discrepancias no podemos, o no sabemos contestar.

Según HERBERMAN (1973), a fin de obtener mayor y más útil información para otros tipos de tumor y para otros métodos de estudio de la inmunidad celular, sería necesario realizar dos o más tests de forma paralela en el mismo material clínico a fin de identificar cual es la prueba o pruebas que mejor reflejan in vivo el estado de resistencia del huésped frente al tumor. Esto es lo que hemos llevado a cabo nosotros en el cáncer ginecológico, tal como expondremos en el apartado de material y métodos.

Añade HERBERMAN que la consecución de estos objetivos podría constituir la base para establecer una inmunoterapia adecuada y monitorizar los efectos de la misma.

Por otra parte, como señala CURRIE (1974) existe una considerable disparidad entre los resultados obtenidos por el estudio de la inmunidad humoral por un lado y la inmunidad celular por el otro. En nuestras pacientes hemos practicado un estudio de ambos tipos de inmunidad.

2.2.1.3.- Antisueros xenogénicos en la detección de antígenos tumor-específicos.

Otra posibilidad para la detección de antígenos específicos en las células tumorales humanas, es la preparación de antisueros xenogénicos (xenogénico se refiere a la relación entre individuos de diferentes especies). Desde luego, no existe una garantía de que el animal de experimentación "reconozca" los mismos determinantes antigénicos que son inmunógenos en el paciente, y de alguna manera debe aislarse el anticuerpo frente al débil antígeno tumoral de entre los demás anticuerpos que se desarrollan frente a todos los componentes tisulares normales mucho más potentes.

Para obviar este problema se han desarrollado algunos modelos experimentales. Así por ejemplo si exponemos a un conejo, durante el período neonatal, al epitelio colónico humano normal, el animal se hace tolerante frente a ese tejido, y una posterior inmunización con tejido de un carcinoma de colon del mismo paciente debe de llevar teóricamente al desarrollo de anticuerpos específicos frente a los antígenos tumor-asociados; sin embargo estos antígenos así detectados, no tienen que ser necesariamente inmunogénicos en el pa-

ciente.

Esta técnica es la que emplearon precisamente GOLD y FREEDMAN (1965 a) para detectar un "antígeno" en las neoplasias de colon humanas, antígeno que se hallaba presente también en el intestino del feto humano en las primeras etapas de la gestación. Denominaron a esta macromolécula detectada antígeno carcinoembriónico (CEA). Como veremos posteriormente este CEA posee un interés considerable en el inmunodiagnóstico de algunas neoplasias, pero es poco o nada inmunogénico en el huésped.

FINK y cols. (1964) aplicaron este método al estudio de las leucemias. Estos autores detectaron partículas virus-like en el plasma de leucémicos y tras aislarlas, inmunizaron con ellas a conejos. El antisuero xenogénico del animal se enfrentó luego con leucocitos de los enfermos comprobándose que reaccionaron en más de la mitad de los casos.

Otro tipo de procedimiento experimental similar consiste en la inmunización de animales con tumores humanos y absorber el antisuero resultante con el tejido normal correspondiente. Teóricamente cualquier tipo de anticuerpo que persista en el suero tras la absorción, debe de estar dirigido contra algún componen

te tumor-específico. A pesar de que resulta difícil probar la especificidad del antisuero, esta técnica ha sido aplicada por algunos autores, como METZGAR y cols.(1972) en las leucemias y GHOSE y cols.(1972) y CARREL y THEILKAES (1973) en los melanomas malignos. Los primeros ensayaron el suero antimelanoma como medio terapéutico y los segundos enfrentaron el antisuero a la orina de los pacientes con melanoma hallando una elevada incidencia de resultados positivos; con ello demostraban que los antígenos específicos de esta neoplasia se eliminan por la orina y que la prueba posee una elevada especificidad dados los escasos falsos negativos que se obtuvieron.

2.2.2.- Aloinjertos tumorales humanos.

Es obvio que la existencia de injertos tumorales alogénicos no es un fenómeno corriente. Sin embargo existen al menos dos situaciones clínicas en que las células cancerosas contienen antígenos de histocompatibilidad extraños al huésped: el coriocarcinoma y la circunstancia en que de forma accidental se trasplanta un tumor de una persona a otra.

El mejor ejemplo de interacción entre tejid^os neoplásicos alogénicos y los mecanismos defensivos del huésped, lo constituyen dos casos descritos en los que fueron trasplantados a personas afectadas de enfermedades renales crónicas, riñones que contenían metástasis de un carcinoma bronquial. En ambos casos se produjo un incremento masivo del tamaño del tumor en el riñón trasplantado así como una diseminación metastásica varios meses después del injerto; todo lo cual tuvo lugar mientras se efectuaba el tratamiento inmunosupreso para evitar el rechazo. En uno de los pacientes las metástasis eran muy importantes cuando se descubrieron a los cinco meses de la intervención y la muerte sobrevino poco después. En cambio en el otro paciente el cese a tiempo del tratamiento inmunosupresor dió lugar a

un rechazo del riñón trasplantado, pero las metástasis persistieron. Sin embargo, cuando este riñón rechazado, que contenía una gran masa tumoral, fué extirpado, desaparecieron gradualmente todas las lesiones metastásicas residuales existentes. Pero es que además no hubo ninguna manifestación de recidiva tumoral cuando se efectuó con éxito un segundo trasplante en este enfermo y a pesar de que se le sometió a la pauta completa de tratamiento inmunosupresor (WILSON y cols., 1968). Esta destrucción total del tejido tumoral injertado parece pues haber sido completa por acción del sistema inmunitario del huésped durante un período de funcionamiento normal relativamente corto, pero solamente después de que la principal masa tumoral fuera extirpada. Esto último no debe olvidarse cuando se piense aplicar una inmunoterapia, hecho sobre el que ya insistimos anteriormente.

Una relación huésped-tumor parecida a la anterior es la que tiene lugar en una mujer portadora de un coriocarcinoma. El coriocarcinoma es un proceso maligno que suele desarrollarse tras una mola hidatiforme, pero en ocasiones puede aparecer en el transcurso de una gestación normal. El tumor prolifera, inva

de la pared uterina y metastatiza profusamente. El intervalo entre el inicio de la gestación y la manifestación clínica de coriocarcinoma oscila normalmente entre 4 y 6 meses, si bien puede variar desde días a años.

El tumor es de origen placentario por lo que contiene tanto componentes de origen materno como paterno. Debido a la presencia de material genético paterno, incluyendo los antígenos de histocompatibilidad, el tumor constituye realmente un aloinjerto. Por ello este tipo de neoplasia nos proporciona un ejemplo magnífico de tumor humano que presenta antígenos de trasplante extraños para el huésped, pero que no por esto es necesariamente rechazada. Claro que no debemos olvidar que la falta de tratamiento en el coriocarcinoma se acompaña de un elevado índice de mortalidad.

Por otra parte se han descrito una serie de regresiones de metástasis de coriocarcinoma (EVERSON y COLE, 1966), tras la histerectomía y consiguiente extirpación de la masa tumoral principal; además los coriocarcinomas son muy sensibles a agentes quimioterápicos tales como el metotrexato. Una quimioterapia adecuada consigue un importante índice de supervivencia a los 5 años y no es descabellado pensar que en muchas

ocasiones tanto la extirpación del tumor primitivo como la quimioterapia sean necesarios para desequilibrar al máximo y de forma pasajera la relación huésped-neoplasia en favor del primero. Cuando esto ocurre, una respuesta inmunitaria eficaz puede dar lugar al rechazo del aloinjerto tumoral, hecho que pudo no haberse producido de mantenerse en el huésped los tejidos neoplásicos en su totalidad. Así pues, cuando evaluamos los resultados de los procedimientos terapéuticos o diagnósticos obtenidos en el caso de un coriocarcinoma debe recordarse que este tumor es inmunológicamente atípico y las conclusiones a las que lleguemos no son necesariamente aplicables a otros tipos de neoplasias.

2.2.3.- Hormonas de origen tumoral.

En realidad la inclusión de algunas hormonas a forma de antígenos tumor-asociados dentro del capítulo de antigenicidad de las neoplasias responde más a una razón semántica que a una indicación de la actividad funcional, ya que si bien se detectan mediante el empleo de antisueros heterólogos no existen pruebas concluyentes de que dichas hormonas se comporten de manera parecida a los antígenos tumorales o de que sean inmunogénicas para el huésped. Por ello trataremos más ampliamente esta cuestión en el capítulo de inmunodiagnóstico al referirnos a los "biological markers" ("tumor marker substances" o sustancias indicadoras de la existencia de un tumor).

Además del interés que posee como aloinjerto tumoral humano, el coriocarcinoma es uno de los mejores ejemplos de neoplasia secretora de un "biological marker" clínicamente útil para el screening de individuos de alto riesgo de presentar el tumor y para la monitorización del curso de la enfermedad. Estas aplicaciones han sido posibles gracias a la detección mediante radioinmunoensayo de mínimas cantidades de hormona

gonadotrófica humana (HCG) secretada por el tumor y cuya presencia es demostrable en la orina, plasma y otros líquidos orgánicos. Aunque se detecta por medio de antisueros heterólogos, no se demostró que la HCG posea capacidad inmunizante para el huésped.

El screening rutinario de HCG urinaria en mujeres que presentaron una mola hidatiforme, hace posible detectar virtualmente todos los coriocarcinomas en este grupo de pacientes en un momento en que son susceptibles de curación (BAGSHAW, 1974). Se ha calculado que los coriocarcinomas más pequeños detectables mediante radioinmunoensayo de la HCG son del orden de 1-5 mm³ de tejido viable conteniendo alrededor de 10⁶ - 10⁷ células. En cambio por métodos clínicos o radiológicos la mínima masa tumoral detectable corresponde a 1 cm³ o 10⁹ células.

Dado que la concentración de HCG en orina o plasma refleja el número total de células presentes en el organismo, el radioinmunoensayo tiene interés para valorar la respuesta de la paciente a la quimioterapia. Cifras elevadas de aquella hormona se asocian a la existencia de importantes masas tumorales o de metástasis, mientras que valores en los límites más bajos de detectabilili

dad, son indicativos de un proceso subclínico. De esta manera, el crecimiento del tumor viene indicado por un incremento en los niveles de HCG, mientras que estos descienden rápidamente cuando se produce la regresión tumoral por la quimioterapia; en caso de fracaso del tratamiento no se produce dicho descenso.

Al evaluar la relación existente entre la concentración de un "biological marker" y el tamaño del tumor que lo produce deben tenerse en cuenta los factores que pueden interferir en los procesos metabólicos y de excreción de aquella sustancia. Por ejemplo si un indicador tumoral se metaboliza en el hígado, la administración de quimioterápicos o hepatotóxicos puede explicar la existencia de unos elevados niveles del mismo. O también puede ocurrir que si el tratamiento citostático ocasiona una importante destrucción celular, se produzca una elevación en los niveles del producto tumoral por la liberación del mismo que se origina a partir de las células muertas. En el caso del coriocarcinoma existe un discreto aumento en los niveles de HCG durante la oncolisis quimioterápica, presumiblemente debida a la destrucción celular tumoral. Dada la excelente correlación existente con la evolución clínica, en las pacientes portadoras de

un coriocarcinoma los niveles de HCG circulantes constituyen el principal y más útil elemento para su control y determinar la conducta a seguir.

Otros diferentes tipos de tumores tanto de tipo endocrino como no, pueden segregar propia o impropiamente (producción ectópica) hormonas que pueden ser detectadas por radioinmunoensayo. Aunque desde el punto de vista de un mayor conocimiento de la biología de las células normales y neoplásica poseen un interés considerable, los "biological markers" secretados por los sistemas tumorales endocrinos tienen menos importancia en relación a un diagnóstico y pronóstico del cáncer dada la relativa rareza con que aparecen. La síntesis de "hormonas ectópicas" por parte de algunas neoplasias ha sido aceptada también de forma general como otra manifestación del fenómeno de reversión antigénica, pero el hallazgo de hormonas idénticas a bajas concentraciones en los tejidos normales correspondientes, sugiere que la diferencia sería más bien cuantitativa que cualitativa.

