

UNIVERSIDAD DE SANTANDER

FACULTAD DE MEDICINA

TESIS DOCTORAL

" ESTUDIO EXPERIMENTAL SOBRE LA INFLUENCIA DE LAS
HORMONAS PINEALES EN LA GENESIS Y DESARROLLO
DE TUMORES MAMARIOS HORMONODEPENDIENTES "

Autor : Dn. SAMUEL COS CORRAL

Director : Dr. E.J. SANCHEZ BARCELO

Departamento de Fisiología Humana

Marzo 1986

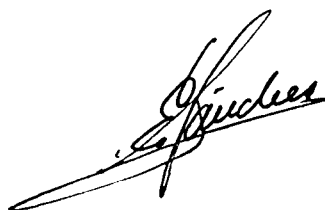
TESIS REMITIDA POR SAMUEL COS CORRAL PARA
OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN MEDICINA Y CIRUGIA
POR LA UNIVERSIDAD DE SANTANDER.

Marzo 1986

Dn. E.J. SANCHEZ BARCELO, Doctor en Medicina y Cirugía por la Universidad de Santander y Profesor Titular del Departamento de Fisiología Humana de la Facultad de Medicina de la Universidad de Santander

CERTIFICA : que la presente Tesis " ESTUDIO EXPERIMENTAL SOBRE LA INFLUENCIA DE LAS HORMONAS PINEALES EN LA GENESIS Y DESARROLLO DE TUMORES MAMARIOS HORMONODEPENDIENTES ", presentada por Dn. Samuel Cos Corral para optar al grado de Doctor en Medicina y Cirugía, ha sido realizada bajo mi dirección en el Departamento de Fisiología Humana de la Facultad de Medicina de Santander y puede presentarse para su defensa ante un tribunal.

Y para que conste y surta los efectos oportunos, expido el presente certificado en Santander a quince de marzo de mil novecientos ochenta y seis.



Fdo.: E.J. Sánchez Barceló

Este trabajo ha sido financiado en parte con una ayuda de
la Caja de Ahorros de Santander y Cantabria.

A Elvira

A mis padres y hermana

" Para realizar un gran sueño, lo primero que hace falta es una gran aptitud para soñar; luego, persistencia, que es la fe en el sueño de uno "

Dr. Hans Selye

AGRADECIMIENTOS

Desde estas líneas quiero expresar mi agradecimiento a cuantos, de forma desinteresada, han contribuido a la realización de este trabajo, sin cuya ayuda no hubiera sido posible. Resulta para mi un deber y una satisfacción mostrar mi más sincero reconocimiento :

- De manera especial al Dr. E.J. SANCHEZ BARCELO, quien durante estos años me enseñó a "moverme" en un laboratorio, por sus sabios consejos, por haber orientado mis pasos en la Fisiología experimental, encauzando mi interés por este tema en particular, que no es más que un desarrollo de experiencias tuyas, y por su afabilidad, cordialidad y simpatía, que me hicieron encontrar en él no sólo a un director encomiable sino a un gran amigo.

- A la Dra. M.D. MEDIAVILLA, por su inestimable ayuda y estímulo durante estos años.

- Al Dr. J. JORDA, por haberme permitido realizar mi Tesis Doctoral en el Departamento de Fisiología.

- Al Dr. J.L. BARDASANO, por su valiosa orientación y ayuda en el estudio morfológico pineal.

- A los Dres. M. LAFARGA y M.T. BERCIANO, por su dirección y colaboración en el desarrollo del estudio histológico de los ovarios.

- A la Dra. F. GARIJO, así como a A. TOLEDO y J. CORRAL, por su colaboración en el estudio citológico e histopatológico de los tumores.

- A la Dra. M.D. GUTIERREZ CORTINES, por su inapreciable ayuda en la realización de las técnicas analíticas.

- A R. FERNANDEZ, con la que he tenido la suerte de compartir innumerables horas de trabajo y en quien siempre encontré palabras de ánimo.

- A todos los integrantes del departamento de Fisiología : INMACULADA, M^a JOSE, LUIS, PABLO; que me han hecho más gratos los años dedicados a este trabajo.

INDICE

- INTRODUCCION	1
I - FISILOGIA DE LA GLANDULA PINEAL	3
I.1 - Anatomía de la glándula pineal - Características morfológicas	3
I.2 - Hormonas de la glándula pineal - Melatonina	7
I.2.1 - Síntesis	7
I.2.2 - Metabolismo	9
I.2.3 - Regulación de la síntesis	9
I.2.4 - Lugar de vertido	17
I.2.5 - Sitios de acción	17
I.2.6 - Acciones de la melatonina	20
I.3 - Acciones de la glándula pineal sobre la reproducción	21
I.4 - Factores potenciadores de la actividad pineal	23
I.4.1 - Tratamiento neonatal con esteroides	24
I.4.2 - Anosmia	24
I.4.3 - Subnutrición	25
I.4.4 - Exposición a bajas temperaturas	25
I.5 - La glándula pineal como transductor neuroendocrino	26
II - TUMORES MALIGNOS HORMONODEPENDIENTES	28
II.1 - Concepto de tumor hormonodependiente	28
II.2 - Receptor esteroideo - Mecanismo de acción de las hormonas esteroideas	29
II.3 - Significado clínico de los receptores estrogénicos	31
II.3.1 - En la respuesta a la hormonoterapia	31
II.3.2 - En el pronóstico	32

II.4 - Receptores estrogénicos en la glándula mamaria	
normal y neoplásica	33
III - CARCINOGENESIS EXPERIMENTAL	37
III.1 - Agentes carcinógenos	38
III.1.1 - Inoculación de virus oncógenos	38
III.1.2 - Radiación	38
III.1.3 - Hormonas	39
III.1.4 - Carcinógenos químicos	40
III.1.4.1 - Hidrocarburos aromáticos polinucleares	42
III.2 - Modelo experimental de tumor mamario en rata	
inducido por DMBA. Tumor de Huggins	45
III.2.1 - Características anatomopatológicas	46
III.2.2 - Características bioquímicas	47
III.2.3 - Hormonodependencia del Tumor de Huggins	48
III.2.4 - Protocolos de inducción tumoral	50
III.2.5 - Factores que influyen en la inducción del	
cáncer mamario con DMBA	51
IV - RELACION ENTRE LA GLANDULA PINEAL Y EL CANCER ...	55
IV.1 - Datos epidemiológicos	56
IV.2 - Datos experimentales	57
IV.2.1 - Glándula pineal y desarrollo tumoral en	
modelos animales	57
IV.2.2 - Cambios morfológicos, bioquímicos y	
fisiológicos de la glándula pineal en	
relación con los procesos neoplásicos	69
IV.2.3 - Interacción entre la melatonina y los	
receptores estrogénicos de los tumores	
hormonodependientes	72

IV.3 - Glándula pineal y neoplasias humanas	73
IV.4 - Hipótesis sobre los mecanismos de acción de la glándula pineal en procesos neoplásicos	75
- JUSTIFICACION	84
- OBJETIVOS	87
- SERIES EXPERIMENTALES	89
- MATERIAL Y METODOS	99
1 - ANIMALES DE EXPERIMENTACION	99
2 - CONDICIONES EXPERIMENTALES	99
3 - TECNICAS QUIRURGICAS	102
3.1 - Anestesia	102
3.2 - Ceguera	104
3.3 - Pinealectomía	104
3.4 - Bulbectomía olfatoria	108
3.5 - Ovariectomía	109
3.6 - Pseudo-operaciones	109
3.7 - Cuidados postoperatorios	109
4 - PAUTA DE ADMINISTRACION DEL ESTRADIOL	110
5 - INDUCCION TUMORAL	110
6 - VALORACION TUMORAL	111
6.1 - Medida de la superficie tumoral	111
6.2 - Controles de citología por punción tumoral	111
6.3 - Biopsias tumorales	112
7 - DURACION DEL EXPERIMENTO	113
8 - RECOGIDA DE DATOS	113
9 - TECNICAS HISTOLOGICAS	118
10 - TECNICAS ANALITICAS	122
11 - ANALISIS ESTADISTICO Y DISEÑO GRAFICO	132

- RESULTADOS	141
1 - SERIE I	142
2 - SERIE II	206
3 - SERIE III	257
4 - ESTUDIOS MORFOLOGICOS	301
4.1 - Ovario	301
4.2 - Glándula Pineal	306
4.3 - Mamas tumorales y no tumorales	313
- DISCUSION	325
1 - DISCUSION DEL METODO	326
1.1 - Elección de un modelo de carcinoma mamario experimental	326
1.2 - Criterios de valoración tumoral	327
1.3 - Maniobras modificadoras de las acciones pineales	329
1.4 - Valoración de la actividad pineal	330
Valoración global de nuestro diseño experimental	331
2 - DISCUSION DE LOS RESULTADOS	333
2.1 - Estado funcional de la pineal	333
2.2 - ¿Influye la actividad pineal en la génesis de tumores mamaris?	335
2.3 - ¿Cómo puede justificarse la acción inhibidora de la pineal sobre la génesis tumoral?	338
2.4 - ¿Influye la actividad pineal sobre el crecimiento de tumores ya desarrollados?	340
2.5 - Mecanismo de influencia pineal sobre el crecimiento tumoral	341
2.6 - ¿Es posible hablar de acciones antiestrogénicas	

pineales?	343
- CONCLUSIONES	349
- BIBLIOGRAFIA	354

INTRODUCCION

De este modo, con el fin de facilitar la comprensión del tema, inicialmente se presenta una amplia revisión de la fisiología de la glándula pineal, así como de las características de los tumores mamarios hormonodependientes y del modelo tumoral elegido en nuestro trabajo, para finalmente recoger la información sobre la relación pineal-neoplasias y más específicamente pineal-adenocarcinoma mamario.

I - FISILOGIA DE LA GLANDULA PINEAL

I.1 - Anatomía de la glándula pineal - Características morfológicas

La glándula pineal de los mamíferos es un pequeño órgano, con forma de piña, situado en la línea media del encéfalo, en posición supra o infracallosal, dependiendo de la especie considerada. En los roedores está situada sobre el borde superior del cuerpo calloso, inmediatamente por debajo de la confluencia de los senos venosos longitudinal y transversos. La figura 1, tomada de Bardasano J.L. (1978), muestra la topografía de la pineal en la rata de laboratorio. Su tamaño, en los roedores, está en relación con la latitud geográfica del hábitat de la especie considerada (Quay W.B. 1980).

Una característica importante es su gran vascularización, proviniendo la mayoría de la sangre que llega a la pineal de las arterias cerebrales posteriores (Goldman H., Wurtman R.J. 1964); generalmente entre 4 y 6 ramas de esta arteria penetran en la glándula, drenando directamente a los senos venosos.

La glándula pineal está formada por dos tipos de células, los

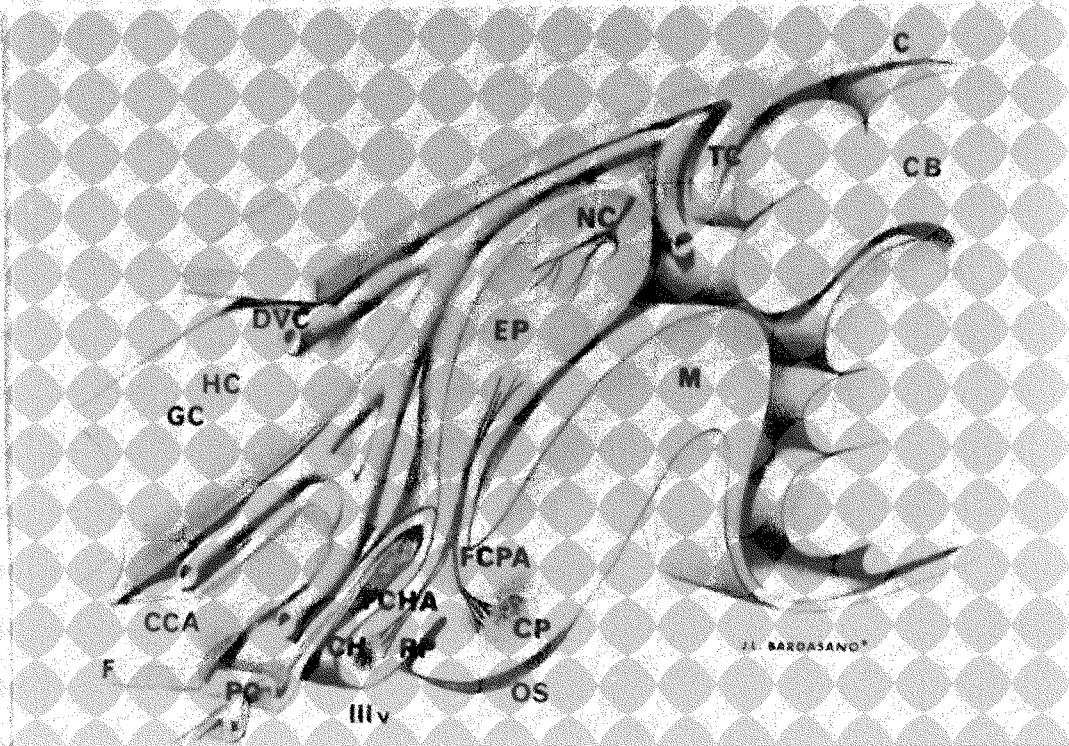


Fig. 1. Situación y relaciones de la glándula pineal en la rata.

Tomado de Bardasano J.L. (1978).

C	- Cráneo.	FCPA	- Fibras comisuro- posteriores.
NC	- Nervios conarios.	OS	- Organo subcomisural.
HC	- Hemisferio cerebral.	PC	- Plexos coroideos.
EP	- Epífisis o glándula pineal.	CB	- Cerebelo.
FCHA	- Fibras comisuro-habenulares.	CH	- Comisura habenular.
CP	- Comisura posterior.	CCA	- Cuerpo caloso.
M	- Mesencéfalo.	F	- Fornix.
RP	- Recessus pineal.	DVC	- Vena cerebral.
TC	- Tienda del cerebelo.	IIIv	- Tercer ventrículo.
GC	- Circunvolución del cíngulo.		

pinealocitos, células con características secretoras en los mamíferos y fotorreceptoras en los invertebrados. Entre sus características morfológicas, destaca la existencia de numerosas prolongaciones citoplasmáticas que terminan en los espacios perivasculares (Arstilla A.V. 1967), y la presencia de gránulos de secreción que hacen prominencia en estos espacios, cuya concentración varía a lo largo del día, siendo baja durante el día y aumentando en la oscuridad, estrechamente relacionada con la síntesis de melatonina a nivel de esta glándula (Kachi T. 1979). Entre estas células están situadas otras, similares a los astrocitos, y cuya misión parece ser de soporte de los pinealocitos (Rio Hortega P. 1929).

La pineal en los roedores, al igual que en los vertebrados inferiores, está formada por un verdadero complejo pineal, más que por un órgano simple, constando de una parte profunda, situada en la región intercomisural, y otra superficial, justo debajo de la confluencia de los senos venosos, unidas por un fino tracto parenquimatoso; la pineal superficial representa la mayor parte del complejo pineal y se corresponde con el órgano pineal único de las descripciones clásicas; la parte profunda posee una gran importancia funcional, al estar íntimamente relacionada con el tercer ventrículo, apreciándose incluso pinealocitos en contacto directo con el líquido cefalorraquídeo (Hewing M. 1980).

Otra característica morfológica interesante por su trascendencia funcional, es la ausencia de barrera hematoencefálica a nivel de la glándula (Moller M. y cols. 1978).

La inervación de la glándula depende de las fibras postganglionares del ganglio cervical superior, tal como describió Ramón y

Cajal S. (1911), que acompañando a los vasos sanguíneos entran en la glándula, bien separadamente o en forma de uno o dos troncos, los nervios conarios, terminando directamente sobre los pinealocitos (Warwick R., Williams P. 1973). En estas terminaciones simpáticas se han descrito pequeñas vesículas que contienen noradrenalina y serotonina, cuyo número varía siguiendo ritmos sincronizados con el fotoperíodo (Mukai S., Matsushima S. 1980). En algunas especies de mamíferos se ha descrito también la existencia de innervación parasimpática que, originada en el núcleo salivatorio superior del puente y a través de ramas del nervio petroso mayor, llega a la pineal (Romijn H.J. 1975; Taylor R.L. y cols. 1980).

Además de esta innervación simpática y parasimpática, existen datos a favor de la existencia de conexiones directas entre la pineal y el SNC, fundamentalmente con la habénula y el núcleo paraventricular hipotalámico (Dafny N. 1980; Buijs R.M., Pevet P. 1980; Ronnekleiv O.K., Moller M. 1979; Semm P., Vollrath L. 1978).

Un hecho que frenó el estudio de la fisiología pineal es la presencia de calcificaciones a nivel de la glándula, observado por rayos X, considerando este órgano inerte a partir de la pubertad. Los componentes básicos de estas concreciones calcáreas intraglandulares son : calcio, fósforo y trozos de estroncio (Krstic R., Golaz J. 1977). Reiter R.J. y cols. (1976) formularon una interesante teoría según la cual relacionan la presencia de estas calcificaciones con hiperactividad de la glándula, contrariamente a lo que se suponía hasta esos momentos. En la actualidad los estudios sobre las calcificaciones pineales han cobrado nuevo interés, al atribuírseles funciones relacionadas con la etiología del cáncer de mama, como veremos más adelante (Cohen M. y cols. 1978).

1.2 - Hormonas de la glándula pineal - Melatonina

En la glándula pineal se han descrito numerosas sustancias, tales como indolaminas, catecolaminas, alfa MSH, renina, neuropéptidos como TRH, LHRH, AVT y AVP, etc.. Sin embargo, sólo en el caso de las indolaminas y especialmente de la N-Acetil-5-Metoxi-Triptamina (melatonina), hay datos concluyentes sobre su origen pineal y sus acciones hormonales. Por este motivo limitaremos nuestro estudio a estos componentes pineales.