2.2.4.- Antígenos oncofetales.

El método ideal para estudiar la existencia de antígenos en los tumores humanos sería una relación huésped-dador entre individuos singénicos, de forma parecida a lo que ocurre con los experimentos llevados a cabo en animales. Por motivos obvios ello no es posible y únicamente se pueden utilizar técnicas que impliquen la formación de antisueros xenogénicos. Pero desgraciadamente esto supone dos inconvenientes que dificultan la interpretación de los resultados obtenidos: 1) todos los extractos tumorales humanos contienen grandes cantidades de componentes tisulares normales con lo que el antisuero obtenido estará dirigido predominantemente a los antígenos tisulares más que a los tumorales, 2) el empleo de tejidos normales controles procedentes de donantes no cancerosos, hace imposible determinar si las diferencias antigénicas detectadas por el heteroantisuero son debidas a la presencia de antígenos tumorales en los extractos neoplásicos, o si reflejan simplemente diferencias aloantigénicas existentes entre los dadores del tejido normal y tumoral. Como ya hemos señalado anteriormente, en un intento de superar estas dificultades se llevaron a cabo estudios que condujeron a la descripción de los antígenos carcinoembrionarios.

2.2.4.1.- Antígeno carcnoembriónico.

Descrito por primera vez por GOLD y FREEDMAN en 1965, se obtuvo preparando antisuero frente al carcinoma de colon en conejos que habían sido hechos tolerantes al tejido colónico normal en el período neonatal. El antisuero fué absorbido con epitelio intestinal normal obtenido del propio paciente en el momento de la intervención quirúrgica. Mediante técnicas de doble difusión en agar gel, se demostró que los adenocarcinomas humanos originados a expensas del epitelio digestivo derivado del enterodermo (recto y colon junto con estómago, esófago, hígado y páncreas) contenían un antígeno común; y que un antígeno idéntico se hallaba en el intestino, páncreas e hígado fetales durante los dos primeros trimestres de la gestación.

Debido a que este componente antigénico fué descrito por primera vez en los tejidos neoplásicos y embrionarios gastrointestinales, se le dió el nombre de antígeno carcinoembriónico (CEA) del sistema digestivo humano, y se pensó que podía constituir otro ejemplo de reversión antigénica. Es posible que el CEA represente un constituyente celular que es reprimido durante el proceso de diferenciación embrionaria y que reaparece en las células

malignas correspondientes a través de un proceso de diferenciación derepresiva.

El CEA es una glicoproteína, soluble en ácido perclórico 1M, que puede ser extraída y purificada a partir del adenocarcinoma primario de colon o de las metástasis hepáticas del mismo; su peso molecular oscila alrededor de 200.000, con un coeficiente de sedimentación de 7 a 8 S y una movilidad electroforética de β -globulina (TERRY y cols.,1974). La molécula está constituida por proteínas en un 35% y por carbohidratos en un 65%. La estrutura de esta última porción ha sido estudiada por procedimientos de oxidación (COLIGAN y TODD,1975) y de metilación (EGAN y cols.,1976) habiéndose comprobado que contiene fucosa,manosa, galactosa, N-acetilglucosamina, ácido siálico y muestras de N-acetilgalactosamina.Las variaciones en el contenido de ácido siálico dependiente del origen del tumor explican la heterogeneidad electroforética observada en las diferentes preparaciones de CEA (COLIGAN y cols.,1973). La fracción protéica está constituida por una cadena peptídica simple (EGAN y cols., 1974) cuya secuencia de aminoácidos no se conoce totalmente,pero se ha comprobado que los 24 aminoácidos primeros de la cadena son constantes y característicos, habiéndose descrito en muestras de CEA de distinto origen, como el obtenido

a partir de metástasis hepáticas de carcinoma de colon o del suero de pacientes en estadios avanzados de esta enfermedad o de tumores diferentes (TERRY y cols.1972;1973).Dada la complejidad y el tamaño de la molécula de CEA no sorprende que se hayan detectado más de un determinante antigénico mediante radioinmunoensayo(FUKS y cols.,1974).

Si bien mediante el microscopio de fluorescencia el CEA parece ser un componente de la superficie celular (GOLD y cols.,1968) el estudio ultraestructural de la célula, con microcopia electrónica, ha permitido localizarlo en el glicocalix circundante a la membrana celular (GOLD y cols.,1970); originándose en el citoplasma pasaría a través de la membrana al exterior de la célula y a los fluidos corporales circundantes. MARTIN y MARTIN (1970) no hallaron correlación entre el grado de diferenciación del tumor y su contenido en CEA; en cambio DENK y cols.(1972) comparando patrones histológicos e inmunológicos señalan que la cantidad de CEA producido por un tumor depende de su grado de diferenciación, indicando que los adenocarcinomas bien diferenciados del tracto gastrointestinal contienen grandes cantidades de CEA mientras que los anaplásicos contienen poco o nada.

Por el contrario en un trabajo muy reciente (VAN NAGELL y cols.,1977 a)se comprueba que para el cáncer de endometrio sólo en un 22% de tumores bien diferenciados

existen niveles plasmáticos de CEA elevados, mientras que en casos de adenocarcinomas escasamente diferenciados en más del 75% de ocasiones los valores de CEA son altos.

El CEA parece poseer una escasa capacidad inmunogénica, induciendo una respuesta inmunitaria relativamente débil en el huésped humano. Mientras que GOLD (1967) describió la existencia de anticuerpos en pacientes con cáncer de colon, que por otra parte no guardaban relación con la evolución clínica del enfermo, ni KARITZKY y BURTIN (1967) ni LO GERFO y cols. (1972) consiguieron evidenciar tales anticuerpos. Mediante técnicas de hemaglutinación pasiva y radioinmuno-electroforesis se han detectado anticuerpos IgM frente al CEA, a muy bajas concentraciones en el suero de una minoría de pacientes con cánceres digestivos y de gestantes. Los intentos de demostrar una inmunidad celular frente al CEA por medio de tests cutáneos y técnicas in vitro han fracasado. Así por ejemplo, LEJTENYI y cols. (1971) comprueban que el CEA purificado no es capaz de inducir la transformación blástica de los linfocitos ni en pacientes con cáncer de colon ni en mujeres gestantes; en cambio en ambos grupos la fitohemaglutinina estimula dicha transformación.

Es interesante el hecho de que los anticuerpos anti-CEA se detecten sólo en los pacientes con tumores primarios pequeños y no en los que presentan grandes masas tumorales ni tras haberse producido la diseminación neoplásica. La explicación más probable a esta aparente paradoja está en que el CEA es liberado a la circulación en cantidades proporcionales al tamaño del tejido tumoral, y una vez liberado forma complejos antígeno-anticuerpo circulantes. Si se libera demasiada cantidad de antígeno, puede impedir la detección de anticuerpos circulantes libres. Esta teoría de la formación de inmunocomplejos para explicar la desaparición de los anticuerpos anti-CEA viene apoyada clínicamente por el caso de un paciente afecto de un cáncer de colon y de un síndrome nefrótico. El estudio por inmunofluorescencia de la biopsia renal practicada, reveló la existencia de depósitos de inmunoglobulinas, complemento y CEA en la membrana basal glomerular según un patrón sugestivo de que la lesión renal estuvo inducida por complejos solubles de CEA y anticuerpos anti-CEA. (CONSTANZA y cols., 1973).

El papel que pueden jugar los anticuerpos anti-CEA es la relación huésped-neoplasia no está

claro, si bien se han formulado algunas hipótesis. Estos anticuerpos o no protegen al huésped o existen en cantidad insuficiente para producir un efecto citolítico detectable. Por otra parte pueden facilitar el desarrollo tumoral al quedar las células neoplásicas recubiertas por los anticuerpos, lo que las protege de la acción citotóxica de las células inmunes. Esta "facilitación" del crecimiento tumoral puede producirse también a través de un mecanismo de feedback negativo que ocasione una inhibición central de la respuesta inmunitaria. La aparente falta de acción de los anticuerpos anti-CEA sobre el feto puede tener una posible explicación en el hecho de que los anticuerpos IgM no atraviesan la placenta.

El CEA, a diferencia de las hormonas (pero de forma parecida a los antígenos de histocompatibilidad o de los grupos sanguíneos) no posee ninguna función biológica evidente, y presenta una serie de características (reacciones cruzadas entre los diferentes tumores, aparición por un proceso de reversión antigénica, es débilmente inmunogénico, y se origina probablemente en el citoplasma) que lo asemejan mucho más a los antígenos embrionarios de los tumores animales que

a los TSTA inducidos por virus o agentes químicos.

Datos procedentes de la experimentación animal mediante inyección endovenosa de CEA en perros, conejos y hámsters, indican que esta sustancia es rápidamente metabolizada en el hígado y eliminada por el riñón, si bien se ha demostrado que el metabolismo del CEA puede estar alterado en animales portadores de un tumor; se comprueba en estos casos una disminución en la eliminación renal de CEA, debido posiblemente a la formación de complejos antígeno-anticuerpos anti-CEA (PRIMUS y cols., 1974). La elevación transitoria en los niveles de CEA que se producen en ocasiones tras la resección quirúrgica de un tumor, puede ser debida a los efectos hepatotóxicos de los anestésicos o a alguna otra causa que desconocemos. Los citostáticos pueden producir elevaciones transitorias en los niveles de CEA debido a su acción oncolítica. Pacientes con un fallo renal o hepático pueden mostrar también valores altos de CEA falsos.

El CEA o al menos sustancias CEA-like han sido detectadas en la mucosa intestinal normal (DYKES y KING, 1972) y en otros tejidos orgánicos aun que a concentraciones inferiores a las del cáncer de

colon, lo que podría sugerir que la represión del gen o genes que codifican el CEA no es total al menos para todas las células adultas.

Ya hemos dicho que el CEA es secretado más o menos constantemente y entra a formar parte del glicocalix de la célula intestinal (GOLD y cols., 1970). Sin embargo se han descrito sustancias con actividades CEA-like en diversas secreciones orgánicas de pacientes cancerosos y no cancerosos, como saliva (MARTIN y DEVANT, 1973), jugo pancreático (McCABE y cols., 1974; SHARMA y cols., 1974), heces (FREED y cols., 1972; ELIAS y cols., 1974), ascitis neoplásica (BHARGAVA y cols., 1975), orina (HALL y cols., 1972; COOMBES y cols., 1975) y secreción gastrointestinal (GO y cols. 1974). La valoración de estas sustancias en las secreciones corporales ha sido señalado como posible método diagnóstico en algunas neoplasias. HALL y cols., hallaron valores elevados de CEA en dos tercios de pacientes con cáncer de vejiga urinaria y parece existir cierta correlación con la extensión y grado del tumor. Sin embargo en pacientes no cancerosos, las infecciones del tracto urinario pueden causar también elevaciones en las cifras de CEA en orina. El posible valor diagnóstico de estas determinaciones está por aclarar.

Hasta aquí hemos expuesto las características físicoquímicas, localización celular, propiedades inmunogénas, metabolismo y sustancias-like del antígeno carcinoembriónico. La aplicación clínica del CEA en oncología y especialmente en el terreno ginecológico será expuesta más adelante cuando tratemos del inmunodiagnóstico de las neoplasias.

2.2.4.2.-Alfa₁-fetoproteína (AFP).

Descrita por primera vez en 1963 por ABELEV y cols., como una α -globulina detectable en el suero de ratones portadores de hepatoma y ausente del suero de los animales normales, la AFP constituye también una de las principales proteínas plasmáticas del feto humano en estadios precoces del embarazo (ABELEV, 1974). Se encuentra además en el suero de los ratones recién nacidos y en el de los adultos cuando experimentan un proceso de regeneración hepática. En los humanos es sintetizada por hígado fetal, saco vitelino y tracto alimentario, alcanzando los niveles máximos (varios mg/ml.) en el segundo trimestre del embarazo, período en que constituye prácticamente la tercera parte del total de proteínas séricas. Tras el parto sus niveles descienden rápidamente durante las dos primeras semanas de vida, estando ausente o presente sólo en muy pequeñas cantidades en el suero adulto normal, (entre 2-25 ng/ml. medido por radioinmunoensayo, según ROUSLAHTI y SEPPALA, 1971 b). En el feto estas cifras son casi un millón de veces más elevadas. La observación de que en el adulto los niveles de AFP se elevan de nuevo en caso de carcinomas primitivos de hígado (TATARINOW, 1964) y tetraromas (ABELEV, 1971) centró la

atención sobre esta proteína como posible método diagnóstico de estas neoplasias. La reaparición de la alfa₁-fetoproteína en el suero de estos enfermos nos proporciona otro ejemplo de interrelación entre antígenos tumorales y embrionarios y de expresión genética oncofetal (RUOSLAHTI y cols., 1974; ABELEV, 1974).

Si bien la AFP se ha detectado en todas las especies animales estudiadas incluyendo pollos y tiburones (GITLIN y GITLIN, 1975), su función biológica no está clara. En la rata y ratón la AFP posee una importante capacidad fijadora de los estrógenos libres del suero, pero en el hombre no parece tener esta propiedad (SAVU y cols., 1974). En los roedores la AFP puede proteger al cerebro fetal frente a una maduración sexual inducida por los estrógenos (ATTARDY y cols., 1976).

Por medio de técnicas inmunoquímicas se ha conseguido purificar la AFP en diferentes especies animales (RUOSLAHTI, 1976) habiéndose comprobado que está constituida por una cadena polipeptídica simple con una fracción hidrocarbonada de aproximadamente un 4% y con un peso molecular de 70.000 (RUOSLAHTI y SEPPALA, 1971 a). Su secuencia de aminoácidos es homóloga a la de la albúmina sérica (RUOSLAHTI y TERRY, 1976).

De forma parecida a lo que ocurre con el CEA, la AFP desencadena una débil respuesta inmunitaria en el huésped (ALPERT, 1974; RUOSLAHTI y cols., 1974a). Pero mientras que la AFP homóloga no es inmunogénica en la especie de origen, la AFP heteróloga induce la formación de anticuerpos que presentan una reacción cruzada con la AFP de las especies inmunizadas. Así los conejos inmunizados con AFP humana o los monos inmunizados con la AFP del conejo, producen anticuerpos que reaccionan contra su propia AFP. (NISHI y cols., 1972;RUOSLAHTI y WIGZELL, 1975).

Estos hallazgos desataron el interés por la posibilidad de conseguir una inmunoterapia o una profilaxis del cáncer primitivo de hígado, pero hasta el momento los intentos realizados para inducir una resistencia anti-tumoral tratando a los animales con anticuerpos anti-AFP o inmunizándolos frente a su propia AFP modificada, no han sido concluyentes (MITZEJEWSKI y ALLEN,1974; SELL y cols., 1976).

Han sido descritas otras fetoproteínas similares en algunos tumores humanos. BUFFE y cols.(1970) detectaron una proteína de elevado peso molecular que contiene hierro, en el suero fetal y en el de adultos afec-

tos de neoplasias hepáticas y linfomas. Es conocida con el nombre de α_2 Hfetoproteína y su concentración en el suero de los enfermos parece reflejar el grado de extensión de la enfermedad. La β S-fetoproteína descrita por TAKAHASHI y cols. (1967) se localiza en el citoplasma de las células hepáticas fetales y aparece en el suero de pacientes con linfomas, hepatomas y carcinomas gástricos.

2.2.4.3.- Otros antígenos embrionarios.

En estos últimos años han sido descritas sustancias que ponen de manifiesto la reversión antigénica que tiene lugar en el cáncer humano, pero disponemos de menos información en cuanto a sus propiedades inmunquímicas y potencial diagnóstico que en el caso del CEA, AFP y HCG. Pero con toda probabilidad se desarrollarán en el futuro técnicas de radioinmunoensayo para estos u otros "markers" que contribuirán junto a los que ya disponemos, al inmunodiagnóstico del cáncer y a la monitorización del tratamiento.

a) Fosfatasa alcalina placentaria (Isoenzima de Regan).

Por medio de técnicas enzimáticas se ha detectado en el suero de un 12% de pacientes afectados de diversos tipos de neoplasia una isoenzima de la fosfatasa alcalina ausente normalmente de los tejidos adultos normales pero bioquímica e inmunológicamente indistinguible de la sintetizada por la placenta (NATHANSON y FISHMAN, 1971). Sin embargo mediante el radioinmunoensayo se detecta la isoenzima de Regan en el suero de mujeres gestantes y en los tejidos neoplásicos pero no se

consigue detectar en el suero de los pacientes cancerosos. Desconocemos por el momento la razón de esta discrepancia pero es posible que una combinación de los métodos inmunológicos y enzimáticos permita a larga detectar cantidades mínimas de esta sustancia en el suero.

b) Sulfoglicoproteína fetal.

Por métodos de inmunodifusión se ha descrito la existencia de un tipo de sulfoglicoproteína fetal en el jugo gástrico de más del 90% de pacientes con carcinoma de estómago y en un 10% de enfermos afectados de otros tipos de patología gástrica (HAKKINEN y VIIKORI 1969).

La sulfoglicoproteína fetal muestra una reactividad inmunológica cruzada parcial con el CEA y algunas sustancias CEA-like. El desarrollo de una técnica de radioinmunoensayo que permita cuantificar esta sustancia en el suero, podría permitir incluirla en la batería de pruebas inmunológicas utilizadas en el diagnóstico de las neoplasias.

c) Gammafetoproteína.

Denominada así por su movilidad electroforética y por hallarse presente en el suero y tejidos del feto humano normal, se detecta también en el 75% de

tejidos tumorales benignos y malignos del hombre y en el suero de aproximadamente un 10% de pacientes afectados de leucemia o tumores sólidos (EDYNAK y cols. 1972). Por inmunosifusión no se detecta ni en los tejidos humanos normales ni en el suero adulto. A diferencia de los otros antígenos embrionarios de los tumores humanos citados anteriormente, esta sustancia no presenta especificidad de especie, hallándose en el suero de feto humano, de la vaca, del cerdo, del perro y del gato.

d) Antígenos asociados a la leucemia (LAA)

A partir de preparaciones de la membrana celular obtenidas de pacientes afectados de leucemia mieloblástica aguda, se obtienen unos antígenos comunes a las células embrionarias y a las leucémicas, que han sido denominadas LAA (HARRIS y cols., 1971). Estos antígenos se detectan por inmunodifusión y electroforesis en el suero de casi una tercera parte de pacientes afectados de leucemia o con enfermedad de Hodgkin y también en el suero del embrión. Pero a diferencia de los demás antígenos embrionarios los LAA tienden a permanecer en el suero incluso en la fase de remisión clínica de la enfermedad.

2.3.- Antígenos en tumores ginecológicos.

Los métodos de diagnóstico precoz del cáncer de que dispone el ginecólogo actualmente han probado sobradamente su eficacia en la detección de las neoplasias cervicales y endometriales. Sin embargo para el ovario, órgano del aparato genital al que no disponemos de un fácil acceso, no existe una técnica que permita diagnosticar precozmente su transformación maligna.

Es por ello que la demostración de la antigenicidad de las diferentes neoplasias genitales en la mujer, y especialmente del cáncer de ovario, en vista a un posible inmunodiagnóstico, ha cobrado un especial interés en los últimos tiempos. El ideal, y la esperanza, sería hallar un medio para el cáncer ovárico equiparable a lo que el Papanicolau es para el cáncer de cérvix; quizás en un futuro no muy lejano la inmunología pueda proporcionárselo.

La demostración de antígenos tumorales en las neoplasias ginecológicas se ha basado hasta el momento en los siguientes cuatro puntos:

- 1) demostración de anticuerpos antitumorales específicos (respuesta humoral).

- 2) demostración de la existencia de una respuesta inmunitaria de tipo celular frente a estos tumores. Disponemos de datos que sugieren la existencia de ambos tipos de respuesta inmune frente a determinantes antigénicos de las neoplasias genitales femeninas, y parece además que la respuesta celular (linfocitos) es mucho más citotóxica y definitiva que los factores humorales. Por otra parte los estudios con tumores alogénicos indican la posibilidad de que las neoplasias de un mismo órgano histológicamente iguales presenten antígenos comunes.
- 3) aislamiento e intento de purificación de los antígenos tumorales específicos. Conseguir los antígenos neoplásicos totalmente purificados y el desarrollo de un radioinmunoensayo que permita una exacta determinación de los mismos, constituyen las metas más inmediatas para lograr un inmunodiagnós-tico.
- 4) detección de antígenos carcinoembrionarios. Son muy numerosos ya los trabajos en que se señala la existencia de CEA en el suero de pacientes afectas de diversos tipos de cáncer ginecológico, pero se han

detectado también en estas enfermas otros "markers" que sugieren la reversión antigénica celular en estas neoplasias; tal es el caso de la gonadotrofina coriónica (HCG) y del lactógeno placentario (HPL), hormonas propias del estado de gestación.

2.3.1.- Inmunidad humoral.

La producción de anticuerpos circulantes frente a antígenos tumor-específicos ha sido demostrada por medio de diferentes técnicas tales como reacciones de precipitación, fijación del complemento, citólisis, "facilitación" tumoral, inmunolectroforesis, y microscopio de fluorescencia. Es indudable que el suero del paciente canceroso reacciona con frecuencia frente a sus propias células tumorales, pero debe de ser probada la especificidad de esta reacción. La absorción del suero con el material tumoral extrae el anticuerpo, pero procesos repetidos de absorción con células normales pueden conducir al mismo resultado. Ello sugiere la posibilidad de que la superficie de las células tumorales contenga antígenos que si bien se hallan normalmente en los tejidos adultos o fetales, se encuentran en una concentración mucho mayor en la célula cancerosa lo que conduce al desarrollo de autoanticuerpos.

En 1971 LEVI realizó pruebas de citotoxicidad sobre un cultivo de células de cistoadenocarcinoma seroso papilar del ovario; estas células fueron cocultivadas con un antisuero de conejo inmunizado mediante un liofilizado del tumor. Se comparó luego el índice de cre

cimiento de las células que habían sido incubadas con el antisuero, con el de las que se incubaron con antisuero previamente absorbido con tejido tumoral o con suero de conejo normal. El antisuero antitumoral ovárico produjo una notable disminución en el número de células viables en cultivo de una línea establecida de cistoadenocarcinoma seroso papilar; por el contrario los efectos del suero de conejo normal y del antisuero, frente a extractos de tejido ovárico normal fueron mínimos. A su vez la acción citotóxica del antisuero tumoral podía ser neutralizada al absorberlo con un liofilizado del tumor, pero no con un liofilizado ovárico normal.

En estudios posteriores (Di SAIA y cols., 1973) se valoró el efecto citotóxico del suero de pacientes con un carcinoma escamoso celular del cérvix o un adenocarcinoma ovárico en estadios avanzados, antes del inicio de la terapéutica. Se evidenció un significativo efecto citotóxico en el suero de 12 de las 20 mujeres con cáncer cervical y en 5 de las 8 afectadas de carcinoma ovárico.

Las pruebas de citotoxicidad se llevaron a cabo sobre dos líneas celulares establecidas; una derivada del adenocarcinoma ovárico y otra procedente del carcinoma epidermoide de cérvix. El efecto citotóxico desapare

cía cuando se incubaba previamente el antisuero con un liofilizado tumoral, cosa que no ocurría si la incubación se realizaba con liofilizados de tejido normal.