1.2.1 - Síntesis

La melatonina ha sido la primera sustancia aislada de la glándula pineal, por Lerner A. y cols. en 1958, siendo químicamente identificada como N-Acetil-5-Metoxi-Triptamina. Su síntesis se produce en los pinealocitos, los cuales poseen los enzimas necesarios para la formación de esta indolamina. Se realiza en dos etapas (Figura 2) a partir del triptófano captado de la circulación sistémica (Reppert S.M., Klein D.C. 1980; Balemans M.G.M. 1979). Primeramente se sintetiza serotonina, por la acción sucesiva de la triptófano hidroxilasa y la L-aminoácido aromático decarboxilasa. En la segunda etapa, la serotonina se convierte en N-acetil-serotonina, por la acción de la N-acetil-transferasa (NAT) y posteriormente en melatonina, por acción de la hidroxí-indol-orto-metil-transferasa (HIOMT), enzima que, al igual que la melatonina, se pensó en un principio que eran exclusivas de la pineal, siendo posteriormente aisladas en la retina (Cardinali D.P., Rosner J.M. 1971; Wiechmann A.F. y cols. 1985), órgano de Harder (Vlahakes G.H., Wurtman R.J. 1972) y tracto gastrointestinal de la rata (Quay W.B., Ma Y.H. 1976), demostrándose la síntesis de melatonina en

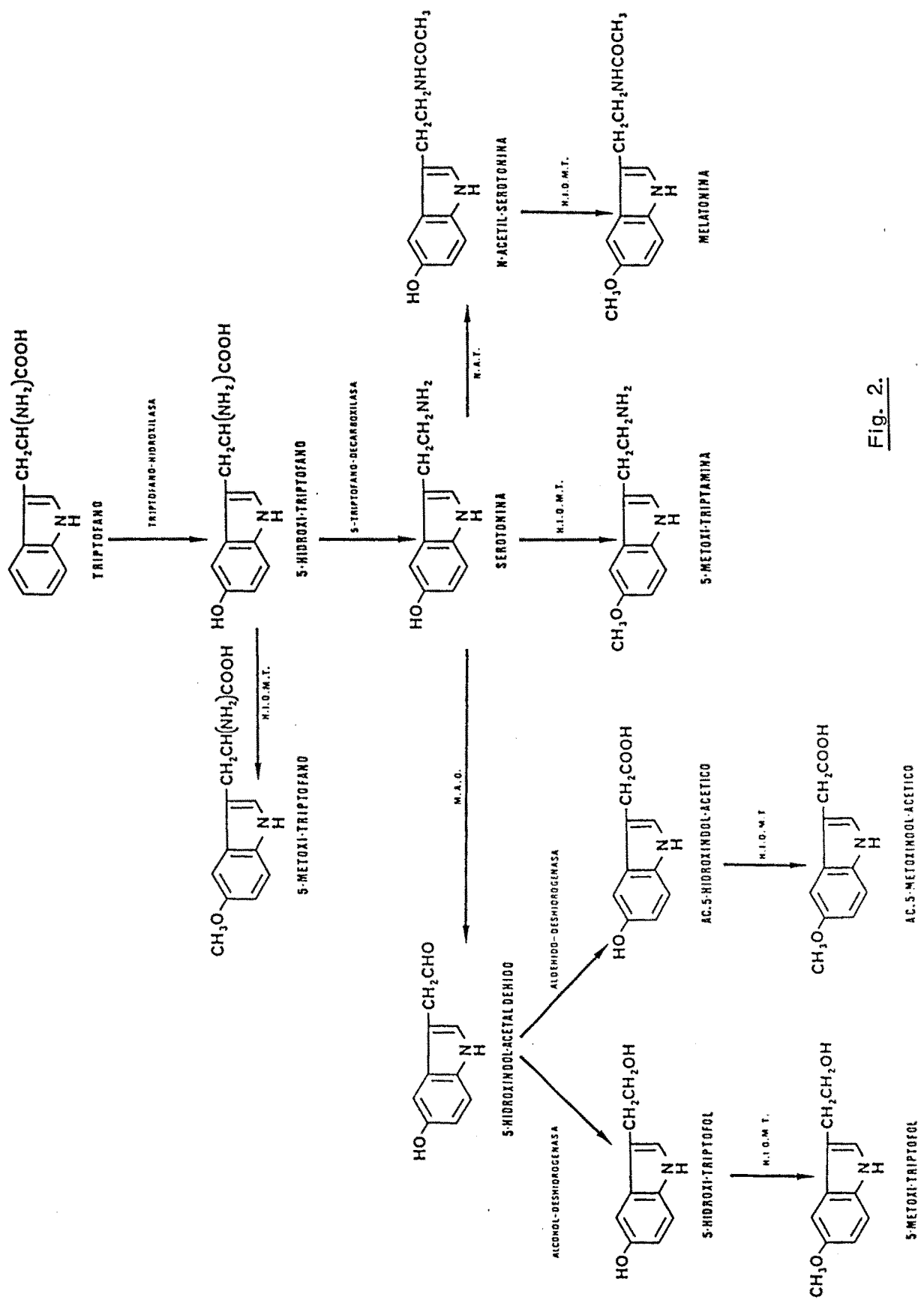


Fig. 2.

estas localizaciones (Pevet P. y cols. 1978; Balemans M.G.M. y cols. 1980). Una vez sintetizada la melatonina es liberada por la pineal, siendo detectada en sangre y fluido cerebrospinal. En la circulación el 67 % de la melatonina aparece unida a la albúmina.

I.2.2 - Metabolismo

El sitio primario de degradación de la melatonina es el hígado, básicamente por dos vías :

- formación de 6-hidroximelatonina en el sistema microsomal hepático, eliminándose posteriormente conjugada con sulfato o ácido glucurónico; representa el 80 % del metabolismo total (Kveder S., Mc Isaac W.M. 1961).

- formación de 5-metoxi-kinurenamina (Hirata F. y cols. 1974).

I.2.3 - Regulación de la síntesis

La síntesis de melatonina dentro de la pineal está regulada por dos tipos de mecanismos : un control de tipo neural y otro control hormonal (Figura 3, tomada de Cardinali D.P. 1984).

CONTROL NEURAL

La formación de melatonina no es uniforme a lo largo del día, sino que presenta un ritmo circadiano, estrechamente relacionado con la alternancia de la luz ambiental (Figura 4). La concentración de melatonina es elevada durante la noche en todas las especies de mamíferos

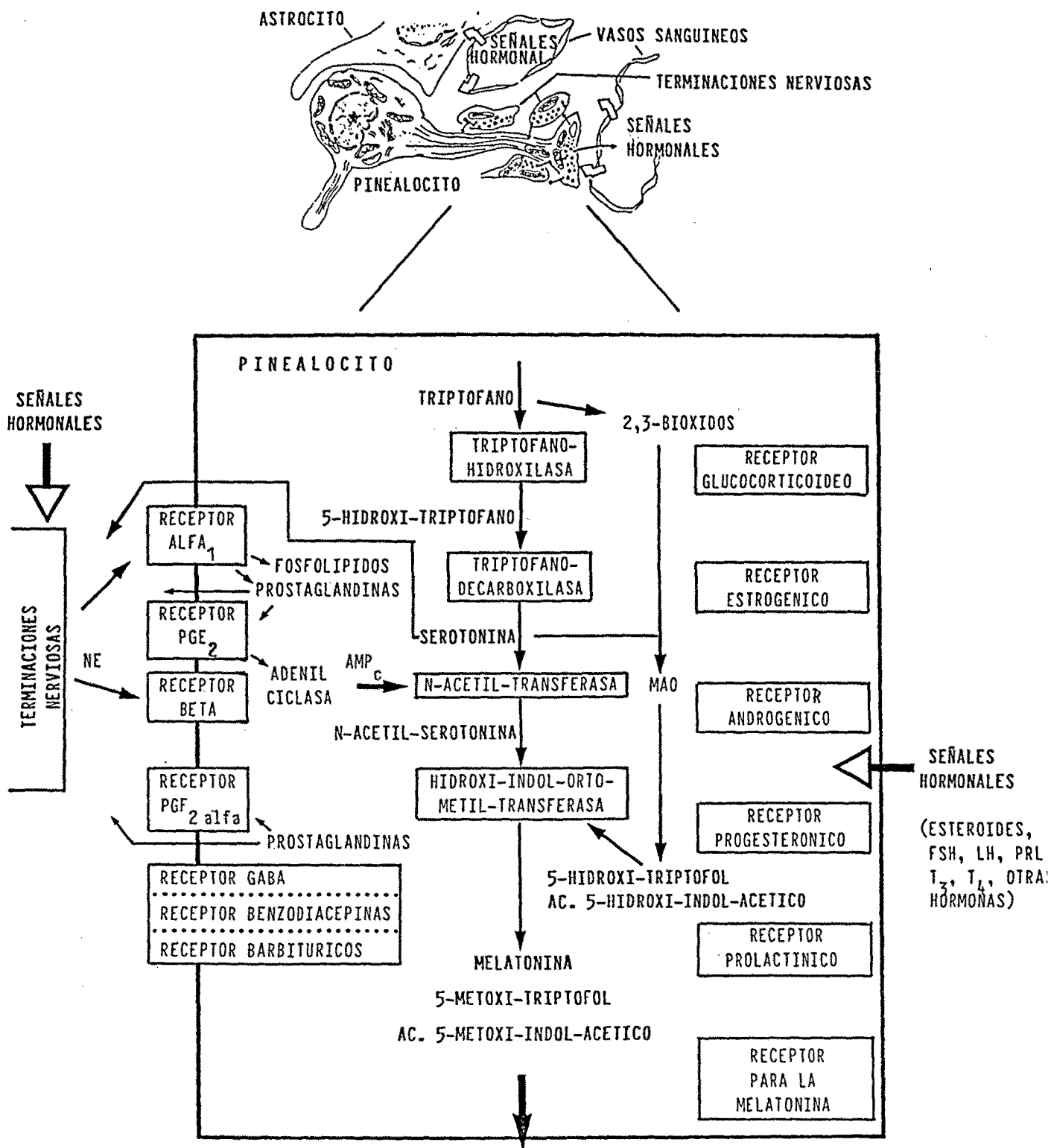


Fig. 3. Representación esquemática de los mecanismos involucrados en el control neural y hormonal de la síntesis de melatonina. Tomado de Cardinali D.P. (1984).

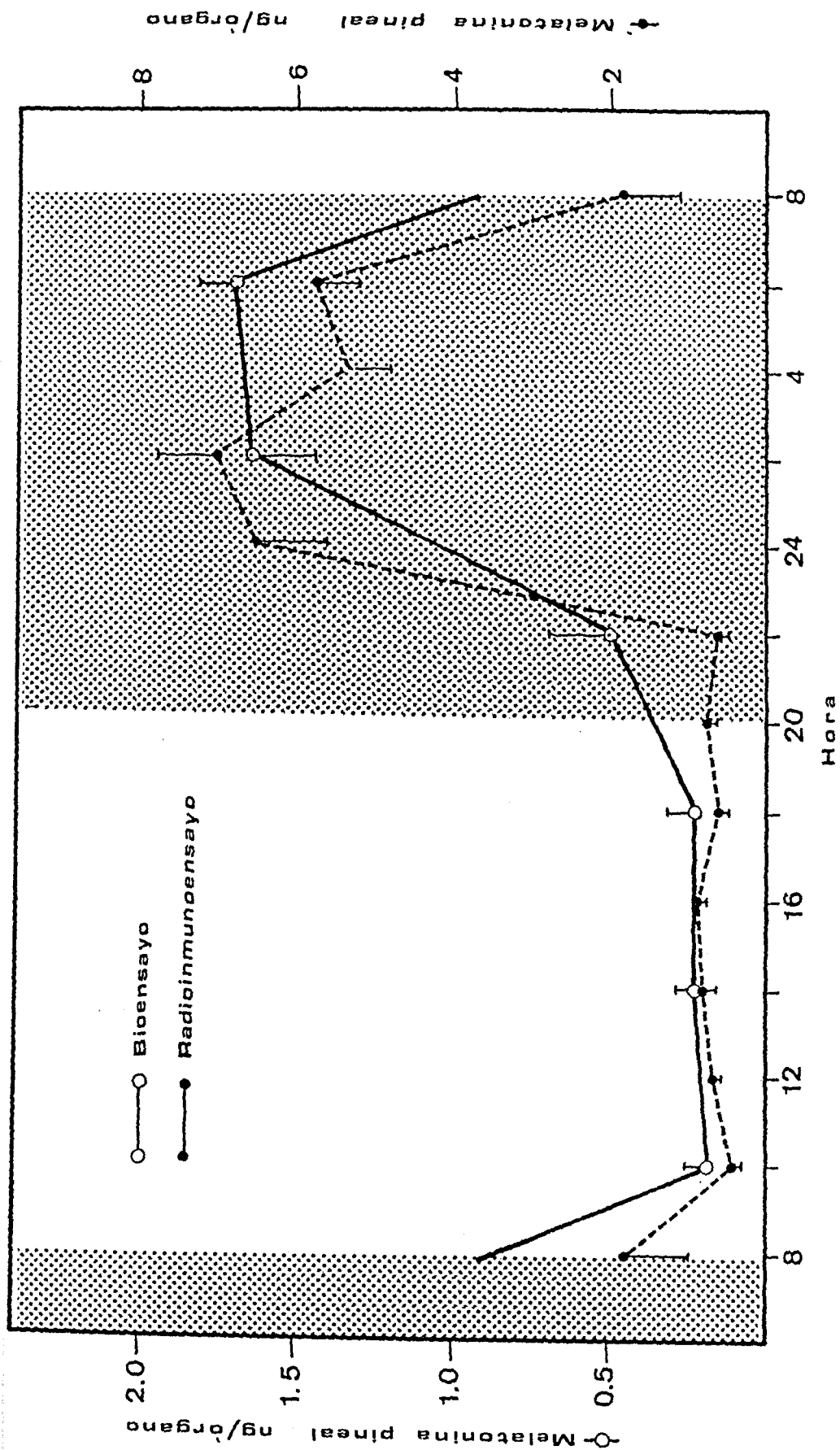


Fig. 4. Variaciones circadianas de la concentración de melatonina en la glándula pineal.

estudiadas, incluyendo la rata, el hamster y el hombre. Este aumento de melatonina, durante la fase de oscuridad, se correlaciona con un aumento, en la pineal, de los enzimas que intervienen en su síntesis, fundamentalmente de N-acetil-transferasa, que puede aumentar de 30 a 50 veces durante la noche (Axelrod J.R. y cols. 1965; Klein D. C., Weller J.L. 1970) (Figura 5, tomada de Reppert S.M., Klein D.C. 1980).

La mayor producción de melatonina durante la noche es una constante en todos los animales, variando, sin embargo, los patrones de producción dependiendo de la especie que se considere (Rollag M.D. y cols. 1978; Tamarkin L. y cols. 1979); el significado de estas diferencias no ha sido aún aclarado, aunque podría ser una respuesta adaptativa a las características luminosas del hábitat de cada especie.

La acción inhibidora de la luz sobre la síntesis de melatonina, se lleva a cabo, básicamente, a través de la supresión de la actividad de la N-acetil-transferasa (Figura 6, tomada de Klein D.C., Moore R.Y. 1979).

La alternancia luz/oscuridad va a ejercer su modulación sobre la actividad sintética y secretora de la pineal a través de una complicada vía neural : los receptores de la información luminosa destinada a la pineal van a ser los conos y bastones retinianos, siendo el espectro luminoso capaz de inhibir la actividad enzimática de la pineal, superponible al espectro de absorción de la rodopsina de los bastones (Wurtman R.J. 1975); a través de los axones de las células ganglionares retinianas se va a transmitir la información al núcleo supraquiasmático del hipotálamo, por una vía monosináptica conocida como tracto retino-hipotalámico; de este

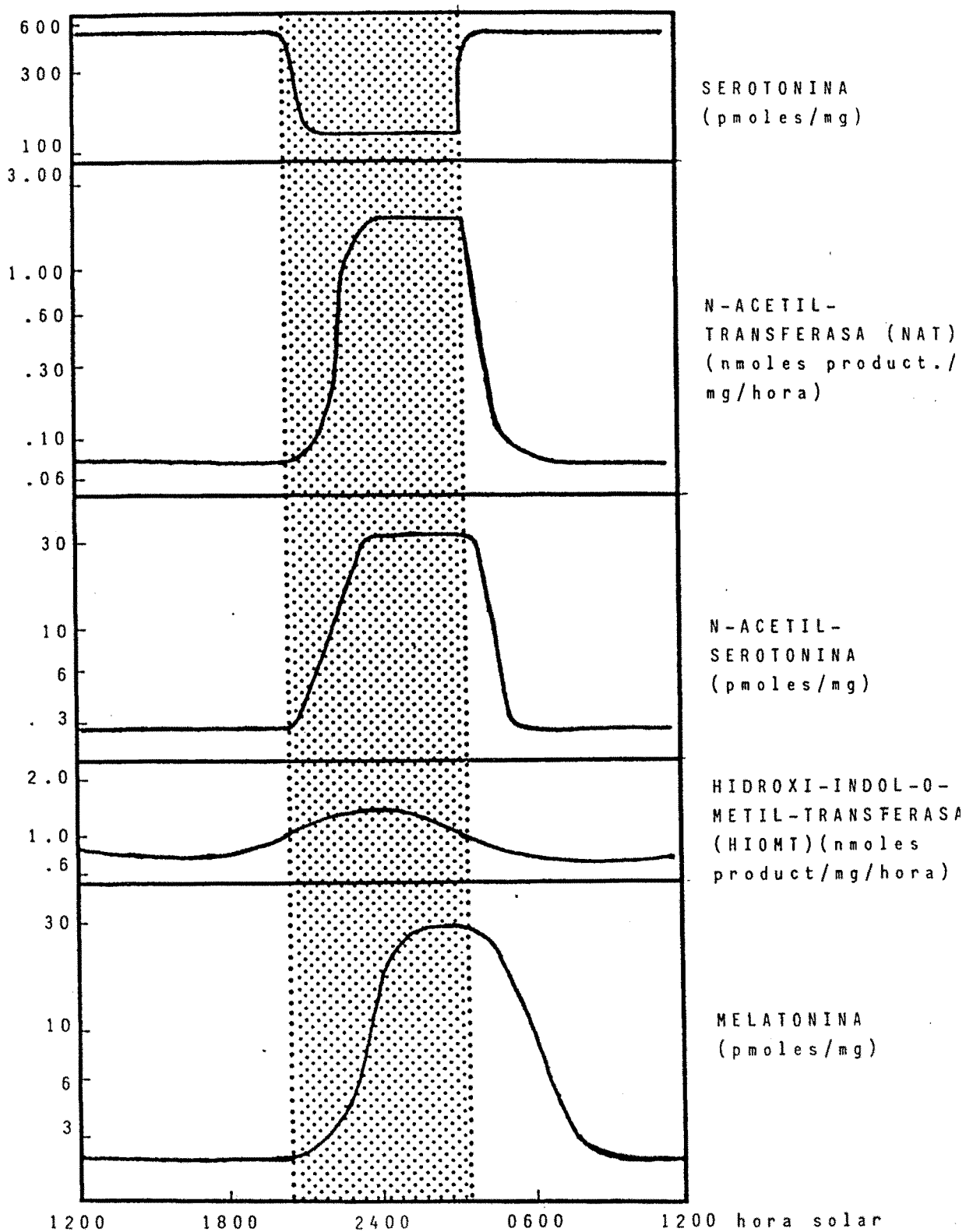


Fig. 5. Variaciones circadianas en la concentración de metabolitos y actividad de los enzimas implicados en la síntesis de melatonina. La zona punteada corresponde al período de oscuridad. Tomado de Reppert S.M., Klein D.C. (1980).