GERBER y cols. (1977) estudian el suero de 91 mujeres con neoplasias ováricas mediante técnicas de fijación del complemento y de inmunofluorescencia in directa para detectar la existencia de anticuerpos frente a antígenos del carcinoma de ovario, utilizando tejido tumoral como substrato. Concluyen estos autores que con estas técnicas no es posible demostrar la presencia de an ticuerpos específicos, si bien la incidencia global de autoanticuerpos no-órgano específicos estaba aumentada en las pacientes cancerosas.

BYFIELD y cols., 1974 y WEINTRAUB y cols., 1973, han descrito también la existencia en el suero de pacientes con carcinoma cervical, de anticuerpos frente a antígenos celulares de superficie, mediante técnicas de microcitotoxicidad y de fijación del complemento. El efecto citotóxico aparecía de manera uniforme, frente a siete líneas celulares diferentes establecidas de carcinoma escamoso celular de cérvix; en cambio no presentaba frente a células cervicales normales. Estos resultados su gieren la existencia de antígenos tumor-específicos con reactividad cruzada en las células de las neoplasias epi



dermoides del cuello uterino.

GALL y HAINES (1974) han trabajado en la identificación de antígenos de los tejidos del carcinoma cervical o en el suero de las pacientes y en su posible relación con los antígenos inducidos por el HSV-2. Previamente HOLLINSHEAD y cols. (1972b) habían descrito la existencia de un antígeno membrana soluble que podía obtenerse del cáncer cervical y que por la técnica de fijación del complemento podía comprobarse que reaccionaba con anticuerpos originados frente al HSV-2. Por otra parte se ha hallado en las pacientes con cáncer de cuello uterino un anticuerpo que reacciona frente a antígenos tumor-específicos inducidos por HSV-2 (ARELIAN y cols., 1973), mientras que GALL y cols., (1973) describieron la existencia de un antígeno tumor asociado en extractos de carcinoma de cérvix en 18 pacientes, antígeno que no se hallaba en 35 muestras diferentes de tejido cervical normal estudiados. Este antígeno del carcinoma de cérvix descrito por GALL reacciona en inmunodifusión e inmunoelectroforesis con el antisuero homólogo obtenido por la inmunización de conejos, pero no presenta reacción frente a antisueros preparados mediante extractos de tejido cervical normal o de tumores extragenitales. Los estudios de este autor aportan datos convincentes sobre la posible

identidad inmunológica entre el antígeno del carcinoma cervical y un antígeno HSV-2 inducido. Este hallazgo, junto al hecho de la reactividad cruzada existente entre los carcinomas de vulva, ovario y cérvix, sugiere la posibilidad de que el herpes-virus tipo II actúe como agente etiológico común en estas neoplasias. Esta hipótesis toma especial interés cuando se tienen en cuenta los estudios epidemiológicos que han demostrado que las mujeres afectas de cáncer de cérvix uterino presentan una mayor incidencia de anticuerpos frente al HSV-2 que los individuos control (JOSEY y cols., 1968; RAWLS y cols., 1968).

Los trabajos de ROYSTON y AURELIA (1970) que por técnicas de inmunofluorescencia detectan antígenos herpéticos en las células exfoliadas de cáncer de cuello uterino, apoyan también la etiología vírica en las neoplasias genitales de la mujer.

CHIANG y cols. (1976) estudiaron el suero de 176 pacientes portadoras de un cáncer cervical por técnicas de inmunofluorescencia indirecta frente a las células neoplásicas cervicales, y si bien hallaron una diferencia significativa entre el nivel de anticuerpos de las pacientes cancerosas y el del grupo control, no pudo demostrarse una especificidad antitumoral para los mismos. Estos autores encuentran también una elevación del nivel

de anticuerpos en los maridos de las pacientes, lo que sugeriría la asociación de un agente infeccioso al cáncer de cérvix. Señalan además que en los cánceres in situ no se producía esta elevación en el título de anticuerpos mientras que los resultados de las pruebas de inmunidad celular (test de la migración leucocitaria) en estas pacientes eran similares a los de las mujeres afectas de carcinomas invasivos. Esto puede indicar una mayor sensibilidad de la inmunidad celular mediada que de la humoral en los estadios iniciales del cáncer.

El porqué de la coexistencia de anticuerpos citotóxicos y una neoplasia que sigue progresando, permanece aún por aclarar. De ello nos ocuparemos ampliamente en el apartado sobre el fenómeno de escape tumoral, pero señalemos aquí lo siguiente. La citolisis es la consecuencia de un efecto lítico sobre la membrana celular por parte del complemento que ha sido activado por la unión del anticuerpo a dicha membrana. Así la posibilidad de que se produzca una reacción citolítica depende en gran parte del número de determinantes antigénicos existentes en la membrana, de las características físico-químicas de la misma y de la afinidad del anticuerpo para la fijación del complemento. Sin embargo la inmunidad tumoral no está presente en el plasma de los pacientes en

cantidades "letales" para las células neoplásicas y los efectos de la reacción entre el anticuerpo y el antígeno tumor-específico se evidencian más claramente in vitro que in vivo. La mayoría de neoplasias malignas no son susceptibles de una citolisis mediada por anticuerpos.

Puede existir también un problema de accesibilidad. Los anticuerpos, especialmente si son del tipo IgM, no pasan fácilmente las barreras vasculares ni penetran en los espacios intracelulares, lo que hace que alcancen un es caso volúmen de la masa tumoral. Además es concebible que la cantidad de tumor existente sea tan grande que los anticuerpos sean absorbidos sólo en una fracción de la gran can tidad de antígenos presentes, lo cual dejaría pocos anticuerpos circulantes detectables. En resumen, la neoplasia puede desarrollarse a un ritmo tal que supera la capacidad de los anticuerpos para destruir las células.

Por otra parte se nos presenta el fenómeno de la "facilitación tumoral", definido como un aumento sobre el índice de crecimiento esperado de un tumor ocasionado por un anticuerpo específico, generalmente una inmunoglobulina IgG, que reacciona con los antígenos tumorales. Ello puede producirse in vivo por inmunización activa o pasiva e in vitro in cubando las células tumorales con el anticuerpo antes de ino cularlas a un nuevo huésped. HELLSTROM y HELLSTROM (1974)

demuestran que el suero de individuos cancerosos puede contener factores capaces de bloquear la destrucción de las células tumorales por los linfocitos inmunizados frente a los antígenos tumor asociados en cuestión. O sea que los anticuerpos no sólo no rechazarían el tumor sino que además facilitarían su desarrollo. Muy poco se ha investigado acerca de la posible existencia de estos anticuerpos bloqueantes en el cáncer ginecológico. MITCHELL y KOHORN (1976) han estudiado este problema en el cáncer de ovario. Estos autores comprobaron que en 14 de 16 pacientes con carcinoma de ovario la recidiva se asociaba a la presencia de factores bloqueantes en el suero y en 5 de estas enfermas su aparición precedió a la manifestación clínica de recidiva. En dos pacientes en que se manifestaban los factores bloqueantes previamente a la quimioterapia, aquellos desaparecieron del suero durante el período de remisión clínica para volver a reaparecer en la recidiva. Parece ser que por tanto la presencia de factores séricos bloqueantes va asociada a la recidiva de la enfermedad. Sin embargo en ocasiones se observa un hecho paradójico y es que estos factores pueden ser detectados cuando existe una masa tumoral relativamente pequeña mientras que no se detectan cuando el proceso neoplásico progresa. Los autores comprobaron este hecho en 10 de sus pacientes, coincidiendo con los resultados de DISAIA y

cols. (1972) que tampoco pudieron detectar esta acción bloqueante en el suero de mujeres afectas de neoplasia ovárica en fases avanzadas. Serían pues necesarias determinaciones seriadas para demostrar la presencia de estos anticuerpos.

2.3.2.- Inmunidad celular.

La existencia de antígenos tumor-específicos localizados principalmente en la membrana citoplasmática inducen una respuesta inmunitaria de tipo celular por estimulación de los linfocitos timo-dependientes, inmunidad que no puede ser transferida a través del suero de animales inmunizados. La demostración de esta inmunidad celular tumor-específica puede realizarse en animales por el rechazo de injertos tumorales o el fracaso del desarrollo tumoral en receptores previamente inmunizados. Sin embargo este hecho puede ser evidenciado también por otras técnicas que además son aplicables en el hombre.

Uno de los procedimientos más empleados para demostrar la existencia de inmunidad celular frente a un tumor consiste en la acción destructiva que los linfocitos sensibilizados ejercen sobre las células tumorales cuando ambas se enfrentan en cultivo. Son interesantes, en este sentido, los trabajos de Di SAIA y cols. (1971, 1972) que estudian el efecto citotóxico de los linfocitos sobre las células neoplásicas en pacientes afectas de cáncer ovárico y cervical, demostrando indirectamente así la presencia de antígenos tumor-específicos en ambos ti-

pos de neoplasia. Estos autores utilizaron líneas celulares establecidas de las que se podían obtener perfectamente curvas de crecimiento. Estas líneas celulares fueron cocultivadas con linfocitos de personas con carcinoma epitelial del ovario y de cuello uterino en etapas avanzadas (estadio III y IV). Se tomaron como control linfocitos de personas sanas que se enfrentaron a las mismas células diana. El cocultivo se hizo en unos tubos especiales (tubos de Leighton) que permiten realizar periódicamente (a intervalos de 12-24 horas) una tinción celular y su examen microscópico. Se estudiaron de esta forma 86 mujeres con cáncer ovárico y 56 con carcinoma de cuello uterino. Los linfocitos de 79 mujeres del primer grupo y 50 del segundo mostraron un efecto citotóxico inmediato sobre las células tumorales cuyo desarrollo fué inhibido rápidamente y presentaban signos de vacuolización y degeneración. En cambio los linfocitos de personas sanas actúan sólo después de tres o cuatro días de cultivo conjunto con las células tumorales, fenómeno aplicable en base a las diferencias de histocompatibilidad entre los linfocitos del dador y las células neoplásicas "diana"; se necesita un período de 72-96 horas de "aprendizaje" para que los linfocitos inmunocompetentes de los individuos sanos reconozcan y reaccionen a estas diferencias isoantigén-

cas. Por el contrario el efecto citocida inmediato demostrado en forma constante, de los linfocitos obtenidos de mujeres con cáncer ovárico y cervical avanzados sobre las células "diana" indica que estos linfocitos han sido presensibilizados en la paciente y son capaces de una acción citotóxica inmediata en el cultivo. Esta presensibilización constituye además una prueba indirecta de la existencia de antígenos tumor-específicos en las neoplasias ováricas y cervicales estudiadas.

A su vez la destrucción también inmediata de las células tumorales por parte de los linfocitos alogenos sólo se observó cuando los donadores eran mujeres que presentaban un cáncer histológicamente idéntico al que se utilizó para obtener las células en cultivo. Y asimismo las células linfoides de los donadores sanos actuaron sobre estas células tumorales alogenas sólo después de un período de 72 a 96 horas de "aprendizaje". A la vista de todo ello cabe suponer que los tumores de ovario y cuello uterino del tipo histológico investigado comparten al menos en parte unos antígenos de superficie que permiten a los linfocitos sensibilizados de una paciente, reaccionar de forma inmediata frente a las células tumorales de otra enferma.

Con frecuencia un escaso número de células

tumorales sobrevivirán al ataque linfocítico incluso tras varios días de cocultivo. No disponemos de una explicación definitiva para este hecho pero pueden influir varios factores. En primer lugar es necesaria una elevada proporción (100/1) de células linfoides en relación a las tumorales para lograr el máximo efecto citocida ya que sólo una pequeña fracción de la suspensión de linfocitos de sangre periférica estudiada estará constituida por células presensibilizadas o "comprometidas" en relación al antígeno tumoral problema. Se ha sugerido también la posibilidad de que las células neoplásicas liberen cantidades masivas de antígenos tumorales solubles que uniéndose a los linfocitos los inutilizaban. En tercer lugar puede ocurrir que las células tumorales sometidas al "ataque inmunológico" no expresen siempre sus antígenos tumor-específicos.

La inmunidad celular frente a los antígenos tumorales específicos puede ponerse también de manifiesto por otras técnicas además del test de citotoxicidad. La prueba de inhibición de la migración leucocitaria ha sido aplicada en diversos tipos de cáncer ginecológico con un porcentaje de positividad que indican la existencia de una sensibilización de los linfocitos de la paciente a antígenos tumor-específicos. Ya hemos citado anteriormente algunos de los estudios llevados a cabo en el

cáncer de mama; pero también se ha realizado esta prueba en el carcinoma ovárico (CHEN y cols., 1973; MELNICK y BARBAER, 1975) y cervical (CHIANG y cols., 1976).

SINGER y cols. (1975) estudiaron la inmunidad celular al factor encefalitogénico de Field y Caspary en mujeres que presentaban una displasia o un carcinoma in situ del cérvix mediante el test de inhibición de la migración de los macrófagos (MMI). Al parecer según los trabajos de SHELTON y cols. (1975) la inmunidad celular frente a esta proteína básica de la mielina humana puede ser demostrada de manera más efectiva mediante el test de MMI que con la prueba de movilidad electroforética de los macrófagos descrita originalmente por FIELD y CASPARY (1970). En el test de MMI el antígeno interacciona con los linfocitos sensibilizados de modo que estos liberan un factor que inhibe la migración de los macrófagos existentes en un exudado celular peritoneal de cobaya. El mecanismo de la sensibilización frente al factor encefalitogénico no está totalmente aclarado pero se ha sugerido que se trataría de una sustancia análoga a la proteína básica del cáncer, un antígeno común para diferentes tipos de tumores humanos (DICKENSON y cols., 1973).

CHATTERJEE y cols. (1975) estudiaron la inmunidad celular en pacientes afectas de cáncer ovárico por medio del test de transformación de los linfocitos de las enfermas frente a sus propios extractos tumorales. No hallaron respuestas significativamente diferentes de las obtenidas en el grupo control de personas sanas; ello indica que al menos mediante este procedimiento, no es posible demostrar la existencia de inmunidad celular frente a los antígenos tumorales en el cáncer de ovario. Que esta falta de respuesta no puede ser atribuida a un defecto inherente al sistema T-linfocitario, lo demuestra el hecho de que los linfocitos de las pacientes presentaron una intensa respuesta blastogénica frente a un mitógeno inespecífico como es la fitohemaglutinina.

De lo anteriormente expuesto puede deducirse que al igual que para otros muchos tipos de neoplasias, sino todos, los tumores ginecológicos presentan una serie de antígenos asociados capaces de inducir una respuesta inmunitaria en el huésped, respuesta que se basa en la interacción entre el antígeno, linfocitos T y linfocitos B. De estos dos brazos eferentes inmunitarios parece ser el mecanismo celular-mediado el mayormente implicado en la "supervisión y destrucción" de la neoplasia. Y lo que es

más, en diversos tipos de tumores sólidos existe una estrecha correlación entre el estado de la inmunidad celular mediada valorada por reacciones de hipersensibilidad cutánea retardada, y el pronóstico de la enfermedad (EILBER y MORTON, 1970; LEE y cols., 1975).

WELLS y cols. (1973b) practicaron pruebas de hipersensibilidad cutánea retardada frente a extractos de membrana de células neoplásicas en pacientes afectas de cáncer de cuello uterino y hallaron reacciones positivas tanto con extractos tumorales autólogos como alogénicos. Los autores concluyen a partir de los resultados obtenidos que existe una respuesta inmune del huésped a los extractos del carcinoma cervical y sugieren la existencia de antígenos comunes en las células neoplásicas de las pacientes con carcinoma escamoso-celular de cuello uterino. En efecto, la reactividad cruzada que se puso de manifiesto frente a extractos de membrana de células tumorales tanto autólogas como alogénicas apoyan este hecho y constituye otro dato en favor de una etiología vírica para esta neoplasia. Recordemos que en los sistemas experimentales animales los tumores inducidos por virus presentan antígenos de superficie similares a diferencia del amplio espectro antigénico observado para los carcinógenos químicos.

2.3.3.- Aislamiento de antígenos tumorales.

La mayoría de estudios realizados en este sentido en el terreno ginecológico se han llevado a cabo en neoplasias ováricas y cervicales, especialmente en el cistoadenocarcinoma seroso papilar del ovario y en el carcinoma escamoso del cuello uterino.

Las razones de esta elección parecen ser las siguientes: para el cáncer de ovario la falta de un método de diagnóstico precoz del que tan necesitados estamos; el aislamiento y purificación de estos antígenos podría constituir la base de finos procedimientos diagnósticos como por ejemplo un radioinmunoensayo. Para el cáncer cervical la posibilidad de disponer fácilmente de sueros procedentes de enfermas afectas de este tipo de neoplasia cuyo diagnóstico se puede asegurar de manera sencilla por dos métodos universalmente aceptados: la citología exfoliativa y la biopsia cervical.

Los resultados obtenidos por los diferentes autores sugieren la existencia de antígenos específicos en los tejidos neoplásicos ováricos y cervicales que no se hallan presentes en el ovario y cuello uterino normales.

La metodología utilizada en el estudio de la antigenicidad de ambos tipos de neoplasia es esencial

mente la misma y puede resumirse de la siguiente manera. Tanto el tejido neoplásico como el normal se obtienen en el acto operatorio, el primero de ellos en pacientes can
cerosas y el tejido sano en mujeres intervenidas por pro
cesos ginecológicos benignos. Se preparan extractos de estos tejidos mediante homogeneización, sonicación y cen
trifugación de las muestras obtenidas; tras la centrifuga
ción el sobrenadante es dializado y posteriormente lio
filizado y almacenado a baja temperatura. Se procede lue
go a la inmunización de conejos mediante el liofilizado
más adyuvante de Freund. La presencia de anticuerpos en el animal se demuestra por la técnica de doble difusión
de Ouchterlony, immunoelectroforesis y estudios de cito
toxicidad. Estos anticuerpos son absorbidos frente al te
jido normal correspondiente con lo que en la fracción li
bre nos van a quedar únicamente los anticuerpos dirigi
dos específicamente contra los antígenos tumorales.

El paso siguiente consiste en fraccionar el extracto tumoral liofilizado; ello se hace mediante filtración en gel de Sephadex. Enfrentando cada una de las fracciones obtenidas con los anticuerpos específi
cos podremos identificar el antígeno (s) tumoral.

Diferentes autores han perseguido el ais
lamiento de antígenos tumor-asociados en los cánceres epi

teliales de ovario y cérvix uterino, entre los que cabe destacar los estudios pioneros de LEVI y cols. (1968, 1969, 1971) que describe la producción en conejos de anticuerpos específicos frente a ambos tipos de neoplasia y el aislamiento de los componentes antigénicos correspondientes en el tejido tumoral. Los anticuerpos no presentaron reacción cruzada con una serie de tejidos normales y neoplásicos diferentes y mediante la filtración en Sephadex los antígenos de los homogenados tumorales fueron localizados en una fracción de elevado peso molecular. Estos resultados sugerían la existencia de antígenos tumorales específicos en ambos tipos de neoplasia.

Utilizando técnicas similares de inmunodifusión e inmunoelectroforesis GALL y cols. (1973) describieron la existencia de un antígeno para el cáncer de cérvix y dos antígenos para el de ovario, que no se detectaban en los tejidos normales. Es interesante el hecho de que el antígeno procedente de diferentes tumores reaccionó con un mismo antisuero, y si bien fué hallado en todos los cánceres cervicales estudiados la concentración antigénica en los mismos variaba.

Tanto LEVI como GALL investigaron la presencia de CEA en sus fracciones antigénicas, con resultado negativo.

BHATTACHARYA y BARLOW (1973) demostraron que el cistoadenocarcinoma seroso papilar del ovario contiene un antígeno (s) tumoréspecifico (s) ausente del tejido ovárico normal y de tejidos como el endometrial, tubárico y cervical.

Otros autores (DORSETT y IOACHIM, 1973; KITSCHKE y cols., 1974; KNAUF y URBACH, 1973, 1976; Di SAIA, 1975) se han ocupado del estudio de la antigenicidad de las neoplasias ováricas y cervicales por procedimientos iguales o parecidos a los descritos hasta aquí. En conjunto, los resultados obtenidos señalan la existencia para ambos tipos tumorales, de antígenos tumor-asociados con reactividad cruzada que pueden constituir la base de un inmunodiagnóstico. Pero para que esto llegue a ser una realidad es necesario en primer lugar que esos antígenos identificados en los tejidos neoplásicos pasen a la circulación y aún suponiendo que esto sea así, hace falta desarrollar un método de radioinmunoensayo, lo suficientemente sensible, que permita detectar cantidades mínimas (en la línea del nanogramo) del antígeno circulante en el plasma. Los esfuerzos actuales van encaminados a lograr este objetivo. En una publicación muy reciente (KATO y TORIGOE, 1977) se describe un radioinmunoensayo para el antígeno del carcinoma escamoso del cuello uterino; los autores señalan que

en 27 de 35 pacientes se detectó el antígeno circulante, mientras que en mujeres normales o con otro tipo de neoplasia los resultados fueron negativos. La posibilidad de un diagnóstico precoz del cáncer ginecológico por medios inmunológicos no parece ser pues muy remota.

2.3.4.- Antígeno carcinoembrionario.

Tras la descripción del CEA en 1965 por GOLD y FREEDMAN pudo comprobarse que no era cierta la especificidad de este antígeno para las neoplasias gastrointestinales que sus descubridores le atribuían. En efecto, en diferentes tipos de neoplasia, entre ellas las ginecológicas, pudo detectarse el CEA en el plasma de los pacientes. Para el cáncer genital femenino los niveles plasmáticos más elevados de CEA han sido señalados para el cistoadenocarcinoma mucinoso de ovario (Van NAGELL y cols., 1975a) y para el carcinoma escamoso celular del cuello uterino (GOLDENBERG y cols., 1976a), si bien este antígeno se ha detectado también en las demás localizaciones de los tumores ginecológicos como vulva (Di SAIA y cols., 1976), endometrio (Van NAGELL y cols., 1977a) y mama (STEWART y cols., 1974). De la aplicación clínica de estas determinaciones nos ocuparemos más adelante.

Pero recientemente (PRIMUS y cols. 1975) se ha descrito una técnica de inmunoperoxidasas mediante la cual puede detectarse el CEA en los tejidos sometidos a exámen histopatológico. Mediante este procedimiento GOLDENBERG y cols. (1976a, 1976b) demostraron la presencia de CEA en diferentes tipos de tumores in-

cluidos los ginecológicos. Describen estos autores el caso de una paciente con un carcinoma epidermoide de cérvix cuyos valores plasmáticos para el CEA eran de 28 ng/ml. mientras que la concentración tumoral del mismo fué de 900 ng/gr. Por técnicas de inmunodifusión e inmunoelectroforesis se comprobó que el CEA del cáncer cervical era inmunológicamente idéntico al CEA del cáncer de colon si bien, por filtración en gel, el primero parecía corresponder a un peso molecular de 370.000, peso considerablemente superior al de 200.000 señalado normalmente para el CEA del cáncer colónico. En el cáncer cervical uterino el CEA se localizó casi exclusivamente en la superficie de las células tumorales cuando se estudiaron los cortes histológicos.