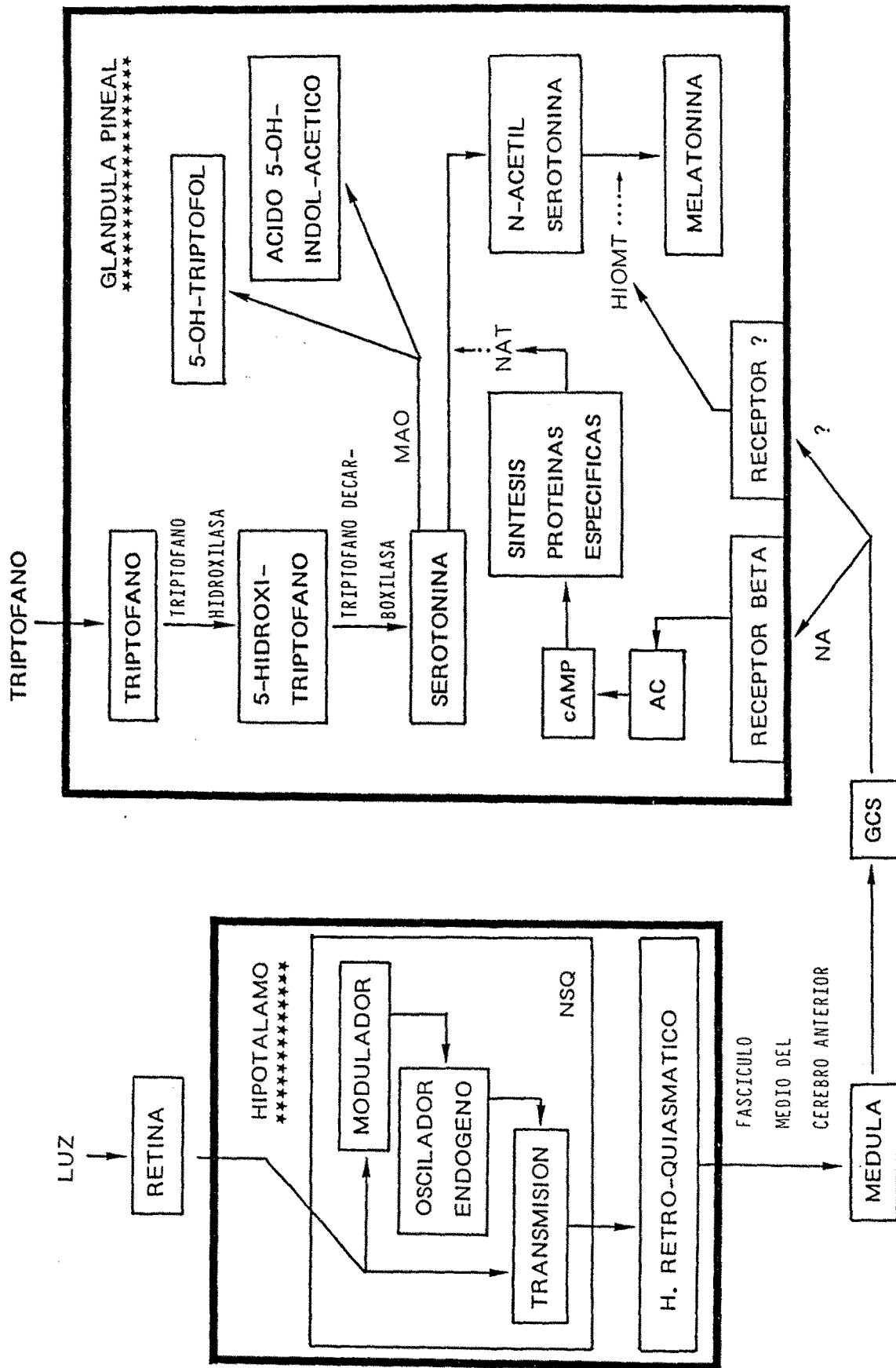


Fig. 6. Regulación de la síntesis de melatonina por la luz (modificado de Kein D.C., Moore R.Y. 1979).

núcleo parten axones hacia el área tuberal medial del hipotálamo; neuronas de este área poseen axones que terminan en el núcleo hipotalámico lateral del área hipotalámica lateral, del cual emergen axones que, descendiendo a través del tronco cerebral, terminan en neuronas preganglionares simpáticas de la columna intermedio lateral de los segmentos torácicos superiores. Los axones de las neuronas preganglionares alcanzan el ganglio cervical superior, donde se origina la inervación postgangliónica simpática de la pineal (Figura 7, tomado de Preslock J.P. 1984).

Las variaciones cíclicas que experimenta la síntesis de melatonina, en respuesta a cambios del fotoperíodo, están reguladas por un marcapasos, un auténtico "reloj biológico", función que se ha atribuido al núcleo supraquiasmático (Menaker M. y cols. 1978), oscilador endógeno que regula numerosos ritmos circadianos, además de los pineales; lo que aún no se ha aclarado es si el núcleo supraquiasmático actúa como un oscilador, marcando el ritmo de numerosas funciones, o simplemente envía señales rítmicas capaces de modular los osciladores endógenos de otras estructuras.

CONTROL HORMONAL

Superpuesto con el control neural de la síntesis de melatonina, existe a nivel pineal un control feed-back hormonal, llevado a cabo fundamentalmente por los esteroides gonadales. Numerosos autores describen cambios en las concentraciones pineal y sérica de melatonina durante los ciclos reproductores (Wetterberg L., Arendt J. 1975; Wetterberg L. y cols. 1976). Axelrod J. y cols. (1965) describen variaciones en la hidroxil-indol-orto-metil-transferasa (HIOMT) durante el ciclo estral de la rata, por el contrario la N-acetil-transferasa aparentemente no se afecta

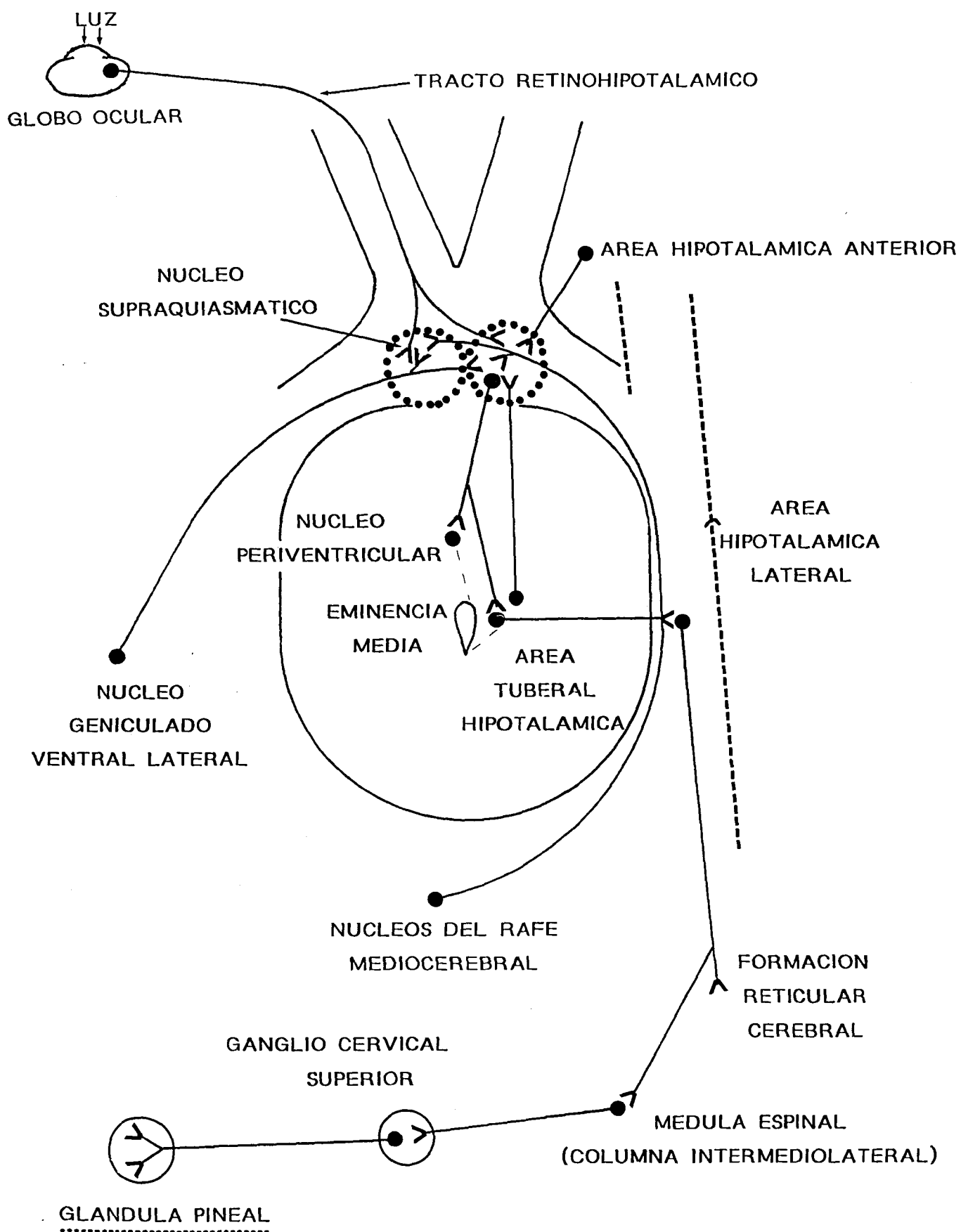


Fig. 7. Esquema de la inervación funcional de la glándula pineal.

Tomado de Preslock J.P. (1984).

por los esteroides gonadales (Illnerova H. 1975). Otro dato a favor de este control hormonal es el aislamiento en la pineal y ganglio cervical superior de receptores para un gran número de hormonas : progesterona, prolactina, andrógenos, estrógenos, glucocorticoides (Cardinali D.P. 1984).

En ratas castradas se ha descrito descenso en la actividad de la HIOMT, restaurándose esta actividad tras la administración de estradiol (Daya S., Potgieter B. 1982). Otros autores encuentran modificaciones en la actividad de la HIOMT tras cambios en los niveles de progesterona (Houssay A.B., Barcelo A.C. 1972), andrógenos (Nagle C.A. y cols. 1974).

1.2.4 - Lugar de vertido

Actualmente parece demostrado que la pineal vierte su secreción hacia la sangre, de donde procede la melatonina hallada en el líquido cefalorraquídeo (Withyachumnarnkul B., Knigge K .M. 1980), transportada, probablemente, a través de los plexos coroideos (Smulders A.P., Wright M. 1980).

1.2.5 - Sitios de acción

En muchos estudios experimentales con melatonina, ha sido difícil discernir si los efectos de esta indolamina sobre la función gonadal, eran debidos a acciones indirectas (vía hipotálamo o hipófisis) o a acciones directas sobre las gónadas. Actualmente cuatro son los principales órganos diana propuestos para esta hormona :

a) Hipotálamo

Kamberi I. y cols. (1970) demostraron que la infusión de melatonina en los vasos portales hipotálamo-hipofisarios no modificaba los niveles de gonadotrofinas, mientras que la infusión en el tercer ventrículo, inducía un significativo descenso en la FSH y LH. Los resultados sugieren pues, una acción de la melatonina a nivel hipotalámico, posiblemente bloqueando la liberación de hormonas liberadoras, hipótesis aceptada actualmente, existiendo datos en contra de la forma en que se modifica la liberación de LHRH. En diversas áreas cerebrales, entre ellas el hipotálamo medio basal, se ha demostrado la existencia de receptores específicos para la melatonina (Cardinali D.P. y cols. 1978).

b) Hipófisis

El bloqueo con melatonina de la respuesta hipofisaria a las hormonas liberadoras hipotalámicas, ha sido descrito por varios grupos Martin J.E., Klein D.C. (1976), Martin J.E. y cols. (1977) en ratas inmaduras; Yamashita K. y cols. (1977) in vitro; Mieno M. y cols. (1978) en perros; Martin J.E. y cols. (1980) en ratas recién nacidas, no pudiendo aún demostrarse este hecho en animales adultos.

c) Pineal

En la propia glándula pineal Vacas M.I., Cardinali D.P. (1980) demostraron la existencia de receptores para la melatonina. Aunque el significado funcional de este dato permanece aún sin aclarar, para algunos autores (Pavel S. 1973; Sánchez-Barceló E.J. y cols. 1982 a) la existencia de estos receptores justificaría las diferencias en la respuesta a la melatonina exógena, cuando es administrada a ratas intactas o

pinealectomizadas, ya que la melatonina podría actuar como un factor de liberación de otros componentes pineales.

d) Gónadas y glándulas sexuales accesorias

La descripción de receptores específicos citoplasmáticos para la melatonina, en las gónadas de roedores y humanos (Cchen M. y cols. 1978), permite sostener la hipótesis de una acción periférica de esta hormona.

Estas acciones directas de la melatonina en gónadas y glándulas sexuales accesorias fueron ya sugeridas por Debeljuk L. y cols. (1971). Sin embargo, la naturaleza de estas acciones no ha sido totalmente clarificada. Alonso R. y cols. (1978) encontraron que la melatonina bloquea con una relación dosis-respuesta, el efecto de la testosterona en los órganos sexuales accesorios en ratas castradas, sugiriendo que esta indolamina actúa como un factor antiandrogénico. En la misma línea Shirama K. y cols. (1981,1982) sugerían que los compuestos pineales podrían actuar previniendo la conversión de testosterona en dihidrotestosterona. Para Ellis L.C. (1972) el mecanismo de acción de la melatonina consistiría en una inhibición de los enzimas 17-alfa-hidroxipregнено-C₁₇-C₂₀-asa y 17-beta-hidroxiesteroide-deshidrogenasa en la síntesis de testosterona, explicando así los resultados obtenidos por Peat F., Kinson G.A. (1971) de una reducción de la producción de andrógenos, en incubaciones de tejido testicular, tras la adición de melatonina.

Más recientemente Buzzell G.R. y cols. (1984) demostraban que en ratas ciegas bulbectomizadas, las características morfométricas de

las próstatas ventrales no eran equivalentes a las obtenidas por reducción de los niveles de testosterona circulante. Estudios in vitro realizados en cultivos de ovario humano han demostrado que la melatonina es capaz de incrementar directamente la esteroidogénesis (Mc Phee A.A. y cols. 1975). Estos autores sugieren que los efectos antigonadotróficos de la melatonina, podrían ser debidos a una estimulación de la síntesis de 5-alfa-pregneno-3,20-diona, un potente inhibidor de la liberación de LH.

La experiencia que tenemos en nuestro laboratorio apoya esta idea, ya que frecuentemente encontramos tras inducción de hiperactividad pineal por diversos medios, atrofia de los órganos testosterona dependientes, sin alteraciones morfológicas ni ponderales de las gónadas (Sánchez-Barceló E.J. 1982; Cos S. y cols. 1983).

1.2.6 - Acciones de la melatonina

Desde su aislamiento por Lerner A. y cols. (1958), han sido muchas las descripciones de los efectos de esta hormona, derivados de la administración de melatonina exógena. Pese a que en la mayoría de los casos se describen efectos de tipo antigonadotrófico, existen también descripciones de ausencia de efectos (Debeljuk L. y cols. 1970; Talbot J.A., Reiter R.J. 1973,1974), siendo también numerosas las descripciones de efectos progonadotróficos pineales (Hoffman K. 1974; Turek F.W. y cols. 1975).

Tamarkin L. y cols. (1976) fueron los primeros en explicar estas discrepancias, observando que según la hora del día en la cual se inyectaba la melatonina, aparecían o no efectos sobre el eje hipófiso-gonadal, resultando solamente eficaz cuando se administraba durante el último tercio

de la fase de iluminación (Goldman B.D. y cols. 1984; Rivest R.W. y cols. 1985).

Vacas M.I., Cardinali D.P (1979), basándose en el trabajo anterior del grupo de L. Tamarkin, examinaron la posibilidad de que, o bien la afinidad o el número de receptores a la melatonina, experimentarían variaciones diarias, capaces de justificar el distinto grado de sensibilidad según la hora del día; comprobando que si bien la afinidad no varía, si lo hace el número de receptores, coincidiendo la mayor densidad de receptores con las horas de máxima sensibilidad a la melatonina exógena. Así mismo Reiter R.J. (1980) describe un período refractario tras la interacción melatonina-receptor, que explicaría el hecho de la falta de efectos al administrar melatonina en horas próximas a la producción del pico nocturno de hormona endógena. De igual manera, la implantación de "pellets" subcutáneos, da lugar a efectos progonadotróficos, por mantener los receptores continuamente bloqueados.

I.3 - Acciones de la glándula pineal sobre la reproducción

De todos los órganos del sistema endocrino, los asociados al control de la reproducción, son los más influenciados por la pineal. Tres son los tipos básicos de diseños experimentales que han servido para aportar los conocimientos actuales sobre el control pineal de la reproducción :

- Ablación de la glándula pineal quirúrgicamente o por exposición a luz continua.

- Inducción de hiperactividad pineal por reducción del

fotoperíodo, ceguera o exposición a oscuridad continua.

- Administración de melatonina o diversas fracciones de extractos pineales.