Posteriormente Van NAGELL y cols. (1977a) estudian el CEA plasmático y tisular en el cáncer endometrial, esto último también por la técnica de inmunoperoxidasas. En 4 de 22 piezas histológicas estudiadas pudo detectarse el CEA en concentraciones superiores a 5 ng/gr., no hallando correlación entre la cantidad de antígeno y el estadio clínico o grado de diferenciación del tumor. Tampoco existió relación entre los valores plasmáticos y tisulares de CEA. Al parecer las mayores cantidades de CEA se hallaban en la superficie de las células tumorales

pero con marcadas variaciones entre las diferentes áreas neoplásicas.

La falta de correlación entre los valores plasmáticos y tumorales de CEA había sido señalada ya por KHOO y cols., en 1973; en realidad no debe olvidarse que el metabolismo del CEA del que conocemos poco aún puede verse alterado por factores dependientes del huésped y ya hemos señalado anteriormente el valor del funcionalismo hepático y renal en este sentido.

En un trabajo anterior al que hemos citado, Van NAGELL y cols. (1975) estudiaron la relación entre niveles plasmáticos elevados de CEA en el cáncer ginecológico y una serie de características histológicas de los tumores como el tipo celular, infiltración linfoplasmocitaria, necrosis, invasión vascular y grado de diferenciación. La única característica histológica asociada a niveles elevados de CEA fué la presencia de invasión vascular, pero dado que un elevado porcentaje de pacientes cuyo tumor evidenciaba esta característica presentaban metástasis, el nivel de CEA puede reflejar más bien el grado de extensión de la enfermedad que la existencia de invasión vascular.

3. RESPUESTA INMUNE DEL HUESPED FRENTE AL TUMOR.

Desde hace unos años se viene trabajando en la investigación de las alteraciones inmunológicas que provoca el cáncer en el huésped y las reacciones inmunitarias que las neoplasias suscitan en el mismo.

Hasta ahora las evidencias de que el curso de la neoplasia humana puede ser influenciado por factores procedentes del sujeto enfermo si bien son valorables no han representado una gran ayuda práctica desde el punto de vista terapéutico pero constituyen un camino de estudio extraordinariamente prometedor y un capítulo decisivo en el progreso de la Medicina. Es por ello que resulta interesante todo intento de avanzar en el mismo.

Vamos a exponer a continuación las bases en que se apoya la hipótesis del papel de la inmunidad en el cáncer, bases constituídas en parte por datos experimental

les y en parte por observaciones clínicas en tumores humanos, y que en su conjunto apoyan la teoría de la supervisión inmunológica.

3.1.- Datos obtenidos en la experimentación animal.

3.1.1.- Inmunosupresión experimental.

La timectomía neonatal o el tratamiento de los animales con suero antilinfocítico producen una disminución de las reacciones inmunitarias dependientes del linfocito T que se traduce por ejemplo en una falta de capacidad del animal de experimentación para rechazar injertos tisulares extraños. Pero además, cuando dichos animales (ratones) son sometidos a la acción de carcinógenos químicos o virales, la incidencia de aparición de tumores en los mismos está aumentada en relación a los animales normales (GRANT y MILLER, 1965; ALLISON y LAW, 1968).

Este efecto puede observarse en su forma más dramática en el caso de tumores inducidos por virus DNA tales como polioma. El polioma es un pequeño virus DNA que cuando se inyecta en ratones recién nacidos induce la aparición de tumores en elevada proporción, consistentes en adenocarcinomas salivales y mamarios y osteosarcomas. En cambio los ratones adultos normales son resistentes a la oncogénesis por polioma-virus a pesar de que éste se multiplica intensamente en los órganos del huésped. Muchas colonias de ratones tanto de laboratorio como en estado libre están infectadas por este virus, hecho que se demue

tra por la presencia de anticuerpos séricos. A diferencia de otros tipos de virus oncogénicos, el polioma no es transmitido verticalmente desde la madre a la descendencia. Pero cuando la madre ha sido infectada los anticuerpos pasan a la prole que se ve así protegida frente al virus durante algunas semanas. Y sólo cuando esta protección masiva ha declinado puede adquirir el ratón joven la infección por polioma virus por un mecanismo de transmisión horizontal a partir de otros ratones de la colonia. Lo tardío de la infección explica probablemente la rareza con que se producen estos tumores.

De lo que acabamos de decir surge una cuestión fundamental: ¿por qué los animales recién nacidos son susceptibles a la oncogénesis por polioma virus (y a los efectos oncogénicos de otros tipos víricos) mientras que los ratones adultos se muestran resistentes?. Dos son las principales explicaciones que pueden entrar en consideración. Primera: el mayor grado de diferenciación de las células en el animal adulto puede hacerlas relativamente resistentes a la transformación maligna por el virus. Pero por otra parte puede existir en el animal adulto una respuesta inmunitaria efectiva frente a los antígenos específicos del virus que impide el desarrollo tumoral, mientras que dicha respuesta falta, es débil o retardada en

el ratón recién nacido.

Estas dos posibilidades pueden ser investigadas mediante la inmunosupresión del ratón adulto infectado por contacto o inoculado con el polioma-virus. El procedimiento inmunosupresor más eficaz es la timectomía seguida de inyecciones repetidas de globulina antilinfocítica. Todos los animales tratados de esta manera desarrollan tumores tras la infección como adultos.

Que los tumores son antigénicos y la importancia de la inmunidad celular mediada en la prevención del desarrollo tumoral, son dos hechos claramente evidenciables con los experimentos de restitución. El suero inumune procedente de ratones infectados confiere cierto grado de protección cuando se administra 24 horas antes que el virus (al parecer limita la diseminación del proceso infeccioso), pero carece de efecto alguno si se administra después del virus. Asimismo la inyección de células linfoides normales singénicas después de cesado el tratamiento con globulina antilinfocítica no proporciona ninguna protección. Por el contrario la transferencia de células linfoides procedentes de dadores singénicos inmunizados frente al tumor polioma-inducido, protege de forma muy eficaz a los animales. Los linfocitos de dadores inmunizados frente a tumores inducidos por otros virus diferentes, por

ejemplo adenovirus tipo 12, tampoco presentaban acción protectora.

La importancia de los linfocitos T en el control de la oncogénesis por polioma virus es reafirmada por los recientes trabajos de ALLISON y cols. (1974) y VANDE-PUTTE y cols. (1974) trabajando con ratones denominados "desnudos". Estos animales se llaman así porque debido a la actuación de un gen mutante autosómico recesivo, carecen congénitamente de timo y por tanto de células T, por lo que no pueden presentar fenómenos de inmunidad retardada; carecen además de pelo y sus folículos pilosos están reducidos a la mínima expresión. Los ratones "desnudos" (homocigotos, Nu/Nu) son difíciles de conseguir para estos estudios porque fallecen fácilmente por procesos infecciosos, pero mantenidos convenientemente en ambientes estériles pueden sobrevivir. Cuando estos animales se infectan por el virus a la edad de 6-8 semanas desarrollan múltiples tumores, de modo que a los 3 meses de la infección todos los ratones presentan tumores cutáneos diversos (incluyendo carcinomas de los folículos pilosos y glándulas sebáceas) y osteosarcomas, y muchos de ellos presentan además tumores de la glándula salival, renales y de otras localizaciones. En cambio, las crías heterocigotas (Nu/+) no desarrollan ningún tumor.

Así pues la principal razón por la que los ratones adultos que contraen la infección por polioma virus no desarrollan tumores, es el establecimiento de una eficaz respuesta inmunitaria celular mediada frente a las células. Esta respuesta depende de los linfocitos T pero desconocemos si estos intervienen directamente en la destrucción de las células del tumor aunque parece ser así (CEROTTINI y BRUNNER, 1974).

Cabe pensar por tanto que en los animales timectomizados en el período neonatal se produce una alteración de la "vigilancia" inmunológica", permitiendo de esta forma la proliferación de clonos de células mutantes antigénicamente distintas.

Fenómenos parecidos a los descritos para el polioma se han demostrado también con otros tipos de virus. ALLISON y cols. (1967 a) comprobaron que la administración de suero antilinfocítico aumenta la incidencia de aparición de tumores inducidos por adenovirus en cepas de ratones genéticamente resistentes.

Los hámsters recién nacidos inoculados con virus SV-40 desarrollan siempre tumores en unos cien días, mientras que estos sólo aparecen en una quinta parte de animales adultos y tras un intervalo de tiempo muy largo;

este período latente se reduce y la incidencia de tumores aumenta si se irradia previamente a estos ~~hámsters~~ hamsters adultos (ALLISON y cols., 1967 b).

Algunos tipos de poxvirus inducen la aparición de tumores que regresan tras un período de tiempo de uno a tres meses. La importancia del sistema inmunitario en este proceso de regresión se refleja en el hecho de que los animales tratados con metotrexate desarrollan tumores de mucho mayor tamaño y metástasis además de presentar un retardo en el proceso de regresión (ALLISON y FRIEDMAN, 1966).

Los efectos de la inmunosupresión sobre las leucemias y linfomas de los ratones son de especial interés en relación al aumento de neoplasias linforeticulares que aparece en pacientes humanos inmunodeprimidos. Se conoce desde hace tiempo el hecho de que la timectomía precoz reduce de manera importante la incidencia de leucemias en ratones inoculados con los virus de Gross o Moloney. La explicación más verosímil es que las células di-
na transformadas por el virus son los linfocitos T los cuales son depleccionados tras la timectomía. Claro está que la timectomía no puede ser utilizada como procedimiento inmunosupresor con estos virus. Sin embargo ALIISON y LAW (1968) han demostrado que la administración de suero

antilinfocítico potencia de manera importante la acción leucemógena del virus Moloney en algunos tipos de ratones. En estos animales se comprobó una elevada incidencia de reticulosarcomas muchos de los cuales se localizaron subcutáneamente en el lugar de la inyección de la globulina antilinfocítica. La aparición de la leucemia puede ser prevenida o retardada cuando se administran al animal células linfoides singénicas normales una vez cesado el tratamiento con suero antilinfocítico (LAW, 1972). Estos resultados apoyan el hecho de que el aumento de la susceptibilidad observada fué debido a la acción inmunosupresora del suero antilinfocítico.

También han aparecido diversos artículos sobre los efectos de la timectomía neonatal o la administración de suero antilinfocítico en la carcinogénesis química, habiéndose descrito interesantes resultados: por ejemplo un incremento de los tumores mamarios (no víricos) en ratones timectomizados neonatalmente (BURSTEIN y LAW, 1971); la aparición de nefroblastomas en ratas que toman 7,12 - dimetilbenzantraceno por vía oral únicamente cuando se les administra además suero antilinfocítico (BOURGOIN y cols., 1972); DENLINGER y cols. (1973) describen un hecho similar consistente en la aparición

de tumores vesicales en ratas tras la administración de ni trosometilurea sólo cuando se inyecta también suero anti-linfocítico.

BALNER (1970) señala una disminución del pe ríodo latente para la inducción de tumores cutáneos por hi docarburos cuando se administra suero antilinfocítico, pero en general los efectos de la inmunosupresión son menos mar cados en la carcinogénesis por químicos que en la secunda ria a virus (ALLISON y TAYLOR, 1967; PENN, 1970; WAGNER y HAUGHTON, 1971). Ello puede ser debido a las propiedades inmunosupresoras que sabemos poseen los carcinógenos quími cos como los hidrocarburos; en otras palabras una vez alcanzado el índice de inmunosupresión óptimo para el desarrollo tumoral, la acentuación de aquella ejerce escaso efecto.

Se ha comprobado que algunos tumores "espon-táneos" como linfomas en hámsters (GERSHON y CARTER, 1970) y tumores diversos en ratas (FISHER y cols., 1970) que nor malmente no metastatizan, presentan una diseminación cuan do se administra suero antilinfocítico al animal.

3.1.2.- Período carcinogénico latente.

Los tumores inducidos por agentes químicos presentan una gran variabilidad en su antigenicidad incluso cuando se inducen con la misma dosis del mismo carcinógeno en ratones singénicos.