De forma muy general, las conclusiones más aceptadas como efectos patrón de la hiperactividad pineal son las siguientes :

a) Involución de las gónadas y glándulas sexuales accesorias, más o menos intensa según la especie animal que se considere. En el hamster llega a producirse, en los machos, un cese total de la actividad espermatogénica de las gónadas (Hoffmann R.A., Reiter R.J. 1965 a), y en las hembras una interrupción del ciclo estral, cese de la ovulación y atrofia uterina (Sorrentino S., Reiter R.J. 1970). En todos los casos la pinealectomía previene los efectos de la reducción de horas de luz (Petterborg L.J. y cols. 1981; Reiter R.J. 1982), apareciendo los mismos efectos que con la pinealectomía, tras ablación del ganglio cervical superior o el trasplante de la glándula fuera del ámbito de su inervación habitual (Reiter R.J. 1982).

b) Alteraciones variables en los niveles de FSH y LH en plasma y en hipófisis, normales o disminuidos en los machos y normales o aumentados en hembras, que contrastan con la claridad y constancia de los efectos medidos sobre las gónadas y glándulas accesorias (Reiter R.J. 1982; Preslock J.P. 1984). Los niveles séricos de testosterona descienden hasta un 70 % de los valores normales (Berndston W.E., Desjardins C. 1974); la administración de LHRH en estos animales, no es capaz de restaurar la actividad gonadal, pese a elevar los valores de las gonadotrofinas a valores

normales (Turek F.W. y cols. 1975).

c) Reducción de la prolactina sérica. Se ha descrito un descenso en la prolactina por acción indirecta sobre el hipotálamo, modificando la liberación de PRF o PIF (hormonas estimuladora e inhibidora de la liberación de prolactina)(Blask D.E., Reiter R.J. 1975), por acción directa sobre la hipófisis del PPRF (factor pineal liberador de prolactina) y del PPIF (factor pineal inhibidor de la liberación de prolactina), hormonas semejantes a los factores de liberación hipotalámicos aisladas en la pineal (Blask D.E. y cols. 1976; Chang N. y cols. 1979), o por combinación de ambos mecanismos. Estos datos condujeron a Bartke A. y cols. (1975) a emitir la hipótesis del papel fundamental de la prolactina como mediadora de las acciones pineales; en efecto, la reducción de los niveles de prolactina, consecuencia de la actividad pineal, reduciría a su vez la población de receptores gonadales para la LH. Esta hipótesis ha sido desarrollada por numerosos autores (Matthews M.J. y cols. 1978; Bex F. y cols. 1978; Benson B., Matthews M.J. 1980; Chen H.J., Reiter R.J. 1980), y parece ser válida en el hamster, pero no en otras especies como la rata, en la que el grado de atrofia gonadal es independiente de la tasa de prolactina circulante (Sánchez-Barceló E.J. 1982; Mediavilla M.D. y cols. 1982; Leadem C.A., Blask D.E. 1982 a).

I.4 - Factores potenciadores de la actividad pineal

Algunas especies animales como la rata de laboratorio, son poco sensibles a las variaciones del fotoperíodo, de tal manera que, para observar con nitidez los efectos antigonadotróficos, hay que asociar a la disminución de la radiación luminosa otras maniobras experimentales que

actúan como potenciadoras. Lo interesante de este hecho es que, aunque algunas de estas situaciones son totalmente artificiosas, otras se dan de manera espontánea, durante algunas etapas de la vida de los animales en su hábitat natural, y su conocimiento nos ayuda a comprender las modificaciones de la función pineal durante sus ciclos vitales en la naturaleza. Como factores potenciadores de la actividad pineal se consideran :

I.4.1 - Tratamiento neonatal con esteroides

La administración neonatal de dosis elevadas de esteroides, a ratas macho o hembras, unido a la privación de luz o exposición a fotoperíodos cortos, durante los días 25 a 75 de vida, provoca una insuficiencia gonadal permanente, más intensa que la obtenida en animales no tratados con esteroides. La pinealectomía o exéresis del ganglio cervical superior, evita la atrofia gonadal aparecida en animales sometidos a disminución de la radiación luminosa y tratados, al nacer, con esteroides. El mecanismo de potenciación se acepta que probablemente sea una interferencia, por parte de los esteroides, en la maduración de áreas hipotalámicas sensibles a la melatonina (Reiter R.J. y cols. 1968).

I.4.2 - Anosmia

La anosmia, tanto central (extirpación de los bulbos olfatorios) (Reiter R.J. y cols. 1969) como periférica (destrucción intranasal de las aferencias bulbares) (Mediavilla M.D. y cols. 1983; Mediavilla M.D. 1984; Mediavilla M.D. y cols. 1985; Sánchez-Barceló E.J. y cols. 1985 a), potencia los efectos antigonadotróficos inducidos por la ceguera (Reiter R.J. y cols. 1969), exposición a fotoperíodos cortos (Nelson R.J., Zucker I.

1981) o inyección de melatonina (Blask D.E., Nodelman J.L. 1979; Blask D.E., Nodelman J.L. 1980), probablemente a través de una sensibilización de los órganos diana a la melatonina (Reiter R.J. y cols. 1980; Blask D.E., Nodelman J.L. 1979; Blask D.E., Nodelman J.L. 1980). La asociación de pinealectomía a cualquiera de las situaciones anteriores, previene estas alteraciones de la función gonadal, hecho que demuestra la mediación pineal en el efecto derivado de la doble deprivación sensorial (Reiter R.J. y cols. 1969).

I.4.3 - Subnutrición

La reducción al 50 % de la ingesta alimentaria o de su contenido calórico, asociada a deprivación de luz, provoca una atrofia gonadal mayor que la obtenida con las dos maniobras experimentales por separado (Sorrentino S. y cols. 1971). La mediación pineal de estos efectos quedó demostrada al no producirse dicha atrofia en animales previamente pinealectomizados. La subnutrición no altera ni los ritmos, ni la concentración de melatonina pineal (Herbert D.C., Reiter R.J. 1981), aceptándose como mecanismo de acción, al igual que en el caso de la anosmia, una sensibilización a los efectos antigonadotróficos de la melatonina (Blask D.E. y cols. 1980), aunque es posible que también juegue algún papel el descenso de contenido pineal de arginina-vasopresina inducido por la subnutrición (Sánchez-Barceló E.J. y cols. 1982 b).

I.4.4 - Exposición a bajas temperaturas

Recientemente hemos comprobado en nuestro laboratorio, cómo la exposición crónica a temperaturas de 10 °C, potencia los efectos

antigonadotróficos derivados de la privación de luz. La pinealectomía previene los efectos derivados de la asociación frío-ceguera. El mecanismo de acción del frío parece ser, como en los casos anteriores, una sensibilización de los órganos diana a la melatonina (Cos S. 1983; Cos S. y cols. 1983; Sánchez-Barceló E.J. y cols. 1986).

Como hemos visto, el parámetro ambiental más importante en el control de la función pineal es el de las variaciones de luz, modificando la síntesis de melatonina. Sin embargo, otros factores dependientes del ecosistema también son capaces de incidir directa o indirectamente sobre la actividad pineal: temperatura, disponibilidad de alimentos y densidad de olores ambientales. De esta forma, algunos de los llamados factores potenciadores no son más que estímulos ambientales sincrónicos con las variaciones del nivel de radiación luminosa. En consecuencia, la glándula pineal puede ser considerada en los animales de reproducción estacional, como el órgano integrador de estímulos ambientales que influyen sobre la reproducción, sincronizando los períodos de reproducción con la época del año en que las posibilidades de supervivencia de las crías son mayores, cobrando así un papel fundamental en la conservación de la especie.

1.5 - La glándula pineal como transductor neuroendocrino

La Figura 8 tomada de Kappers J.A. (1978), resume la fisiología pineal según el modelo de un transductor neuroendocrino, receptor de informaciones sensoriales y endocrinas, a través de vías nerviosas y humorales, y emisor de señales de carácter hormonal.

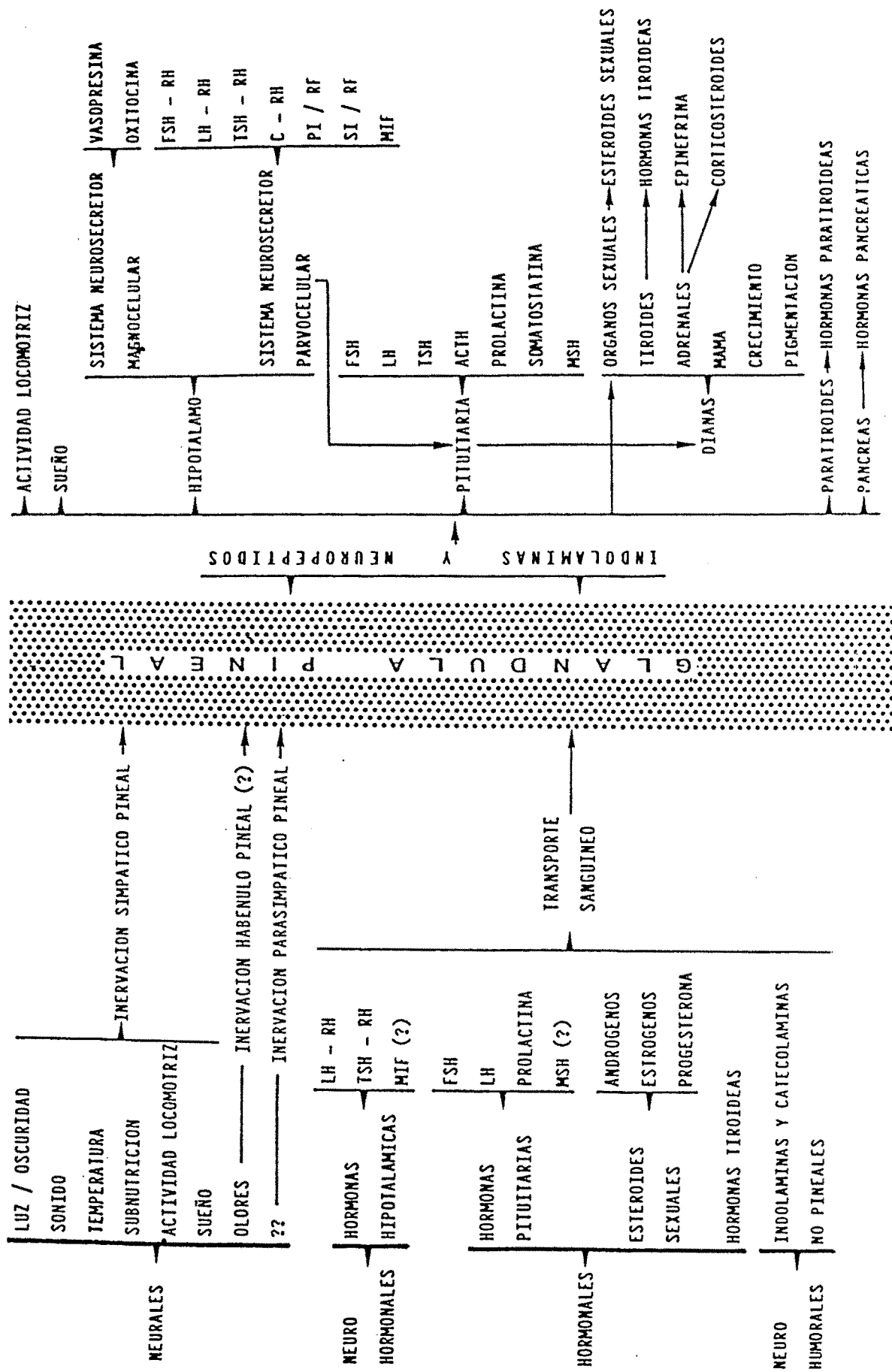


Fig. 8. La glándula pineal como transductor neuroendocrino. Tomado de Kappers J.A. (1978).

II - TUMORES MALIGNOS HORMONODEPENDIENTES

II.1 - Concepto de tumor hormonodependiente

Algunos tumores conservan la "memoria biológica" de las células normales y responden a las alteraciones del medio hormonal al igual que las células sanas. A estos tumores se les llama hormonodependientes, ya que su crecimiento depende de las hormonas necesarias para el desarrollo y función del tejido normal que ha originado la neoplasia. Este concepto se basa en una observación clínica de Beatson, quien en 1896 logró la regresión del cáncer mamario por medio de la ovariectomía. Ya en 1836 Cooper sugirió una posible relación entre la secreción ovárica y el desarrollo de tumores mamarios, tras observar fluctuaciones en la proliferación tumoral en diferentes fases del ciclo menstrual. En 1932 Lacassagne indujo tumores mamarios en ratones utilizando estrona, apoyando la idea de que las hormonas podrían estar implicadas en el desarrollo del cáncer. Huggins C. y cols. (1941) demuestran la regresión del cáncer prostático tras orquiectomía y revalorizan las observaciones de Beatson al comprobar la regresión de tumores mamarios inducidos en ratones ovariectomizados.

El diagnóstico de tumor mamario hormonodependiente asienta básicamente en dos criterios :

- Presencia de una elevada concentración de receptores estrogénicos.
- Respuesta positiva a la supresión de los estrógenos gonadales y adrenales.

II.2 - Receptor esteroideo - Mecanismo de acción de las hormonas

esteroideas

Las hormonas esteroideas son mensajeros químicos que deben encontrar a nivel de sus células diana mecanismos específicos para ser reconocidos como tales frente a otras sustancias. Este mecanismo de reconocimiento de la hormona constituye la función primordial de los receptores y requiere un lugar de alta afinidad y gran estereoespecificidad. A diferencia de lo que ocurre con otros sistemas, por ejemplo los enzimáticos, la interacción de una hormona con su receptor no altera su estructura química dado que el enlace establecido entre ambas es de tipo no covalente (Katzenellenbogen B.S. 1980). Los esteroides gonadales circulan en el plasma unidos en gran proporción a la transcortina y a la SHBG (Sex Hormone Binding Globulin), y atraviesan la membrana de sus células diana fijándose a una proteína del protoplasma que adquiere la categoría de receptor estrogénico. La proteína denominada 8s es modificada por el estrógeno, sucesivamente, en proteína 4s y 5s (Figura 9). El complejo estrógeno-proteína 5s penetra en el núcleo y activa la RNA-polimerasa, facilitando inicialmente la síntesis de RNA y proteínas; debiendo diferenciar dentro de estas últimas, aquellas que son específicas (ovoalbúmina en el oviducto, transcortina y SHBG en células hepáticas, receptores de progesterona en útero y mama, etc.) y aquellas que no son específicas, relacionadas con el crecimiento y división celular (Liao S. 1975; Parl F.F. 1984; Sato B. y cols. 1980).

La estructura molecular de los receptores esteroideos ha sido revisada recientemente por Sherman M.R., Stevens J. 1984, y a ella nos remitimos puesto que su comentario excede los objetivos de este

apartado.

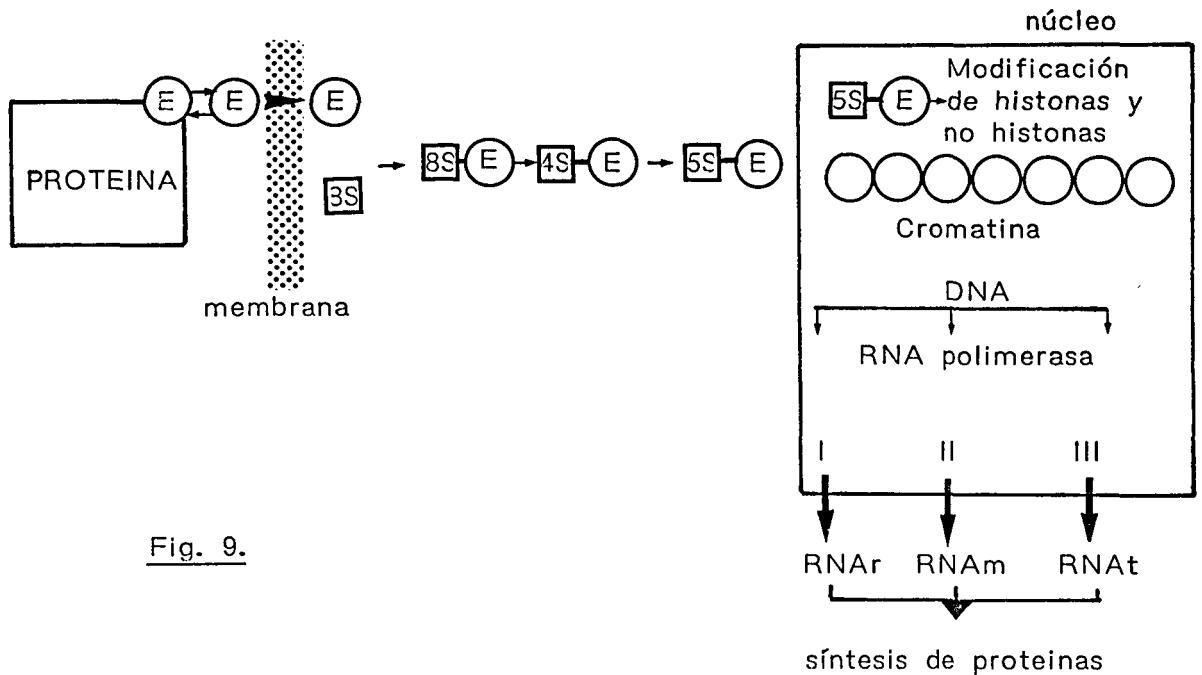


Fig. 9.

La presencia del receptor estrogénico marca su capacidad de responder a los estrógenos, tanto si el tejido es normal como si es patológico (tumor). Los receptores estrogénicos se encuentran concentrados en las células de los tejidos diana (útero, vagina, mama) y en diversas áreas del sistema nervioso central, particularmente en el hipotálamo, área preóptica y complejo amigdalario. Se han descrito igualmente en neoplasias de mama, próstata, endometrio, riñón, ovario y en melanomas (Shaw H.M. y cols. 1978; Rümke P. y cols. 1980; Saez S. 1981; Koroschka E.M. y cols. 1982; Pollack A. y cols. 1982; Stanberry L.R. y cols. 1982; Satyaswaroop P.G. y cols. 1983; Zava D.T., Goldhirsch A. 1983).

A pesar de la multiplicidad de respuestas a la acción estrogénica, por parte de los diferentes órganos o sistemas, se considera que el receptor estrogénico es similar en todas las células diana de los

diferentes órganos incluso en diferentes etapas del desarrollo y probablemente similar en todas las especies animales (Baulieu E.E. 1972; Mc Guire W.L., Delagarza M. 1973). Miller M.A. y cols. (1984) no encuentran diferencias entre los receptores estrogénicos de los tejidos normales y los de las neoplasias.

II.3 - Significado clínico de los receptores estrogénicos

II.3.1 - En la respuesta a la hormonoterapia

Parece existir una clara correlación entre la concentración de receptores y la respuesta a la hormonoterapia (Fisher R.I. y cols. 1976; Cikes M. 1978; Jensen E.V. 1980; Jensen E.V. 1981; Rochefort H. 1981; Milgrom E. 1984). En los tumores con receptores estrogénicos, la tasa de respuesta a la hormonoterapia se sitúa entre un 50 - 60 % de los casos, mientras que en neoplasias sin receptores estrogénicos el porcentaje de respuesta se sitúa entre 0 - 10 % (Clavel B., Gest J. 1983; Fisher B. y cols. 1983 a). En los últimos años se ha visto que la tasa de receptores de progesterona (RP) permite afinar la respuesta a la hormonoterapia dentro de los tumores con receptores estrogénicos (Liskowski L. y cols. 1976; Mc Guire W.L. 1978; Henderson I.H., Canellos G.P. 1980; Eckert R.L., Katzenellenbogen B.S. 1982; Magdelenat H. y cols. 1982; Magdelenat H. y cols. 1983; Fisher B. y cols. 1983 b). Actualmente la dosificación de los receptores estrogénicos y progesterónicos es el mejor medio para predecir la hormonodependencia de los tumores mamarios, como lo confirma el dato de que el 90 % de los enfermos con tumores sin receptores estrogénicos ni progesterónicos, no responden al tratamiento endocrino. A la inversa, el 80 % de los enfermos con tumores con ambos tipos de receptores responden

favorablemente. Cuando sólo está presente un único tipo de receptor, los casos de remisión son intermedios entre un 25 % y un 50 % (Sanfilippo O. y cols. 1979; Dao T.L., Nemoto T. 1980; Namer M. y cols. 1980; Saez S. 1981; Rochefort H. 1982; Clavel B., Gest J. 1983).

II.3.2 - En el pronóstico

Un parámetro ciertamente fiel para anticipar las probabilidades de recidiva y el tiempo de supervivencia es la evaluación del ritmo de crecimiento tumoral. Este ritmo de evolución ha sido objetivado in vitro por diversas técnicas de evaluación del contenido celular en fase de síntesis de ADN (por ejemplo, incorporación de timidina tritiada). Con ello se ha visto cómo existe una estrecha correlación entre la tasa de incorporación de timidina tritiada, el contenido de receptores estrogénicos y el pronóstico. Una incorporación de timidina elevada corresponde generalmente a tumores sin receptores, cuyo pronóstico será malo. El análisis de la distribución de las células dentro de las fases del ciclo confirma la relación crecimiento-ausencia de receptores estrogénicos (Meyer J.S. y cols. 1977; Olszewski W. y cols. 1981 a, 1981 b).

Este paralelismo entre el pronóstico y la tasa de crecimiento sugiere igualmente una correlación con el grado de diferenciación; en múltiples trabajos se describe mayor presencia de receptores estrogénicos y progesterónicos en las formas tumorales más diferenciadas, según la clasificación de Bloom H.J.G., Richardson W.W. (1957) (Maynard P.V. y cols. 1978; Mc Carty K.S. y cols. 1980; Lesser M.L. y cols. 1981; Thoressen S. y cols. 1982; Tulusan A.H. y cols. 1982; Akagi M. y cols. 1983; Saez S., Pichon M.F. 1983; Le Doussal V. y cols. 1984).

Los receptores permiten aparentemente anticipar el pronóstico, pero es quizás más exacto concebir esta hipótesis en un sentido un poco diferente : permiten hacer la discriminación entre dos tipos de tumores; los primeros, con receptores, corresponden a tumores cuyas células poseen unas propiedades relativamente diferenciadas, su velocidad de evolución, es decir de crecimiento, es más lenta, sus localizaciones a distancia son igualmente las mejor toleradas y clásicamente las más sensibles a las terapéuticas (hormonales, radioterápicas o quimioterápicas). Los otros tumores, sin receptores, son independientes, desde todo punto de vista, su crecimiento es rápido, como lo es el de todos los tumores más indiferenciados; su sensibilidad a los tratamientos, como la radioterapia local o la quimioterapia, es engañosa, puesto que los períodos de remisión acumulados no conducen sin embargo a una supervivencia global mayor (Cooke T. y cols. 1979; Furmanski P. y cols. 1980; Friedman M.A. y cols. 1981; Von Maillot K. y cols. 1982; Clark G.M., Mc Guire W.L. 1983; Ciatto S. y cols. 1983; Aamdal S. y cols. 1984; Crowe J.P. y cols. 1984; Bolla M. y cols. 1984; Mercer R.J. y cols. 1984).

II.4 - Receptores estrogénicos en la glándula mamaria normal y neoplásica

Para el completo desarrollo de la mama se necesitan, entre otras hormonas, estrógenos, respondiendo el tejido mamario a modificaciones en los niveles de esta hormona. Como hemos visto las hormonas esteroideas para actuar sobre un determinado tejido, deben ligarse a una proteína receptora específica, situada en el citoplasma. Estos receptores estrogénicos han sido descritos en tejido mamario procedente de adenocarcinomas experimentales en animales (Wittliff J.L. y cols. 1972; Hawkins R.A. y cols.

1977; Asselin J. y cols. 1980; Yoshida H. y cols. 1982 a, 1982 b), en tumores espontáneos en animales (Mac Ewen E.G. y cols. 1982; Yoshida H. y cols. 1982 b) y en humanos (Nomura Y. y cols. 1977; Zava D.T. y cols. 1977; Singh P. y cols. 1978; Fazekas A.G., Mc Farlane J.K. 1980; Borjesson B.W., Sarfaty G.A. 1981; Buell R.H., Tremblay G. 1983; Jacobs S.R. 1983; Hanselmann R., Genton C.Y. 1983). La presencia de receptores estrogénicos se ha constatado en el 60-70 % de las neoplasias mamarias, frente al 38 % de aparición de receptores a la progesterona, 52 % de receptores a glucocorticoides y 31 % de receptores androgénicos, sin relación aparente con la localización del tumor en la mama, tamaño o extensión (Allegra J.C. y cols. 1979; Kern W.H. 1979; Elwood J.M., Godolphin W. 1980; Contesso G. y cols. 1983; Fuse H. y cols. 1983).

Existen múltiples trabajos que intentan relacionar la aparición de receptores estrogénicos en tumores mamarios, con los caracteres histológicos del tumor, con la aparición de reacción inflamatoria, de elastosis, con variaciones de índices citomorfológicos (Antoniades K., Spector H. 1979; Hawkins R.A. y cols. 1980; Lesser M.L. y cols. 1981; Contesso G. y cols. 1983). Dicha relación no ha llegado a comprobarse en el momento actual.

Suficientemente demostrada la presencia de receptores estrogénicos en los tumores mamarios, existen mayores discrepancias en cuanto a su presencia en el tejido mamario normal, así Singh P. y cols. (1978) y Seshadri R. y cols. (1979) describen niveles bajos de receptores estrogénicos; mientras que Wagner D.A. y cols. (1976) no los detectan. Recientemente Silva J.S. y cols. (1983) demuestran en humanos variaciones cíclicas de la concentración de receptores estrogénicos en función del ciclo

menstrual, siendo los niveles de receptores estrogénicos altos durante la fase proliferativa y bajos durante el resto del ciclo. Se han descrito también variaciones cíclicas, dependiendo del ciclo menstrual en la concentración de receptores estrogénicos y progesterónicos en el endometrio (Bayard F. y cols. 1978). Contrariamente a los adenocarcinomas mamarios, no ha sido descrita la presencia de receptores estrogénicos en las afecciones no carcinomatosas de la mama (May-Levin F. y cols. 1977).

Los tumores mamarios con receptores estrogénicos se diferencian, como hemos visto, de los tumores sin receptores estrogénicos, en su respuesta a la terapia hormonal (Mc Guire W.L. 1978; Byar D.P. y cols. 1979; Blamey R.W. y cols. 1980; Brooks S.C. y cols. 1980; Saez S. 1981; Wittliff J.L. 1984), en su pronóstico (Blamey R.W. y cols. 1980; Jensen E.V. 1981; Rochefort H. 1981; Neifeld J.P. y cols. 1982; Rochefort H. 1982; Saez S., Pichon M. 1983; Saez S. y cols. 1983), en la duración del período de remisión (Knight W.A. y cols. 1977; Cooke T. y cols. 1979) y probablemente, en su respuesta a la quimioterapia (Kiang D.T., Kennedy B.J. 1977; Blamey R.W. y cols. 1980; Cavalli F. y cols. 1983; Kiang D.T. 1984; Levine R.M., Lippman M.E. 1984); además de estas diferencias existen autores que relacionan la aparición de tumores que poseen receptores estrogénicos, con factores epidemiológicos del cáncer de mama, algunos de estos últimos descritos como factores de riesgo de los adenocarcinomas mamarios (Cole P. 1974), tal es, por ejemplo, la asociación de dichos tumores con factores como :

- Edad. La frecuencia de tumores mamarios con receptores estrogénicos aumenta directamente con la edad (Elwood J.M., Godolphin W. 1980; Lesser M.L. y cols. 1981; Fisher B. y cols. 1983 c).

- Estado menstrual. Junto a autores que describen una asociación del estado menstrual y edad de los pacientes en su relación con tumores que poseen receptores estrogénicos, demostrando su mayor incidencia en la postmenopausia (Kiang D.T., Kennedy B.J. 1977; Lesser M.L. y cols. 1981; Kuno K. y cols. 1983; Mercer R.J. y cols. 1983; Calandra R.S. y cols. 1984); existen otros que asocian el aumento en la incidencia de tumores con receptores estrogénicos a la edad, independientemente del estado menstrual (Elwood J.M., Godolphin W. 1980; Clark G.M. y cols. 1984).

- Edad al primer nacimiento. Los tumores mamarios con receptores estrogénicos se asocian a mujeres que tienen el primer hijo a los veinte años o después (Elwood J.M., Godolphin W. 1980). Otros autores niegan esta asociación (Lesser M.L. y cols. 1981; Hildreth N.G. y cols. 1983).

- Exposición a drogas estrogénicas o contraceptivos orales. A la vez que hay trabajos que abogan por esta asociación (Lesser M.L. y cols. 1981; Mirimanoff R.O. y cols. 1981; Borgna J.L., Rochefort H. 1983; Janssens J.PH. y cols. 1983; Osborne M.P. y cols. 1983; Bye P. 1984), otros demuestran lo contrario (Elwood J.M., Godolphin W. 1980; Hildreth N.G. y cols. 1983).

- Peso corporal. Mac Mahon B. (1975) así como Donegan W.L. y cols. (1978), Kuno K. (1981), Lesser M.L. y cols. (1981) encuentran una mayor incidencia de tumores con receptores estrogénicos en mujeres obesas, mientras otros autores niegan la relación peso corporal-tumores con receptores estrogénicos (Elwood J.M., Godolphin W. 1980; Mason B. y cols. 1982).

- Factores de riesgo del cáncer de mama, como edad de la menarquia, origen étnico, status socioeconómico, nuliparidad, historia familiar de patología mamaria, suelen no ser asociados con los tumores con receptores estrogénicos (Elwood J.M., Godolphin W. 1980; Lesser M.L. y cols. 1981; Paganini-Hill A. y cols. 1984). Hildreth N.G. y cols. (1983) describen una asociación de estos tumores con la nuliparidad. Lesser M.L. y cols. (1981) encuentran menor frecuencia de tumores con receptores estrogénicos en personas de raza negra.

- Patología previa mamaria. Hay autores que describen una asociación entre los tumores con receptores estrogénicos y la existencia de historia previa de enfermedades benignas de la mama (Lesser M.L. y cols. 1981; Hildreth N.G. y cols. 1983).

Así como se han visto correlaciones entre los tumores con receptores estrogénicos y distintos factores epidemiológicos del cáncer de mama, ninguna de estas correlaciones ha podido ser demostrada para cualquier otro de los receptores esteroideos descritos (Allegra J.C. y cols. 1979).

III - CARCINOGENESIS EXPERIMENTAL

Una herramienta de trabajo de enorme eficacia para el estudio de los procesos neoplásicos es poder disponer de un modelo animal del tumor que se desea investigar; en algunos casos esto ha sido posible mediante la inducción de tumores a animales de laboratorio con alguna de las técnicas que pasamos a revisar.

III.1 - Agentes carcinógenos

III.1.1 - Inoculación de virus oncógenos

Hace 70 años se comprobó por vez primera que una forma de leucemia en las aves podía transmitirse por filtrado tumoral sin células, entonces no se apreció el carácter del agente transmisible pero, de manera retrospectiva, cabe afirmar que era un virus. Más adelante fué Bittner J.J. (1942) quien demostró que el carcinoma mamario en el ratón podía ser causado por un virus, comprobando que la mayor frecuencia de cáncer de algunas cepas de ratones dependía de un virus transmitido de generación a generación por la leche de la hembra lactante. A partir de estas observaciones han sido muchos los virus identificados como causa de tumores en animales de laboratorio, incluyendo tanto virus de DNA como de RNA. Todos los virus oncógenos tienen la facultad de producir tumores en el huésped adecuado de laboratorio (in vivo) y de causar transformación de células normales susceptibles a células neoplásicas en cultivos de tejidos (in vitro). Este modelo de inducción tumoral, sin ser el más frecuente, ha sido utilizado en multitud de trabajos experimentales (Dalton A.J., Hagenau F. 1962; Lapin V. 1974, 1975; Lapin V., Ebels I. 1976; Blask D.E. 1984).

III.1.2 - Radiación

La radiación es un método muy eficaz para producir tumores en animales. Puede actuar sinérgicamente con otros métodos para provocar neoplasias al producir roturas en la cadena de DNA; los fenómenos de reparación pueden facilitar la acción mútua del DNA con carcinógenos químicos y virus oncógenos. En contraste con la carcinogénesis producida

por carcinógenos químicos, el estado fisiológico del huésped, en el momento de la irradiación, tiene poco efecto sobre la incidencia, número de tumores y tipo de neoplasias (Holtzman S. y cols. 1982). La inducción de tumores experimentales mediante radiación no es el método más usual, dada la alta latencia en la aparición de los tumores e incluso la propia peligrosidad de la técnica para el investigador.

III.1.3 - Hormonas

Aunque se desconoce el mecanismo de acción está comprobado que las hormonas pueden producir tumores en animales de laboratorio; así, la administración duradera de estrógenos a diversos animales de laboratorio produce tumores en múltiples localizaciones, principalmente en glándula mamaria (Lipschutz A. 1950, 1969). Estas observaciones en animales han despertado ciertas prevenciones ante tratamientos prolongados con estrógenos en el ser humano. Sobre la base de resultados experimentales descritos hace tiempo (Moon H.D. 1950, 1951; Mühlbock O., Boot L.M. 1959; Dao T.L., Gawlak D. 1963; Sterental A. y cols. 1963) parece evidente que ni la prolactina ni la hormona del crecimiento tienen algún efecto sobre la inducción de cáncer mamario en ratas. Por otro lado, la administración prolongada de estrógenos induce la aparición de tumores mamarios en ratas (Dao T.L. 1964; Lipschutz A. 1969). Estos cambios descritos en la mama tras administración de estrógenos han sido reseñados también a nivel de hipófisis; en el caso de animales hipofisectomizados, sin embargo, no se han encontrado alteraciones a nivel de la mama. Los resultados son contradictorios, así mientras algunos describen ausencia de efectos de los estrógenos sobre la glándula mamaria en ausencia de hipófisis, otros afirman que los estrógenos inducen desarrollo de la glándula mamaria

en animales hipofisectomizados (Daniel P.M., Prichard M.M.L. 1963; Dao T.L. 1964; Dao T.L. 1971; Dao T.L., Nemoto T. 1980). El mecanismo de acción del desequilibrio hormonal queda expuesto a la crítica de que las hormonas sencillamente potencien el efecto de otras influencias carcinógenas, de la índole de virus o agentes químicos. Cabe especular que el papel de las hormonas es sólo conservar o estimular la duplicación celular normal, como en la mama o el endometrio, fenómeno que se ha comprobado es importante en la transformación neoplásica.

III.1.4 - Carcinógenos químicos

Dedicaremos un especial interés a este apartado ya que el modelo experimental elegido para nuestro trabajo está basado en la carcinogénesis química.

La carcinogénesis química fué reconocida por vez primera en el hombre, con el hallazgo de Hill en 1761 de un aumento en la incidencia de pólipos nasales y cáncer después de un uso prolongado del rapé. En 1775 Pott observa que los deshollinadores presentaban alta frecuencia de cáncer escrotal y lo asocia con la exposición de estas personas, durante muchos años, a gran cantidad de hollín de carbón y alquitrán. Desde estas observaciones se ha comprobado que centenares de compuestos químicos, tanto naturales como sintéticos, orgánicos e inorgánicos, son carcinógenos. Estos carcinógenos químicos no poseen un carácter químico o estructural común, ni muestran derivados metabólicos comunes. Al igual que los virus los carcinógenos químicos tienen en mayor o menor medida especificidad de especies; son activos in vivo e in vitro; algunos producen tumores malignos desde el comienzo; otros desencadenan

en primer lugar neoplasias benignas, que progresan a formas malignas. En otras ocasiones los tumores originados por agentes químicos aparecen y presentan regresión espontánea (Young S. y cols. 1963). Tras la administración del cancerígeno suele haber un período de latencia entre la administración del agente y la aparición del tumor; sin embargo, respecto a todos estos atributos, cuanto más potente sea el carcinógeno, tanto más amplia será la gama de animales susceptibles, tanto más vulnerables serán los tejidos, tanto más seguro será el progreso a tumor maligno y tanto más breve será el período de latencia (Robbins S.L., Angell M. 1973).

Entre los agentes químicos carcinogénicos más potentes usados en experimentación están :

* Hidrocarburos aromáticos policíclicos. Son de los carcinógenos químicos conocidos más potentes. Entre los más activos están : 9,10-dimetil-1,2-benzantraceno, 9,10-dimetil-1,2,5,6,-dibenzantraceno, 1,2,5,6-dibenzantraceno, 3,4-benzopireno, 3-metilcolantreno.

* Colorantes azoicos. Los más usados son el N-dimetil-4-aminoazobenceno y el N-metil-4-aminoazobenceno.

* Aminas aromáticas : dimetilnitrosamina, 2-aminofluoreno, 2-acetilaminofluoreno.

* Agentes alquilantes. Los mejor conocidos son las mostazas nitrogenadas.

* Otras sustancias de diversa índole :

. compuestos inorgánicos : óxido de berilio, cadmio, cobalto, mercurio, níquel, acetato de plomo.

. productos naturales de origen vegetal : cicasina, aflatoxina B₁.