Tiene gran importancia en lo que se refiere a la potencialidad antigénica del tumor provocado la duración del período latente entre la aplicación del agente oncogénico y la aparición del tumor. Cuanto más corto es aquel, más elevado es el potencial antigénico (más inmunógeno). Es decir, hay una relación inversa entre el potencial antigénico y la duración del tiempo de latencia que precede a la aparición del tumor. El juicio de antigenicidad se basa en el número máximo de células tumorales rechazadas por el animal preinmunizado pero admitidas por los huéspedes singénicos no tratados. El período de latencia se cuenta a partir de la administración del carcinógeno al huésped primario.

Son interesantes en este sentido los estudios de LAPPE (1968), que apoyan además la importancia de la supervisión inmunológica. Este autor aplicó una dosis baja de 3-metilcolantreno en la piel de un ratón tras lo cual injertó la piel tratada por el carcinógeno a otros

ratones singénicos. Estos animales receptores se dividieron en tres grupos: uno control, otro irradiado y un tercero pretratado con BCG. La incidencia y el período latente tumorales se vieron dramáticamente afectados por estos tratamientos de manera que la irradiación redujo el período latente, mientras que la inestímulo inespecífica con BCG prolongo dicho período y aumento el número de regresiones espontáneas de estos papilomas cutáneos.

3.1.3.- Inmunidad concomitante.

Quizás una de las cuestiones más interesantes acerca del posible papel de las reacciones inmunológicas en el crecimiento tumoral es, ¿ puede un animal portador de un tumor resistir la implantación de células de la misma línea tumoral en otra localización? . Además es importante conocer cual es la influencia del crecimiento progresivo del tumor originario sobre dicha resistencia.

La resistencia específica de un animal portador de un tumor a la inoculación del mismo tejido tumoral en otro punto, se conoce con el nombre de inmunidad concomitante. Dicho fenómeno viene describiéndose repetidas veces desde 1908 (BASHFORD).

KLEIN y cols. (1960) demostraron que los ratones portadores de tumores primarios inducidos por metilcolatreno se mostraban resistentes frente a la inoculación en otro punto con células del mismo tumor. Sin embargo MIKULSKA y cols. (1966) no pudieron demostrar esta inmunidad concomitante mientras el tumor estaba in situ. Tras la extirpación del tumor, la resistencia aparecía a los 14 días.

Estos dos resultados contradictorios constituyen una muestra de la complejidad del problema. Exis-

ten datos que sugieren que el resultado obtenido puede de pender del momento en que se realiza la prueba; en los es tados precoces del crecimiento tumoral el hallazgo de una inmunidad concomitante es la regla, pero a medida que el tumor progresa esta capacidad de resistencia frente a las reinoculaciones va desapareciendo progresivamente.

Estas variaciones en la resistencia antitu moral quedan también reflejadas en los tests in vitro para el estudio de la inmunidad celular-mediada, pruebas que por otra parte nos ilustran acerca de la confusión exis tente sobre algunos detalles de la inmunidad tumoral. BARD y cols. (1969) extirparon los ganglios linfáticos regiona les en ratones portadores de sarcomas inducidos química mente y comprobaron que ello no modificaba ni el crecimi ento del tumor primario ni la resistencia del animal a la reinoculación. Sin embargo tras la amputación tumoral se pudo transferir la inmunidad específica frente al tumor me diante las células de los ganglios linfáticos extirpados. BARSKI y YOUN (1969) emplearon la técnica de inhibición de colonias para investigar el efecto citotóxico de las célu las del exudado peritoneal del ratón, sobre las células de un tumor singé nico inducido por virus. En las fases ini ciales del crecimiento tumoral detectaron células citotóxi cas específicas, pero tras 4 semanas de desarrollo del tu

mor ello ya no era posible. Tras amputar la masa tumoral aquellas células pudieron evidenciarse de nuevo pero sólo tras un período de 7 días como mínimo. FRANCOIS y cols. (1971) demostraron que la reaparición de las células citotóxicas podía acelerarse mediante la inmunización de los ratones con células tumorales irradiadas. En un estudio anterior HELLSTROM y HELLSTROM (1969a) detectaron una inmunidad celular-mediada específica utilizando técnicas in vitro en ratones portadores de tumores inducidos por virus y comprobaron además que el suero de los animales portadores del tumor podía bloquear de forma específica las propiedades citotóxicas de sus células linfocitadas. Estas observaciones fueron aplicadas posteriormente por los mismos autores a diferentes modelos experimentales y a los tumores humanos (HELLSTROM y cols., 1971a). En un estudio sobre sarcomas inducidos por metilcolantreno en el cobaya, COHEN y cols. (1972) demostraron que había células citotóxicas específicas en el bazo del animal durante los primeros 28 días de desarrollo tumoral y que el suero de estos animales poseía una acción inhibitoria sobre dichas células, de modo que tras los 28 días la citotoxicidad celular había desaparecido por completo. LANDAZURI y HERBERMAN (1972) han investigado el proceso de desarrollo de células citotóxicas en el sistema linfático

de la rata tras la inoculación con un tejido tumoral viro-inducido. Comprobaron la presencia de dichas células en los ganglios linfáticos regionales 4 días después de la inoculación, mientras que la actividad citotóxica en los ganglios linfáticos, sangre periférica y cavidad peritoneal alcanzaba un máximo a los 14-21 días y luego disminuía.

La presencia de células citotóxicas específicas en un animal portador de un tumor en un momento en que la inmunidad concomitante no se detecta, constituye un enigma cuya mejor explicación puede ser la existencia de factores humorales inhibidores tal como describen HELLSTROM y HELLSTROM (1969a) COHEN y cols. (1972) y CURRIE y BASHAM (1972). En presencia de un tumor en crecimiento el huésped desarrolla células citotóxicas específicamente dirigidas contra los antígenos tumorales pero resultan ineficaces debido a que los fluidos extracelulares se hallan repletos de factores bloqueantes o inhibitorios. Ello puede explicar la falta de acción citotóxica de las células linfoides descrito por MISULSKA y cols. (1966). Esta hipótesis explicaría también el retardo en la aparición de células citotóxicas y la resistencia a la reinoculación tras la extirpación del tumor, ya que ello se seguiría de la desaparición de los factores inhibidores del

suero. CURRIE y GAGE (1973) han estudiado la influencia del crecimiento tumoral progresivo sobre los linfocitos citotóxicos y factores séricos bloqueantes en un sarcoma espontáneo metastatizante de la rata. En el período previo al desarrollo de metástasis detectables hubo una caída dramática en la actividad linfocítica de los ganglios linfáticos regionales, hecho que se asociaba a la desaparición de factores inhibidores en el suero y se produjeron micrometástasis a los 3-4 días de aparición de los mismos. Estos experimentos implican que el escape del tumor a los mecanismos de control del huésped y la subsiguiente diseminación, pueden ir asociados al desarrollo de una actividad inhibitoria en el suero, pero ello de ello nos ocuparemos ampliamente más adelante.

3.1.4.- La inmadurez y la senectud se asocian con frecuencia a una incompetencia relativa de la inmunogénesis antitumoral y favorecen la oncogénesis.

Desde el punto de vista experimental se comprueba que en general tanto para carcinógenos químicos como víricos, los animales recién nacidos presentan una mayor incidencia de tumores y un período de latencia más corto en comparación con los animales adultos. Existen dos explicaciones posibles a esta susceptibilidad del animal recién nacido para la oncogénesis. Una sería que la exposición precoz a los antígenos tumorales induce una tolerancia inmunológica. Otra posibilidad es que el animal adulto desarrolla rápidamente una respuesta inmune celular-mediada, mientras que en el recién nacido esto se establece lentamente. Cual de estos dos mecanismos es el cierto puede comprobarse administrando células esplénicas de animales inoculados por ejemplo con polioma-virus en el período neonatal a receptores inmunodeprimidos. Los resultados obtenidos demuestran que tanto en ratones (ALLISON, 1970) como en ratas (VANDEPUTTE y DATTA, 1972) la inoculación de los recién nacidos da lugar a una inmunidad celular eficaz pero tras un período de varias semanas. Así pues no

existe tolerancia para los antígenos específicos del polioma, sino un retraso en el desarrollo de la respuesta inmunitaria celular que permite a las células transformadas por el virus crecer hasta constituir masas demasiado grandes para ser controladas por la respuesta inmune en desarrollo.

El viejo presenta una depresión de la función inmune más acusada para los anticuerpos humorales que para la inmunidad retardada (KROHN,1962); sin embargo el rechazo de homoinjertos puede observarse deprimido en los animales viejos (STUTMAN, y cols.,1968). También sabemos que la epidemiología de la "edad del cáncer" se sitúa en el ser humano con una especial predilección a partir de las edades medias de la vida hasta la vejez , y que por otra parte los primeros años de la infancia ofrecen igualmente una notable incidencia de neoplasias. Ello coincide con las fases de la vida en que con mayor frecuencia se presentan también alteraciones de la inmunidad. Sin embargo todas estas afirmaciones no pueden establecerse de forma definitiva ya que si bien en animales de experimentación parece ser que al decaer la inmunidad a medida que envejece el animal, la incidencia de tumores malignos aumenta(TELLER y cols.1961,

1964; STJERNWARD, 1966; WIGZELL y STJERNWARD,1966),en el hombre no se ha llegado a relacionar exactamente la depresión de la inmunidad, la edad y el cáncer.

3.1.5.- La mayoría de agentes carcinógenos son también inmunosupresores.

Existe ciertamente una relación directa pero no absoluta entre la capacidad carcinogenética de algunos pacientes tanto físico-químicos como víricos y sus posibilidades inmunodepresoras (BERENBAUM, 1964). El mecanismo de esta acción inmunosupresora no está claro y puede variar según cada sustancia; podría deberse a una destrucción de tejido linfoide, a una inhibición de la respuesta primaria frente a los TSTA in vivo en las células que se transforman en neoplásicas, etc.,

Los agentes químicos carcinogénicos favorecen el efecto de los virus oncogénicos y al propio tiempo son capaces de deprimir la síntesis de interferon, no pudiendo excluirse que activen virus latentes de manera química y en el caso de los hidrocarburos policíclicos, la exposición del animal de experimentación a estos agentes poco después del nacimiento dá lugar a una prolongada falta de inmunidad retardada (DE MAEYER y cols.1965). Se ha comprobado que el metilcolantreno suprime la producción de anticuerpos humorales e interfiere marcadamente la capacidad de rechazar pequeños tumores trasplanta-

dos a ratones singénicos.

Solamente hay unas sustancias (los esteroides) que son inmunosupresores sin ser carcinogénicos, pero en general todos estos agentes favorecen el desarrollo de las neoplasias y la expansión de las metástasis.

3.1.6.- Los agentes inmunosupresores pueden ser poderosos carcinógenos.

Estas drogas que deprimen la respuesta frente al injerto también disminuyen el rechazo de los tejidos neoplásicos. Hemos visto antes como el suero antilinfocítico por ejemplo, facilita la oncogénesis experimental y que ello indicaría que la defensa anti neoplásica se debe primariamente a la inmunidad timo-dependiente puesto que el suero antilinfocítico se dirige contra las células de este tipo y raras veces sobre la inmunidad humoral.

Pero lo más interesante en este sentido es la capacidad carcinogénica que muestran diversos tipos de citostáticos empleados actualmente en el tratamiento del cáncer humano. Es de sobras conocido el importante efecto inmunosupresor que poseen dichas drogas y si bien no está clara la relación entre inmunosu presión y carcinogénesis, es un hecho digno de tener en cuenta (SCHMAHL, 1977).