En general los carcinógenos químicos actúan sobre el material celular por tres mecanismos diferentes : interacción física del carcinógeno con los receptores celulares, reacción química del carcinógeno con estos receptores o interacción de un metabolito del carcinógeno con el receptor, formandose un intermedio metabolito-receptor. Atendiendo a estas formas de actuación encontramos dos tipos fundamentales de agentes cancerígenos :

a) de actuación directa

agentes alquilantes

agentes acilantes

compuestos inorgánicos

b) de actuación tras activación biológica

aminas aromáticas

amidas aromáticas

compuestos azoicos

compuestos nitro y nitrosos

hidrocarburos aromáticos polinucleares

III.1.4.1 - Hidrocarburos aromáticos polinucleares

Son los productos químicos en los cuales su efecto

cancerígeno fué primeramente identificado. La mayoría de los carcinógenos más potentes en este grupo tienen más de tres anillos benceno, de ahí el nombre de hidrocarburos aromáticos polinucleares. Desde la observación de Pott en 1775 de que el cáncer de escroto encontrado en los deshollinadores pudiera estar causado por algún componente del hollín, pasaron más de cien años hasta que se produjeron experimentalmente tumores de piel en conejos, pintándolos con extractos de alquitrán. Estas experiencias marcaron el comienzo de la investigación de la sustancia carcinogénicamente activa en el hollín, que culminaron con el aislamiento e identificación del benzo(a)pireno, dos décadas más tarde. El sintético dibenzo(a,h)antraceno demostró ser un carcinógeno y las similitudes entre ambas moléculas implicaron a los hidrocarburos aromáticos policíclicos como potenciales cancerígenos para el hombre. Posteriormente se sintetizaron muchos otros hidrocarburos aromáticos polinucleares que son utilizados rutinariamente como tumorígenos en animales de laboratorio.

METABOLISMO

El estudio del metabolismo de los hidrocarburos aromáticos polinucleares tiene particular importancia debido a la evidencia de su implicación en el proceso de carcinogénesis. Estos agentes químicos deben ser metabólicamente activados "in vivo" a los derivados llamados "últimos carcinógenos", es decir, los derivados directamente implicados en la inducción de tumores. El balance en el metabolismo entre metabolitos activos o inactivos es uno de los factores críticos en la eficacia carcinogénica de estas especies químicas.

En la Figura 10 representamos esquemáticamente las vías

establecidas del metabolismo de los hidrocarburos aromáticos polinucleares.

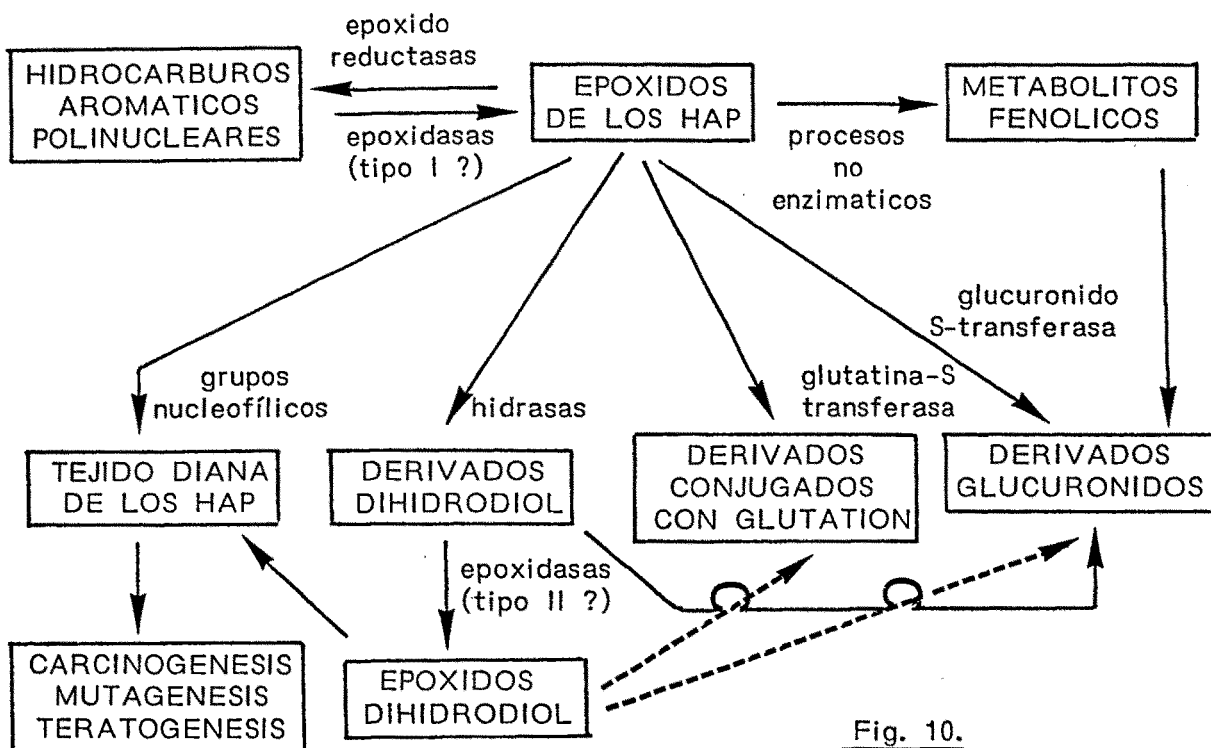


Fig. 10.

MECANISMO DE ACCION

El estudio de los mecanismos de acción carcinogénicos de los agentes químicos es una de las más fascinantes áreas en el estudio del cáncer. Debido a la gran complejidad de la carcinogénesis se han propuesto muchas teorías, no siendo posible explicar este fenómeno con una única teoría. Así, aunque existen muchas evidencias experimentales que apoyan la teoría de la mutación de la carcinogénesis, otras teorías, tales como la selección de células cancerosas preexistentes, el aislamiento de células de la regulación del desarrollo y desdiferenciación ("reprogramación genética") de células somáticas, también parecen tener validez (Farber E. 1968; Heidelberger C. 1964, 1975; Boyland E., Sims P. 1965; Gelboin H.V. 1980).

Hay evidencias que sugieren que la activación de metabolitos intermedios de los hidrocarburos carcinogénicos inicia la carcinogénesis por unión covalente con el DNA en el órgano diana. La unión covalente de los hidrocarburos aromáticos policíclicos al DNA ha sido demostrada tanto in vivo como in vitro. Con pocas excepciones existe una buena correlación entre la potencia carcinogénica de un hidrocarburo y su unión al DNA (Miller J.A., Miller E.C. 1965; Miller E.C., Miller J.A. 1966; Miller J.A. 1968; Troll W. 1968; Miller J.A. 1970; Miller E.C. 1978; Miller E.C., Miller J.A. 1981 a, 1981 b).

Otra de las teorías que existen sobre el mecanismo de acción de los hidrocarburos aromáticos policíclicos, apoya la posibilidad de que exista una unión entre el agente químico y una proteína citoplasmática (Pitot H.C., Heidelberger C. 1963; Heidelberger C. 1964; Farber E. 1968; Heidelberger C. 1975; Gelboin H.V. 1980; Miller E.C., Miller J.A. 1981 a, 1981 b).

III.2 - Modelo experimental de tumor mamario en rata inducido por DMBA. Tumor de Huggins

El tumor mamario inducido en la rata por administración de 7,12-dimetilbenzantraceno (9,10-dimetil-1,2-benzantraceno) (DMBA) ha sido recientemente revisado por Welsch C.W. (1985), en un excelente artículo en honor a Charles Brenton Huggins, autor que describió este modelo de inducción tumoral experimental a comienzos de la década de los años 60, valiéndole el Premio Nobel de Medicina en 1966. Desde entonces viene siendo el modelo más utilizado en los estudios de laboratorio, como equivalente al tumor mamario humano.

III.2.1 - Características anatomopatológicas

Estos tumores tienen una estructura histológica muy semejante al cáncer de mama humano; la mayor parte de ellos son adenocarcinomas, no obstante se han descrito fibroadenomas, sarcomas (Young S. y cols. 1963; Dao T.L. 1964; Daniel P.M., Prichard M.M.L. 1964; Middleton P.J. 1965; Daniel P.M., Prichard M.M.L. 1967). Estos adenocarcinomas, al igual que los humanos, tienen un origen ductal (Middleton P.J. 1965; Sinha D., Dao T.L. 1974, 1975; Haslam S.Z., Bern H.A. 1977). La aparición de adenocarcinomas a nivel del ductus, se sugiere que está precedido de alteraciones displásicas e hiperplásicas, aunque la hiperplasia alveolar nodular no parece esencial en la carcinogénesis mamaria cuando el DMBA se administra por otra vía que no sea la intravenosa, forma de administración después de la cual se ha descrito, con mayor frecuencia, la aparición de hiperplasia alveolar nodular; de ahí que el carácter preneoplásico de estas lesiones no ha quedado totalmente determinado (Daniel P.M., Prichard M.M.L. 1964; Middleton P.J. 1965; Beuving L.J. y cols. 1967; Sinha D., Dao T.L. 1974, 1975; Haslam S.Z., Bern H.A. 1977; Ethier S.P., Ullrich R.L. 1982).

Los adenocarcinomas se desarrollan progresivamente, apareciendo frecuentemente necrosis central, cuando alcanzan tamaños mayores de dos centímetros de diámetro; en casos de grandes tamaños suelen tener problemas de hemorragia e infección, debido a la necrosis.

Estos tumores pueden metastatizar pero sólo ocasionalmente a nódulos linfáticos, pulmón e hígado; esta baja incidencia de metástasis es un hecho que aún hoy día no está aclarado.

III.2.2 - Características bioquímicas

Los tumores inducidos por hidrocarburos aromáticos policíclicos presentan procesos de glucólisis aeróbica y anaeróbica, fenómeno común a todos los tumores malignos (Dao T.L. 1964; Mori M., Tamaoki B. 1980).

En cuanto al metabolismo esteroideo, se ha descrito alguna alteración enzimática en los tumores inducidos por DMBA, en comparación con el metabolismo esteroideo en la glándula mamaria normal; así la actividad de la 20alfa-hidroxiesteroide deshidrogenasa en los tumores mamarios, parece significativamente más baja que en la mama normal; mientras que la actividad de la 5alfa-reductasa es mayor en los tumores que en la glándula mamaria normal. La actividad de la 5alfa-reductasa en la mama normal se localiza en la fracción microsomal, mientras que la actividad de ese mismo enzima en los tumores se detecta en todas las organelas (Dao T.L. 1964; Mori M., Tamaoki B. 1977; Mori M. y cols. 1978; Mori M., Tamaoki B. 1980).

Los tumores inducidos por DMBA, al igual que los tumores mamarios humanos, son capaces de metabolizar la dihidroepiandrosterona y testosterona en 5alfa-dihidrotestosterona y 5alfa-androstanediol, pudiendo actuar como órganos paraendocrinos por metabolización de las hormonas esteroideas (Jones D. y cols. 1970; Miller W.R. y cols. 1974). La beta-glucuronidasa está presente en concentraciones altas en los órganos diana de estimulación de los estrógenos (útero, próstata y mama); en los tumores inducidos por DMBA se ha encontrado aumentada (Archer F.L., Orlando R.A. 1968).

III.2.3 - Hormonodependencia del Tumor de Huggins

La mayoría de estos tumores regresan tras ovariectomía y adrenalectomía, o hipofisectomía; la administración posterior de estrógenos o prolactina puede mantener el desarrollo tumoral, así como los niveles de receptores estrogénicos (Daniel P.M., Prichard M.M.L. 1963; Sterental A. y cols. 1963; Gropper L., Shimkin M.B. 1967; Boyland E.S., Wittliff J.L. 1975; Asselin J., Labrie F. 1978; Arafah B.M. y cols. 1980; Lee C. y cols. 1981). La presencia de receptores estrogénicos, en los tumores mamarios inducidos por DMBA, se considera un buen índice de hormonodependencia (Mobbs B.G. 1966; Asselin J. y cols. 1977, 1980). En estudios de varios autores se han comparado las propiedades de los receptores estrogénicos de tumores mamarios humanos, con las de los receptores de los tumores inducidos por DMBA, siendo virtualmente indiferenciables; de ahí que los tumores por DMBA sean un modelo válido para estudiar el papel de los receptores estrogénicos en el cáncer de mama humano (Mc Guire W.L., Delagarza M. 1973; Wittliff J.L. 1979). Presentan alta afinidad por el estradiol pero no por otros esteroides no estrogénicos (Mc Guire W.L., Delagarza M. 1973; Powell-Jones W. y cols. 1976; Davies P. y cols. 1977; Wittliff J.L. 1979; Eechaute W. y cols. 1983; Dietrich W., Görlich M. 1984). Dao T.L. en 1971 describe diferentes formas de inhibición de la carcinogénesis química en la mama por modificaciones hormonales, lo que evidencia una regulación hormonal de la interacción carcinógeno-órgano diana. Numerosos autores han descrito alteraciones en el desarrollo tumoral debidas a variaciones hormonales (Gruenstein M. y cols. 1966; Teller M.N. y cols. 1966, 1968; Hilf R. y cols. 1971; Teller M.N. y cols. 1977; Garcia M., Rochefort H. 1978; Sylvester P.W. y cols. 1981; Aitken S.C., Lippman M.E. 1982; Kamenets L.Y. y cols. 1983; Redding T.W., Schally A.V. 1983).

Las dos hormonas más importantes en el desarrollo de estos tumores mamarios en ratas son la prolactina y los estrógenos, ambas bajo control de la hipófisis (Meites J. 1972; Gala R.R., Loginsky S.J. 1973; Leung B.S., Sasaki G.H. 1975; Shafie S.M. 1980). Los estrógenos estimulan la secreción de prolactina y actúan con ésta directamente sobre el tejido mamario, promoviendo la tumorigénesis (Lee C., Oyasu R. 1974). Grandes dosis de estrógenos pueden inhibir el desarrollo tumoral, no por supresión de la secreción de prolactina, sino por interferir con las acciones periféricas de la prolactina sobre el tejido mamario. Los estrógenos no pueden inducir ni mantener el desarrollo de tumores mamarios en ausencia de hipófisis, mientras que la prolactina puede tener una limitada capacidad de inducir y mantener el desarrollo tumoral en ausencia de ovarios (Nagasawa H. y cols. 1973; Manni A. y cols. 1977; Gabriel B.W. y cols. 1983). Sinha D. y cols. (1973) describen regresiones de tumores en animales castrados y con niveles altos de prolactina. Las elevaciones de prolactina producidas por lesiones hipotalámicas, hipofisarias o administración de pequeñas dosis de estrógenos o drogas hiperprolactinémicas, pueden aumentar el desarrollo de los tumores, así como drogas hipoprolactinémicas pueden reducir el desarrollo de los tumores experimentales (Welsch C.W., Meites J. 1970; Leung B.S., Sasaki G.H. 1975; Sasaki G.H., Leungs B.S. 1975; Holdaway I.M., Friesen H.G. 1976; Shafie S., Brooks S.C. 1977; Nagasawa H., Morii S. 1981; Rose D.P., Noonan J.J. 1982; Formelli F. y cols. 1983). Por el contrario Mason M.C. y cols. (1983) al administrar drogas que inducían aumento en los niveles de prolactina no obtuvieron efectos sobre el desarrollo tumoral. Hay que resaltar el hecho de que si bien la hiperprolactinemia inducida por cualquier medio tiene efectos potenciadores sobre el desarrollo de estos tumores, sin embargo, los niveles de prolactina durante la fase de inducción tumoral, o durante períodos estacionarios, de

crecimiento rápido o de regresión, están en el rango considerado como fisiológico (Gala R.R., Loginsky S.J. 1973; Nagasawa H. y cols. 1973).

Otra hormona que ha demostrado influir en el desarrollo de los tumores inducidos por DMBA es la insulina, describiéndose regresiones de estos tumores tras inducir en los animales estados de diabetes (Cohen N.D., Hilf R. 1974, 1975). Benson E.A., Holdaway I.M. (1982) describen esta insulinodependencia en cultivos de células de tumor de mama humano.

III.2.4 - Protocolos de inducción tumoral

La inducción de tumores mamarios en ratas con 7,12-dimetilbenzantraceno (DMBA), puede lograrse administrando el cancerígeno por diferentes vías :

- VIA TOPICA. Mediante pinceladas diarias con DMBA sobre la piel de las ratas (Orr J.W. 1955).

- VIA SUBCUTANEA O INTRAMAMILAR. La inyección de DMBA en el tejido mamario lleva a la formación de tumores en el sitio de la inyección (Dunning W.F. y cols. 1940).

- VIA INTRAVENOSA . La inducción de cáncer mamario en ratas por inyección intravenosa de emulsionados de DMBA fué descrito por Geyer R.P. y cols. (1951) y posteriormente por Huggins C. y cols. (1959, 1961 a).

- VIA ORAL. Es la vía más usual ya que se consigue una

elevada incidencia tumoral con baja mortalidad. En nuestro trabajo utilizamos esta pauta por lo que vamos a revisarla con mayor detalle.

La producción de tumores mamarios por administración oral de hidrocarburos aromáticos policíclicos fué descubierta de manera accidental, cuando se trataba de inducir tumores gástricos por instilación de metilcolantreno (Shay H. y cols. 1949). Diez años más tarde, Huggins C. y cols. (1959) publicaban las pautas para producir carcinomas mamarios en ratas sprague-dawley, mediante administración intragástrica de metilcolantreno. La latencia en la aparición de los tumores fué de alrededor de 60 días, dependiendo de la dosis de metilcolantreno, la pauta de administración y el estado hormonal del receptor. Huggins C. y cols. (1961 b) mejoraron sustancialmente este modelo experimental, mostrando que una sola dosis oral de DMBA administrada a ratas hembra (sprague-dawley), de 50 - 65 días de edad producía en cerca del 100 % de los casos, adenocarcinomas mamarios, con una latencia de aproximadamente dos meses. Esta observación ha sido posteriormente confirmada por numerosos autores (Boylard E., Sydnor K.L. 1962; Huggins C., Yang N.C. 1962; Dao T.L. 1964; Huggins C., Sugiyama T. 1966; Archer F.L., Orlando R.A. 1968; Yoshida H., Fukunishi R. 1977).

III.2.5 - Factores que influyen en la inducción del cáncer mamario con DMBA

A lo largo de los años se ha demostrado que una única dosis de DMBA es suficiente para inducir tumores mamarios bajo determinadas condiciones. Los factores críticos son : por parte del agente carcinogénico, naturaleza y dosis; por parte del receptor, especie, raza,

edad, estado hormonal y estado de desarrollo de la mama.

- NATURALEZA DEL CARCINOGENO. Muchas sustancias con distinta estructura molecular tienen en común la propiedad de inducir cáncer mamario selectiva y rápidamente en la rata; el efecto parece ser relativo a la participación en un complejo molecular de un hidrocarburo aromático polinuclear, con una configuración geométrica determinada; pero aún así, no todos tienen el mismo efecto. Otro factor a considerar es la liposolubilidad del cancerígeno, cuanto mayor sea ésta, mayores concentraciones se alcanzarán en el tejido graso mamario (Petrakis N.L. y cols. 1978). Wagner D.A. y cols. (1982) describen mayor incidencia tumoral adicionando al hidrocarburo una dieta rica en grasas.

- DOSIS DEL CARCINOGENO.

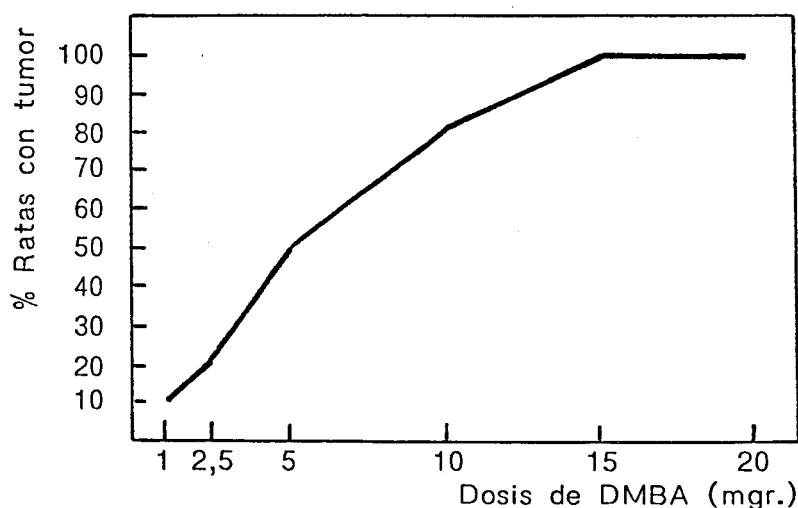


Fig. 11.

La Figura 11 muestra la relación existente entre la dosis de DMBA y el número de animales que presentan tumores mamaros. Como podemos observar una dosis de 1 mgr. de DMBA llega a inducir cáncer mamario en ratas hembra, aunque con una incidencia mínima; según se va aumentando la dosis, observamos como aumenta progresivamente la

incidencia, hasta llegar a una dosis óptima de 20 mgr. donde la incidencia es aproximadamente del 100 %. Por encima de la dosis óptima la mortalidad comienza a ser grande, debido a los efectos tóxicos del DMBA. Dosis del orden de 50 mgr. tienen una mortalidad del 100 % (Huggins C. 1961 b).

- ESPECIE DEL RECEPTOR. Al igual que los virus oncógenos los carcinógenos químicos poseen en mayor o menor medida especificidad de especie. Así, la rata es altamente sensible al DMBA, mientras que no lo son otros roedores como el hamster (Sydnor K.L. y cols. 1962). No obstante cuanto más potente sea el agente carcinógeno, más amplia será la gama de animales susceptibles (Robbins S.L., Angell M. 1973).

- RAZA DEL RECEPTOR. Entre las ratas, la raza Marshall presenta una gran resistencia a la inducción tumoral, mientras que por ejemplo las razas Sprague-Dawley, Wistar, Chester Beatty y August muestran alta sensibilidad al DMBA. Las ratas Sprague-Dawley son las más receptivas presentando mayor incidencia y menor tiempo de latencia que las otras (Boyland E., Sydnor K.L. 1962; Engelbart K., Gericke D. 1964 a, 1964 b).

- EDAD DEL RECEPTOR. La edad es un factor crítico en la inducción de cáncer por DMBA. En varios trabajos se ha comprobado como puede inducirse cáncer mamario en ratas púberes de 23 días de edad, aumentando progresivamente la incidencia de tumores hasta los 50 - 60 días de edad. Cuando se administra el carcinógeno por encima de los 75 días disminuye la incidencia de aparición de tumores, desarrollándose

raramente tumores por encima de los 100 días de edad. Las ratas de 55 días son las más vulnerables a los efectos carcinogénicos del DMBA (Scholler J., Carnes R.E. 1958; Huggins C. y cols. 1961 a, 1961 b; Boyland E., Sydnor K.L. 1962; Huggins C., Yang N.C. 1962; Dao T.L.1969).

- ESTADO HORMONAL DEL RECEPTOR. La ovariectomía aumenta el período de latencia y reduce el número de animales afectados por tumoración, tras el DMBA. Este efecto inhibitor de la ovariectomía se suprime administrando diariamente de 0,1 a 1 microgramos de estradiol-17 beta. La administración de progesterona estimula también el desarrollo de estos tumores (Huggins C. y cols. 1959). Hay autores que describen variaciones en el tamaño de los tumores, según el momento del ciclo estral de la rata en el cual se administra el DMBA (Lindsey W.F. y cols. 1981). Yoshida H. y cols. (1982 a) describen inducción de tumores mamarios en animales gonadectomizados tras repetidas dosis de DMBA, y observan unos niveles de receptores estrogénicos más bajos que en animales intactos.

- ESTADO DE DESARROLLO DE LA MAMA. Observando el paralelismo existente entre los niveles circulantes hormonales y el desarrollo de los órganos sensibles, se ha correlacionado la aparición de tumores mamarios con la fase del tejido mamario en el momento en el cual se administra el hidrocarburo; de esta manera se ha visto como la incidencia tumoral es mayor cuanto más indiferenciada esté la mama; la administración del DMBA altera la normal diferenciación de la estructura mamaria bulbo terminal-alvéolo-lóbulo, induciendo bulbo terminal-proliferación intraductal-adenocarcinoma; cuantos más bulbos terminales haya, mayor será la incidencia tumoral (Middleton P.J. 1965; Russo I.H., Russo J. 1978; Russo J., Russo I.H. 1980).

IV - RELACION ENTRE LA GLANDULA PINEAL Y EL CANCER

La historia de la pineal como órgano endocrino se remonta a tan solo 25 años, así Lerner A.B. y cols. en 1958 marcaron su comienzo con el descubrimiento de la melatonina, la hormona responsable de las acciones antigonadotróficas pineales. En los primeros años, como es lógico, los trabajos en torno a este órgano fueron de tipo "básico", en animales, destinados a aclarar los mecanismos de funcionamiento de la glándula, su dependencia de la luz o sus acciones sobre el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas. Por el contrario en los últimos años han comenzado a tener un carácter aplicativo. En esta línea se encuentran los trabajos que relacionan la función pineal con el crecimiento de tumores en general y con el de los tumores esteroide-dependientes en particular, dando lugar estos últimos incluso a una aplicación terapéutica de las propiedades antigonadotróficas de la melatonina.

Aunque el mayor auge de los trabajos que relacionan pineal y tumores se ha producido en los últimos años, los primeros experimentos conocidos, fueron realizados hace ya 50 años, por Engel P. (1934) y Bergmann W., Engel P. (1950); desde entonces han sido muchos los autores que han sugerido un papel protector de la pineal ante algunos tipos de procesos neoplásicos.

En 1977 se llevó a cabo en Viena el primer intento de acercamiento de la fisiología de la glándula pineal a la oncología, realizándose la primera reunión de pinealólogos y cancerólogos, siendo éste el punto de partida de múltiples trabajos e investigaciones realizados posteriormente.

Los datos a favor de una relación entre la función pineal y los adenocarcinomas mamarios pueden resumirse en dos grandes grupos : datos epidemiológicos y datos experimentales.

IV.1 - Datos epidemiológicos

-- Las calcificaciones pineales son abundantes en los individuos de poblaciones con alta incidencia de cáncer mamario y escasas en los de baja incidencia (Cohen M. y cols. 1978). El significado funcional de la calcificación pineal es aún hoy día controvertido; así, mientras unos trabajos apoyan la tesis de Reiter R.J. y cols. (1976) afirmando que la presencia de calcificaciones en la glándula pineal es un índice de actividad, estudios más recientes muestran descensos en la secreción de melatonina asociados con calcificaciones. Se ha observado como la incidencia de las calcificaciones pineales varía en diferentes poblaciones, aumentando en todas ellas con la edad. Mientras el 2 % de los caucasianos muestran pineales calcificadas entre los 3 y 12 años, el 46 % de los 13 a los 40 años y el 60 % después de los 40 años, en Japón sólo aparecen en el 10 % de la población adulta. Junto a esto, la incidencia de cáncer de mama es relativamente baja en Sudáfrica y en Japón y alta en Norteamérica y Europa; considerándose, por ello, la calcificación precoz de la pineal como un factor de riesgo del cáncer de mama (Cole P. 1974, Cohen M. y cols. 1978; Blask D.E. 1984).

En grupos de mujeres con carcinomas, la incidencia de calcificación pineal era significativamente mayor que en otro grupo control de mujeres de la misma edad y sin enfermedad maligna (Drexler J. y cols. 1957; Tapp E., Blumfield M. 1970).

-- Algunas drogas como la clorpromacina incrementan los niveles séricos de melatonina, inhibiendo el paso de melatonina a 6-hidroximelatonina (Wurtman R.J., Axelrod J. 1966). Se ha demostrado que en pacientes psiquiátricos, tratados con esta droga, la incidencia de tumores de mama es muy baja. (Cohen M. y cols. 1978).

-- La menarquía precoz está considerada como un factor de riesgo para el cáncer mamario; junto a esto, uno de los factores que intervienen en el comienzo de la pubertad parece ser la glándula pineal, modificando su tasa de secreción de la melatonina (Penny R. 1982; Gupta D. y cols. 1982; Rivest R.W. y cols. 1985).

-- La incidencia de tumores mamarios es 5-6 veces mayor en los países nórdicos que en los meridionales (De Waard F. 1969; Cole P. 1974). Curiosamente se ha descrito también una relación entre el volúmen de la glándula pineal de numerosas especies animales y la latitud geográfica de su hábitat. El mayor tamaño y complejidad estructural corresponde a latitudes altas (Legait H. y cols. 1973; Ralph C.L. y cols. 1979; Quay W.B. 1980).

IV.2 - Datos experimentales

IV.2.1 - Glándula pineal y desarrollo tumoral en modelos animales

TUMORES INDIFERENCIADOS

* Tumor Yoshida

Efectos de la pinealectomía - La influencia de la pinealectomía neonatal, bien sola o en combinación con timectomía, ha sido evaluada tanto en el desarrollo como en el tipo de metástasis de tumores Yoshida transplantados en ratas a los 60 - 80 días después de la cirugía. En ambos casos el desarrollo tumoral fué superior al de los animales intactos, siendo inferior la supervivencia, independientemente de la timectomía (Lapin V. 1974). Los animales pinealectomizados presentaban predómino de metástasis en páncreas, mientras en los timectomizados predominaban las hepáticas; los animales pinealectomizados-timectomizados presentaban ambos tipos de metástasis (Lapin V. 1974, 1975).

Efectos de la melatonina - En animales intactos la melatonina, inyectada diariamente al final de la fase de iluminación, no modifica el desarrollo tumoral, mientras que tanto la N-acetil-serotonina como la serotonina reducen el tumor al 50 %. Sin embargo en los pinealectomizados la melatonina no solo previene el incremento del desarrollo tumoral, inducido por la ablación pineal, sino que también aumenta la supervivencia. La serotonina inhibe el desarrollo tumoral en ratas intactas y pinealectomizadas; la administración de drogas que alteran el metabolismo de la serotonina, aumentando los niveles de serotonina y reduciendo los de melatonina, produce una inhibición del desarrollo tumoral (Lapin V. 1979; Lapin V., Frowein A. 1981).

Efectos de fracciones pineales de bajo peso molecular - Aunque no se describen efectos sobre el desarrollo tumoral, existen evidencias a favor de que fracciones pineales, como la UM-05R prolongan la supervivencia en animales control con sarcoma Yoshida, mientras que otras como la UM-2R la reducen (Lapin V., Ebels I. 1976).

* Tumor de Ehrlich

Efectos de la pinealectomía y melatonina - El tumor de Ehrlich es una neoplasia derivada de un carcinoma espontáneo de ratón, que se presenta tanto en forma sólida como ascítica. Se ha observado que el desarrollo medio de la forma sólida en ratas pinealectomizadas es 50 % mayor que en los controles. En la forma ascítica la pinealectomía estimula significativamente el desarrollo de este tumor (Bindoni M. 1971). A los 20 días después de la implantación, el índice mitótico en la forma sólida de los animales pinealectomizados era mayor que en los intactos; en la forma ascítica se observó un aumento a los 5 días después de la inoculación, igualándose a los controles a los 12 días.

En experimentos recientes, se determinaron los efectos de inyecciones de melatonina, en varios momentos del día, sobre el desarrollo de tumores sólidos de Ehrlich, en ratones. En fotoperíodos LD 13/11, inyecciones de 100 microgramos de melatonina por la mañana, pocas horas después de comenzar la fase de iluminación, induce un leve aumento en el peso del tumor, después de 10 días de tratamiento. La melatonina inyectada a mediodía no tiene ningún efecto sobre el desarrollo tumoral, mientras que la administración de la melatonina al final de la fase de iluminación, inhibe el desarrollo tumoral. En condiciones de fotoperíodo corto LD 8/16 no aparece ninguno de los efectos anteriores (Bartsch H., Bartsch C. 1981). Este hecho evidencia que los efectos de la administración de melatonina sobre el desarrollo tumoral, dependen del fotoperíodo y del momento de su administración, existiendo, en condiciones de fotoperíodos largos, un ritmo diario de sensibilidad a los efectos antitumorales de la melatonina.

SARCOMAS

Los sarcomas son tumores derivados de células mesenquimales, que incluyen fibrosarcomas y leucemias.

* Fibrosarcoma

Efectos de la pinealectomía - En trabajos recientes se describe que los fibrosarcomas transplantados a animales pinealectomizados, experimentan un desarrollo más rápido y alcanzan un volúmen superior que cuando el receptor es un animal intacto (Barone R.M. y cols. 1972). En sarcomas inducidos por polyoma virus, no se aprecian diferencias dependiendo de que el receptor fuera un animal pinealectomizado o intacto. El factor determinante en el desarrollo de este tipo de tumores es el timo, cuya supresión es capaz de favorecer el crecimiento tumoral, con independencia de la función pineal (Wrba H. y cols. 1975; Rella W., Lapin V. 1976).

Efectos de la melatonina - Los efectos de la melatonina sobre fibrosarcomas inducidos por metilcolantreno dependen tanto de la hora como de la vía de administración de la hormona . Con inyecciones vía intraperitoneal, la administración vespertina inhibe el desarrollo de fibrosarcomas, aumentando la supervivencia de los animales, mientras que la matutina produce efectos opuestos. La vía subcutánea es inefectiva con cualquier pauta de administración, quizás por incapacidad de alcanzar niveles suficientemente elevados en el fluído peritoneal (Bartsch H., Bartsch C. 1981). En animales con tumores sólidos, inducidos por metilcolantreno, inyecciones diarias de melatonina (50 microgramos), durante 7 semanas, aumentan la latencia en la aparición del tumor y reducen la incidencia

tumoral en un 50 % en relación a los animales control (Lapin V., Ebels I. 1976).

Efectos de fracciones pineales de bajo peso molecular - Lapin V., Ebels I. (1976), en el mismo modelo experimental anteriormente comentado, demuestran como la administración de la fracción pineal UM-2R, siguiendo el mismo protocolo que la melatonina, tiene un efecto inhibitor del desarrollo de los fibrosarcomas, mayor que el conseguido con la melatonina.

* Leucemias

Efectos de la pinealectomía - Lapin V. (1978) no hallaba diferencias en la aparición de leucemias entre animales intactos, pinealectomizados o timectomizados neonatalmente. Sin embargo, tras la administración de un depletor de catecolaminas como la reserpina, los animales pinealectomizados presentan una elevada incidencia de leucemias y una mortalidad mayor que la de los restantes grupos. Este hecho era interpretado como que los disturbios en el sistema neuroendocrino, originados por la pinealectomía perinatal, son latentes y sólo se evidencian tras la administración de la reserpina.

Efectos de la melatonina - Buswell R.S. (1975) demuestra en ratones BALB/c, tratados con melatonina (100 microgramos) y sometidos a un tipo especial de leucemia transplantable (células LSTRA), que la incidencia de aparición de tumores y su desarrollo posterior era inferior al del grupo control. No obstante, en este trabajo, el autor no describe el fotoperíodo, ni el momento del día en el que hace la administración.

Efectos de fracciones pineales de bajo peso molecular - Extractos de pineales bovinas parcialmente purificados fueron inyectados en ratones, dos semanas antes de inocularles linfocitosis L10-1, aumentando en estos animales la supervivencia y disminuyendo el número de ratones afectados. Sin embargo, estos efectos no aparecieron utilizando otro tipo de leucemia transplantable (L-1210) (Dilman V.M. y cols. 1979).

CARCINOMAS

Los carcinomas, tumores malignos de origen epitelial, han sido el modelo de tumor más utilizado en el estudio de la influencia pineal en la tumorigénesis.

* Carcinoma cervical de células escamosas

Efectos de fracciones pineales de bajo peso molecular - Ratones BALB/c, a los que se transplantó células de carcinoma cervical escamoso y cuatro días después se les instauró un tratamiento consistente en inyecciones diarias (durante 10 días), subcutáneas, de 10 mgr. de extractos parcialmente purificados de pineales bovinas, presentaron un desarrollo tumoral significativamente inferior (68 %) que en animales no tratados (Dilman V.M. y cols. 1979).

* Carcinoma de pulmón Lewis

Efectos de la melatonina y extractos pineales de bajo peso molecular - Lapin V., Ebels I. (1976) describen como la fracción F3, obtenida por filtración de la fracción UM-05F en gel de sephadex G-10,

administrada en ratones DBF₁ con trasplantes intramusculares de células de carcinoma pulmonar de Lewis, prolonga la supervivencia de los animales; mientras que la administración de melatonina la reduce.

* Hepatocarcinoma

Efectos de fracciones pineales de bajo peso molecular y pinealectomía - Está descrito que ratones C3HA portadores de hepatoma 22A transplantado, tratados con inyecciones diarias de un extracto de pineal bovina (2 mgr.), durante diez días, desde el cuarto día después del trasplante, experimentaron un significativo descenso (35 %) en el peso tumoral, comparado con los animales control, confirmando la acción antitumoral de la pineal (Morozov V.G., Khavinson V.Kh. 1974); sin embargo, estos resultados no están de acuerdo con los obtenidos por Lacassagne A. y cols. (1969) los cuales describen una inhibición del desarrollo de tumores hepáticos inducidos experimentalmente, tras pinealectomía.

* Carcinoma de ovario

Efectos de la pinealectomía - Tras la ablación pineal, el desarrollo de tumores ováricos inoculados en hamster, se ve favorecido en los animales que fueron previamente pinealectomizados, con respecto a los intactos y a los sham-operados (Das Gupta T.K. 1968).