En realidad hace ya treinta años (HADDOW y cols., 1948) que se señaló la posibilidad de que los quimioterápicos antineoplásicos pudieran ser cancerígenos; los trabajos con el 4-aminoestilbeno llevados a

cabo en el Chester Beatty Research Institute sobre animales de experimentación indicaban este peligro. El concepto tuvo que ser extendido al hombre cuando se comprobó que cierto quimioterápico (la clornaphacina) provocaba la aparición de neoplasias vesicales en los pacientes tratados con dicha droga (THIEDE y CHRISTENSEN,1969). Sin embargo el problema sigue siendo motivo de estudio en la actualidad como lo muestra bampliamente tratado que ha sido en el International Workshop on Multiple Primary Cancers celebrado recientemente en Nueva York (Memorial Sloan-Kettering Cancer Center,Octubre 1976) y en la National Cancer Institute Conference on the Delayed Consequences of Cancer Therapy: Proven and Potential (Orlando,Florida, Enero 1975).

Ello se comprende si tenemos en cuenta el considerable número de publicaciones aparecidas que señalan el desarrollo de neoplasias secundarias tras terapéuticas citostáticas diversas tanto en animales de experimentación (BOYLAND y HORNING,1949;HESTON,1949;SHIMKIN, 1954,1966; SCHMAHL, 1967;WEISBURGER y cols.; 1975;MARQUARD y cols., 1976) como en el hombre (KYLE y cols., 1970;PENN, 1974,1976;HOOVER y FRAUMENI, 1975;HUNSTEIN, 1975;PHILIPS y STERNBERG, 1975;SIEBER y ADAMSOM,1975; HARRIS,1976; ROSNER,1976; SCHMAHL y cols., 1977).

Es difícil extrapolar los datos obtenidos de la experimentación animal al hombre ya que existen factores dependientes del huésped como la especie, sexo, edad, estado hormonal, inmunológico y nutritivo, etc. que pueden influir sobre los resultados (SAFFIOTTI, 1971; WEISBURGER, 1973), pero a la luz de los conocimientos actuales puede afirmarse que: 1º los productos químicos carcinógenos para el hombre producen también cáncer en los animales de experimentación, y 2º los niveles de carcinógeno que se han comprobado ocasionan cáncer en el hombre, son cancerígenos en la misma proporción en los animales. (HARRIS, 1976).

Pero además los quimioterápicos pueden actuar como cocarcinógenos, es decir, potenciando la tumorigenicidad de los carcinógenos químicos ya sea incrementando la probabilidad de transformación neoplásica y/o facilitando la capacidad de estas células transformadas para progresar a cáncer clínicamente manifiesto.

Las drogas para las que se ha demostrado esta acción de cocarcinógeno en experimentos animales son el metotrexate (SHKLAR y cols., 1966; BARICH y cols., 1972), el fluoruracido (SOUTHAM y cols., 1969; TURBINER y SHKLAR, 1971), la azatioprina (NEMOTO y cols., 1971; SHEEHAN y cols.

1971), la ciclofosfamida (SOUTHAM y cols., 1969; SHEEHAN y SHKLAR, 1972), y los corticoesteroides (SHKLAR, 1966; POMEROY y HARDY, 1973). El metotrexate y la azatioprina pueden ser por sí solos carcinógenos débiles (CASEY, 1968; FRANKEL y cols., 1970; ROSCHLAU y JUSTUS, 1971), pero otros estudios experimentales no han podido comprobar la carcinogenicidad de la primera de estas drogas (SCHMAHL y OSSWALD, 1970; RUSTIA y SHUBIK, 1973; WEISBURGER y cols., 1975).

MARQUARDT y MARQUARDT (1977) señalan la utilidad de ciertas técnicas in vitro para el estudio de la potencial acción carcinógena de las drogas antineoplásicas. Se basan en la inducción de una transformación maligna en células de mamíferos en cultivo y en la mutagénesis (sobre levaduras, bacterias y células de mamíferos) que desencadenan los quimioterápicos.

Los autores refieren que estos métodos presentan una serie de ventajas sobre las técnicas in vivo principalmente por su sensibilidad, rapidez y facilidad de cuantificación, además de evitar posibles variaciones debidas por ejemplo a reacciones inmunológicas o a influencias hormonales. Señalan también que los resultados disponibles hasta el momento, indican una buena correlación entre la

tumoregenicidad in vivo y la actividad in vitro para diversos carcinógenos químicos.

Se ha demostrado que inducen la transformación maligna de las células en cultivo los agentes alquilantes (mostazas nitrogenadas) (FREEMAN y cols., 1973); antimetabolitos como el metotrexate (BENEDICT y cols., 1975) 5-fluorouracilo (JONES y cols., 1976) y arabinósido de citosina (JONES y cols., 1972; KOURI y cols., 1975); antibióticos como la actinomicina D, Daunomicina, Adriamicina (MARQUARDT y cols., 1976) y bleomicina (BENEDICT y cols., 1975); y algunas otras drogas como la hidroxiaurea (JONES y cols., 1972) y el uretrano (RAVISHANKAR y cols., 1975). Estos resultados concuerdan con la tumoregenicidad observada in vivo para los agentes alquilantes, uretano y algunos antibióticos (SCHMAHL y OSSWALD, 1970; SIEBER Y ADAMSON, 1975; WEISBURGER y cols., 1975). Se ha comprobado (MARQUARDT y cols., 1976) que dosis intravenosas únicas de Daunomicina o Adriamicina inducen la aparición de tumores mamarios en más del 60% de ratas hembras Sprague-Dawley, y que ambos antibióticos poseen una capacidad para inducir la transformación celular maligna en cultivo similar a la que presenta un potente carcinógeno, la N-metil-N'-nitro-N-nitro-soguanidina.

Sin embargo el problema se complica en el caso de algunos antimetabolitos como el metotrexate que si bien inducen la transformación maligna de células in vitro, no está clara su acción carcinogénica in vivo tal como se ha señalado ya anteriormente.

Por otra parte algunas de estas drogas son además mutagénicas como ocurre con la hidroxiurea, que a pesar de presentar esta doble acción no se ha demostrado hasta el momento que sea cancerígena in vivo.

La carcinogénesis y la mutagénesis son dos complejos procesos celulares similares en cierta manera dado que ambos ocasionan alteraciones heredables. De forma parecida también los carcinógenos químicos y los mutágenos tienen mucho en común especialmente desde el punto de vista metabólico de modo que la mayoría, o quizás todos los carcinógenos químicos pueden en última instancia producir mutaciones (MILLER y MILLER, 1971). Dada esta correlación las técnicas de mutagénesis pueden ser útiles para el estudio del posible papel oncogénico de los citostáticos.

Agentes alquilantes como la ciclofosfamida (ELLENBERGER y MOHN, 1975) y el mefalán (Mc CANN y

cols. 1975); antimetabolitos como el 5-fluorouracilo (MOUSTACCHI y MARCOVICH, 1963) y el arabinósido de citosina (HUBERMAN y HEIDELBERGER, 1972); antibióticos como la actinomicina-D (FISHER y cols., 1975), Daunomicina y Adriamicina (PANI y cols., 1975); y drogas como la hidroxiurea (TIMSON, 1975) y el uretano (MILLER y MILLER, 1971), han demostrado la capacidad de inducir mutaciones sobre bacterias, levaduras o células de mamíferos. Igual que antes se ha dicho, existe una buena correlación entre esta capacidad mutágena in vitro y la tumorigénesis in vivo para los alquilantes, el uretano y los antibióticos. En cambio para el 5-FU y otros análogos y la hidroxiurea no sólo no se comprueba esta correlación sino que además está en duda su acción mutagénica (HUBERMAN y HEIDELBERGER, 1972; TIMSON, 1975). Podríamos decir que si bien cualitativamente entre la oncogenicidad y la mutagenicidad de las sustancias químicas parece existir cierta correlación, desde el punto de vista cuantitativo un mutágeno potente no tiene porque ser necesariamente también un potente carcinógeno (MARQUARDT, 1976).

Si bien es necesaria una investigación más profunda en este sentido, todos estos estudios tan-

to in vivo como in vitro sugieren una posible acción cancerígena de diversos citostáticos para el hombre ya que muchos de estos fármacos presentan en su molécula grupos químicos que pueden ser carcinógenos en los animales de experimentación. Entre ellos podemos incluir mostazas nitrogenadas, ésteres activados como los del ácido metano-sulfónico, compuestos aromáticos como las aziridinas, epóxidos, algunas latonas o sulfonas y nitrosamidas o nitroureas. Sin embargo la presencia de cualquiera de estos grupos en una droga no significa automáticamente que dicho fármaco sea carcinógeno. Otros factores como la solubilidad, metabolismo, respuesta inmunitaria, inducción enzimática y variaciones de especie pueden afectar también la respuesta en los animales. Con todo, los grupos químicos citados antes son los que con más proba**bi**lidad pueden conferir una capacidad carcinógena a las moléculas orgánicas.

La manera de evitar este importante efecto indeseable de los citostáticos es motivo de estudio en la actualidad. Muy recientemente WEISBURGER (1977) trabajando con roedores señala que la carcinogenicidad de las combinaciones de quimioterápicos antineoplásicos es inferior en general a la de cada uno de los componentes de la asociación por separado. Utilizando com

binaciones de dos, tres y hasta cuatro drogas no sólo no se comprueba sinergismo entre las mismas, sino que además en la mayor parte de casos cada fármaco parece inhibir o suprimir los efectos carcinógenos de los otros. Señala la autora que la tendencia actual en la utilización de combinaciones quimioterápicas para el tratamiento del cáncer queda experimentalmente justificada.

Este "efecto protector" se había comprobado ya anteriormente para algunas asociaciones de carcinógenos experimentales como el 2-acetilaminofluoreno y 3-metilcolantreno (MILLER y cols., 1958), aflatoxina B₁ y dietilestilbestrol (NEWBERNE y WILLIAMS, 1969) 7,12-dimetilbenzantreno y DDT (SILINSKAS y OKEY, 1975).

Pero no sólo son los quimioterápicos antineoplásicos sino que también las radiaciones pueden ser carcinógenas tanto para el hombre como para los animales de experimentación (MILLER, 1972). Pero por otra parte las radiaciones pueden tanto facilitar como retardar la aparición de tumores inducidos por carcinógenos químicos (SAXEN, 1952; LISCO y cols., 1958; NEMOTO y cols., 1971; VOGEL y ZALDIVAR, 1971; NAGAYO y cols., 1972) y no se conocen los mecanismos de estas acciones tan divergentes. Sin embargo parece importante la dosis y régimen de irradiación y el intervalo

de tiempo entre ésta y la administración del carcinó-
geno químico.

3.2.- Evidencia clínica para reacciones inmunológicas a tumores humanos.

Los datos obtenidos hasta el momento de las investigaciones realizadas en animales de experimentación permiten llegar a las siguientes conclusiones. Los tumores son antigénicos. El huésped reacciona frente a los mismos de manera inmunológicamente específica, pero dichas reacciones resultan finalmente superadas. Las posibles explicaciones a este escape de las células tumorales frente a los mecanismos defensivos del huésped serán expuestos posteriormente. Sin embargo existen motivos para pensar que al menos en animales, reacciones inmunológicas específicas contribuyen a la resistencia del huésped frente al crecimiento y diseminación tumorales.

Ahora bien, ¿puede ser obtenida esta conclusión para el cáncer humano ?. Evidentemente cualquier intento de experimentación con tumores humanos requiere unos sistemas de estudio totalmente distintos ya que las técnicas de trasplante no son ni técnica ni éticamente factibles. Observaciones acerca de la historia natural de pacientes cancerosos han sugerido con frecuencia la importancia de la resistencia del huésped frente al crecimiento tumoral aunque no conocemos exactamente los mecanismos de dicha resis

tencia y la contribución de los fenómenos inmunológicos a la misma permanece aún en el terreno de la especulación. No obstante disponemos de datos obtenidos del estudio de casos individuales que apoyan esta posibilidad. Pasamos a exponer a continuación estos hechos de la observación clínica que abogan en favor de un papel de la inmunidad frente al cáncer en el hombre.