* Carcinoma de Walker 256

Efectos de la pinealectomía - Rodin A.E. en 1963 fué el primero en demostrar los efectos de la extirpación pineal sobre el

crecimiento y desarrollo del carcinoma de Walker 256. Este tumor fué transplantedo en ratas de 40 - 50 gramos intactas o pinealectomizadas. El grupo de animales sin pineal presentaba significativo descenso de la supervivencia, mayor aumento de los diámetros tumorales y mayor número y extensión de sus metástasis. Un dato a reseñar de este trabajo es la descripción de alteraciones morfológicas e histológicas en la pineal, en animales que habían muerto por el tumor. Posteriormente Barone R.M., Das Gupta T.K. (1970) confirman las acciones antitumorales de la pineal, describiendo aumento en el tamaño tumoral en ratas pinealectomizadas, 24 días después de haberlas transplantedo el tumor. Otro dato que aportan estos autores es el mayor número de metástasis pulmonares en las ratas pinealectomizadas (79 % frente al 36 % de las ratas control); también describen aumento en la incidencia de metástasis linfáticas en axila y mediastino, por lo que se inclinan a explicar el efecto promotor de la pinealectomía sobre el desarrollo tumoral, por una alteración en la inmunidad del animal; extremo éste negado por otros autores (Rella W., Lapin V. 1976).

Una relación entre el desarrollo del carcinoma de Walker 256 y el fotoperíodo fué estudiada por Tessmann D. y cols. (1972), encontrando que a medida que se aumenta la duración de la fase de luz frente a la de oscuridad, el tumor crece más. Cuando los animales son situados en luz continua (pinealectomía funcional), el tumor crece desmesuradamente.

* Melanoma

Efectos de la pinealectomía - Das Gupta T.K., Terz J.

(1967 a, 1967 b) estudiaron el efecto ejercido por la pineal en el desarrollo de neoplasias pigmentadas, utilizando el melanoma Nº 1, inoculado en hamster. A partir de la segunda semana de haber inoculado la suspensión de células tumorales, el diámetro del tumor fué mayor en los pinealectomizados que en los controles, llegando a ser su volumen cinco veces mayor; además de ésto, presentaban mayor incidencia de metástasis pulmonares, renales y linfáticas axilares. En melanomas inducidos por DMBA, la pinealectomía también provoca un incremento en el tamaño y número de tumores (Aubert C., Bohuon C. 1970; Aubert C. y cols. 1970; Stanberry L.R. y cols. 1983).

Efectos de la melatonina y fracciones pineales de bajo peso molecular - La administración intraperitoneal de 0,1 miligramos de melatonina durante tres semanas, no influye sobre el desarrollo de melanomas en animales intactos. Sin embargo, la administración de la misma dosis de melatonina a animales pinealectomizados, anula el efecto acelerador del desarrollo tumoral inducido por la pinealectomía, lo cual sugiere que los efectos provocados por la pinealectomía se deben a un déficit de melatonina endógena (El-Domeiri A.A.H., Das Gupta K.D. 1973; Ghosh B.C. y cols. 1973; El-Domeiri A.A.H., Das Gupta K.D. 1976; Stanberry L.R. y cols. 1983).

La administración de extractos de pineales bovinas parcialmente purificados, cuatro días después del transplante de tumores melánicos (melanoma Harding-Passey) en ratones, no produce ningún efecto sobre el desarrollo tumoral (Dilman V.M. y cols. 1979); esta ausencia de efectos pudiera deberse, bien a la brevedad del tratamiento o a una incorrecta elección del momento en el cual se administró el extracto.

* Carcinoma mamario

Los modelos animales más corrientemente usados para el estudio de la tumorigénesis mamaria son los tumores de mama espontáneos en el ratón y los tumores de mama inducidos por DMBA en la rata, sobre los que hay abundante bibliografía.

Los tumores de mama inducidos por DMBA son, en su mayor parte, hormonodependientes, estando influenciados en su génesis y desarrollo por hormonas, tales como los estrógenos, la progesterona y la prolactina. Debido a su semejanza con los carcinomas mamarios humanos ha sido escogido como modelo ideal para el estudio de la relación pineal-tumorigénesis mamaria.

Efectos de la pinealectomía - Los efectos de la ablación pineal sobre el desarrollo de tumores mamarios inducidos por DMBA, han sido estudiados en innumerables trabajos. Lapin V. (1978) estudió los efectos de la pinealectomía neonatal sobre la tumorigénesis mamaria en ratas Wistar a las que administraba DMBA cada 10 días, de los 85 a los 105 días de edad. A los 400 días la incidencia tumoral fué igual en pinealectomizados que en intactos; sin embargo, si los pinealectomizados eran tratados con reserpina, la incidencia tumoral era 100 % mayor y la supervivencia menor en los animales sin pineal con respecto a los controles (Lapin V. 1978, 1979). Otros autores (Aubert C. y cols. 1980) no encuentran alteración del desarrollo tumoral tras pinealectomía. Lapin V. sugiere que la pinealectomía ejerce un efecto latente sobre la secreción de prolactina, que es desenmascarado tras la administración de reserpina, deplector de catecolaminas e inductor de hiperprolactinemia directamente,

ambos efectos probablemente aumentan los niveles de prolactina de manera que se favorezca el desarrollo del tumor.

Estudios de Tamarkin L. y cols. (1981), corroborando otros anteriores de Lapin V. (1978) y de Aubert C. y cols. (1980), parecen indicar que en inducciones tumorales con dosis bajas de DMBA (7 mgr./rata), la pinealectomía favorece el desarrollo de los tumores; mientras que carece de efecto cuando la cantidad de DMBA administrada es alta (15 mgr./rata). Es interesante resaltar uno de los datos del trabajo de Tamarkin L. y cols. (1981), anteriormente comentado, se trata del aumento de los niveles de prolactina hallado en las ratas pinealectomizadas, lo cual les hizo suponer que los efectos inducidos por la pineal pudieran estar mediados por un descenso en los niveles de prolactina.

Efectos de la melatonina - En los últimos años ha habido un resurgir del interés del potencial de la melatonina como agente antitumorígeno en general y en el cáncer de mama en particular. Sin embargo, los primeros estudios en esta línea fueron negativos. Así, Hamilton T. (1969), proponía que la actividad pineal es un factor potenciador de la tumorigénesis, basando su afirmación en estudios en los cuales ratas tratadas con DMBA y situadas en luz continua, presentaban una elevada incidencia de fibroadenomas, frente a un predominio de adenocarcinomas en los animales expuestos a fotoperíodos LD 12/12. La administración de melatonina en ratas en luz continua careció de efectos, mientras que en los animales situados en LD 12/12, provocó un aumento en la aparición de formas tumorales malignas.

Karmali R.A. y cols. (1978) estudiaron los efectos de

dosis diarias de melatonina (1 mgr.), sobre el desarrollo de tumores mamarios R3230 AC, transplantados en ratas Fischer, observando un retardo en el desarrollo de estos tumores, aproximadamente en un 60 %. Conclusiones semejantes han sido obtenidas con otros modelos experimentales; así, inyecciones diarias de melatonina (200 microgramos), administradas al final de la fase de iluminación, disminuyen la incidencia de tumores mamarios inducidos por DMBA, tanto en ratas intactas como pinealectomizadas, mantenidas en LD 12/12; en condiciones de luz continua, la melatonina no afecta la incidencia tumoral en ninguno de los grupos (Aubert C. y cols. 1980). De estos resultados podría deducirse que la presencia de la pineal no es requisito imprescindible para que las acciones inhibitoras de la melatonina sobre la inducción tumoral se produzcan; hipótesis con la que discrepan trabajos posteriores de Tamarkin L. y cols. (1981). Estos mismos autores (Aubert C. y cols. 1980) observaron que la administración vespertina de la melatonina, provocaba rápidamente (3 - 7 días) una reducción en el tamaño y número de tumores previamente inducidos por DMBA; este hecho indicaría que la melatonina puede inducir la regresión de tumores mamarios avanzados. Sin embargo, la ausencia de un correcto análisis estadístico de estos datos les resta fiabilidad.

En un estudio similar se describe como inyecciones diarias de melatonina (500 microgramos), al atardecer, comenzando el mismo día de la administración de DMBA y continuando 90 días después, reducen en un 75 % la incidencia de tumores mamarios, comparado con los controles (Tamarkin L. y cols. 1981). En este mismo trabajo, destaca el hallazgo de niveles bajos de prolactina en los animales tratados con melatonina; este hecho es un argumento más, junto al anteriormente expuesto al hablar de la pinealectomía, a favor de que el efecto antitumoral está mediatizado

por la hipoprolactinemia inducida por la actividad de esta glándula.

Efectos de fracciones pineales de bajo peso molecular - La administración de extractos de pineales bovinas parcialmente purificados, desprovistos de melatonina, a ratas que habían sido tratadas con DMBA un mes antes, provoca un descenso en la incidencia tumoral, así como una reducción en el número de tumores (Dilman V.M. y cols. 1979). Los extractos pineales parecen ser más eficaces, que la administración de melatonina aislada, en la inhibición del desarrollo de tumores mamarios espontáneos en el ratón (Anisimov V.N. y cols. 1973 a, 1973 b).

IV.2.2 - Cambios morfológicos, bioquímicos y fisiológicos de la glándula pineal en relación con los procesos neoplásicos

CAMBIOS MORFOLOGICOS

Los primeros datos que indujeron a investigar el papel de la glándula pineal en el desarrollo de tumores malignos, fueron observaciones de cambios morfológicos en esta glándula, en sujetos fallecidos por neoplasias. Así, la glándula pineal de pacientes muertos por tumores malignos es mayor, tanto en volumen como en peso, que la de pacientes muertos por enfermedades no malignas (Rodin A.E., Overall J. 1967; Tapp E., Blumfield M. 1970; Hajdu S.I. y cols. 1972; Petrov S.V. 1984). De la misma manera Rodin A.E. (1963) observa también un aumento en el peso de la pineal de ratas inoculadas con carcinoma de Walker 256. Además de los cambios de tamaño, en la pineal de animales con neoplasias se ha descrito aumento del diámetro nuclear (Tapp E. 1980 a, 1980 b). En el

10 % de las pineales de humanos con cáncer, aparecen cambios degenerativos tales como cavitaciones, gliosis con astrocitos ensanchados y fibras de Rosenthal (Hajdu S.I. y cols. 1972). El incremento de peso de la pineal se atribuye también a aumentos en los depósitos de calcio, aumentando estos depósitos significativamente en pacientes con enfermedades malignas (Drexler J. y cols. 1957; Lapin V. 1976). Kerenyi N.A. (1979) describe en un pequeño número de personas que fallecieron por tumores malignos, evidencias de una respuesta hiperplásica por parte de la glándula pineal.

La mayoría de los autores coinciden en afirmar que estas alteraciones en la morfología pineal serían el resultado de la respuesta adaptativa de la glándula a los disturbios endocrinos originados por el proceso tumoral (Rodin A.E., Overall J. 1967; Tapp E., Blumfield M. 1970; Tapp E. 1980 a, 1980 b).

CAMBIOS BIOQUIMICOS

La actividad de la hidroxí-indol-orto-metil-transferasa ha sido medida en pineales de pacientes con neoplasias, observándose un aumento en la actividad de este enzima con respecto a otras enfermedades (Kerenyi N.A. y cols. 1977).

En estudios realizados sobre tumores inducidos por DMBA en ratas, se ha descrito aumento en el contenido de lípidos de la pineal en los animales afectos con tumoraciones, sugiriendo también un aumento en la actividad metabólica de la glándula en presencia de un tumor (Tapp E. y cols. 1980; Petrov S.V. 1984).

CAMBIOS FISIOLÓGICOS

En los últimos seis años se han realizado innumerables estudios clínicos, valorando los niveles de melatonina de pacientes con tumores malignos. Por ejemplo, Pico J.L. y cols. (1979) y Labunets I.F. y cols. (1984) comparan los niveles sanguíneos de melatonina de pacientes cancerosos, con los niveles de melatonina de personas sanas, encontrando niveles más bajos en el primer grupo. Tapp E. y cols. (1980), sin embargo, no encuentran diferencias en los niveles diurnos de melatonina entre pacientes con neoplasias y pacientes sanos; resultado que podría explicarse por el hecho de que la secreción de melatonina durante el día es muy baja, siendo difícil detectar cambios en sus niveles periféricos, por ello, las diferencias entre los niveles de melatonina en personas con cáncer y sanas debiera buscarse durante la noche, cuando los niveles de esta hormona son más elevados. Otros autores, por el contrario, encuentran diferencias incluso durante el día, entre personas sanas y personas con cáncer de mama o de próstata, presentando estas últimas niveles más altos de melatonina (Schloot W. y cols. 1981). Touitou Y. y cols. (1985) describen un descenso en la amplitud del ritmo circadiano de la melatonina en pacientes con cáncer de mama.

Bartsch C. y cols. (1981, 1985) describen que la excreción de melatonina urinaria durante 24 horas, en pacientes con cáncer, era inferior en un 31 % con respecto a un grupo control con enfermedades no malignas; además de esto, observaron como la excreción de melatonina en pacientes con cáncer no estaba sincronizada con el fotoperíodo, tal y como ocurre en personas con enfermedad no maligna y personas sanas. Por esta asincronía de la excreción de melatonina en los cancerosos, Wetterberg

L. (1983) defiende la hipótesis de que el riesgo de carcinogénesis se debe diagnosticar como un caso de cronopatología, una alteración del ritmo.

IV.2.3. - Interacción entre la melatonina y los receptores estrogénicos de los tumores hormonodependientes

Se ha observado que los receptores estrogénicos juegan un papel importante, tanto en el desarrollo normal como en el neoplásico de muchos tejidos. Estudios previos han demostrado la capacidad de la melatonina de actuar sobre los órganos esteroide-dependientes, lo cual sugiere que éstos y otros efectos inducidos por la melatonina pudieran estar mediados por alteraciones en los receptores estrogénicos. Apoyándose en esta hipótesis Danforth D.N. y cols. (1983 a) demostraron la capacidad de la melatonina de modular la actividad de los receptores estrogénicos en el útero de animales de experimentación, tanto in vivo como in vitro. En un trabajo posterior Danforth D.N. y cols. (1983 b) demuestran el aumento de actividad citoplasmática y nuclear de los receptores estrogénicos, inducido por la melatonina, en estudios in vitro, incubando células de cáncer de mama humano; este aumento de actividad no se acompaña de alteraciones del receptor para el estradiol. El aumento de la actividad del receptor estrogénico es reversible y se mantiene mientras se mantenga la melatonina. Danforth D.N. y cols. sugieren tres posibles mecanismos para explicar este efecto :

- Una modificación, inducida por la melatonina, de la síntesis o degradación de los receptores estrogénicos.

- Una acción directa de la melatonina sobre el receptor

estrogénico induciendo un cambio en su conformación, activando de esta manera sitios ocultos de la molécula.

- Induciendo la síntesis de un factor intermediario que al unirse al receptor lo active plenamente.

En un gran estudio clínico realizado por Tamarkin L. y cols. (1982) se evalúan los niveles de melatonina en 24 horas, en mujeres con cánceres de mama con receptores estrogénicos y mujeres con tumores mamarios sin receptores estrogénicos, así como en mujeres sanas. Estos autores describen como el pico normal nocturno de la melatonina era considerablemente inferior en los pacientes con tumores con receptores que en los controles o en pacientes con tumores sin receptores, entre los cuales no había diferencias.

Esta correlación entre función pineal y actividad de receptores estrogénicos, se ha comprobado también para otros receptores esteroideos, como los receptores androgénicos en el cáncer de próstata (Moeller H. y cols. 1983).

IV.3 - Glándula pineal y neoplasias humanas

A partir de los años 50 es cuando han sido exploradas las propiedades oncostáticas de la pineal. Los resultados obtenidos en los ensayos, tanto por administración de compuestos pineales como único tratamiento o complementando otros tratamientos hormonales, químicos o radiactivos, han sido variados, obteniéndose desde ausencia de efectos hasta regresión parcial o total de los tumores.

Efectos de extractos pineales - En 1959 Hofstätter R. publica un estudio de 150 pacientes cancerosos que fueron tratados con extractos pineales en combinación con cirugía, radiaciones y terapéutica hormonal, mejorando en su evolución. En un trabajo más reciente sobre siete pacientes con melanoma maligno diseminado, sólo uno respondió al tratamiento con homogeneizados pineales, reduciéndose sus metástasis subcutáneas (Svet-Moldarsky G.J. y cols. 1976). Los resultados de este estudio son difíciles de interpretar, ya que no se ha incluido un grupo tratado con placebo o con otros agentes terapéuticos, sin embargo, sugieren que los extractos pineales puedan tener un papel en el tratamiento de este tipo de tumores. Los carcinomas cervicales parecen ser también sensibles al tratamiento con extractos pineales bovinos (Tapp E. 1982).

Varios estudios clínico-patológicos han encontrado en el transcurso de terapias con extractos pineales en pacientes con cáncer, aumento en los niveles sanguíneos de glucosa y colesterol (Lenti G. y cols. 1954), aumento en el calcio sanguíneo, hipoglucemia (Milcu S.M., Milcu I. 1958), así como aumento en la creatinina y magnesio urinarios (Starr K.W. 1970).

Efectos de la melatonina - Sorprendentemente se ha hecho muy poco con respecto a evaluar la capacidad oncostática de la melatonina en clínica. En los últimos años Starr K.W. (1970) describe casos de desaparición de metástasis de rhabdomyosarcoma con altas dosis de melatonina, encontrando mayor respuesta cuanto más altos niveles circulantes de hormona del crecimiento (GH) poseían los pacientes; otros autores describen como efectivo el tratamiento con melatonina en tumores de pulmón, mama, estómago y leucemias (Burns J.K. 1973; DiBella L. y

cols. 1979). Burns J.K. en 1973 describe descenso en los esteroides urinarios en pacientes con cáncer de mama tratados con melatonina.

IV.4 - Hipótesis sobre los mecanismos de acción de la glándula pineal en procesos neoplásicos

En el momento actual no se ha aclarado aún si la influencia de la glándula pineal sobre los procesos neoplásicos se produce indirectamente, por alteración en algún mecanismo neuroendocrino, o directamente sobre las células cancerosas. La Figura 12 es una representación esquemática de los mecanismos endocrinos por los cuales la melatonina y otras hormonas pineales podrían influir sobre el cáncer de mama. Este esquema también incluye mecanismos por los cuales el tumor podría influir sobre la función pineal.

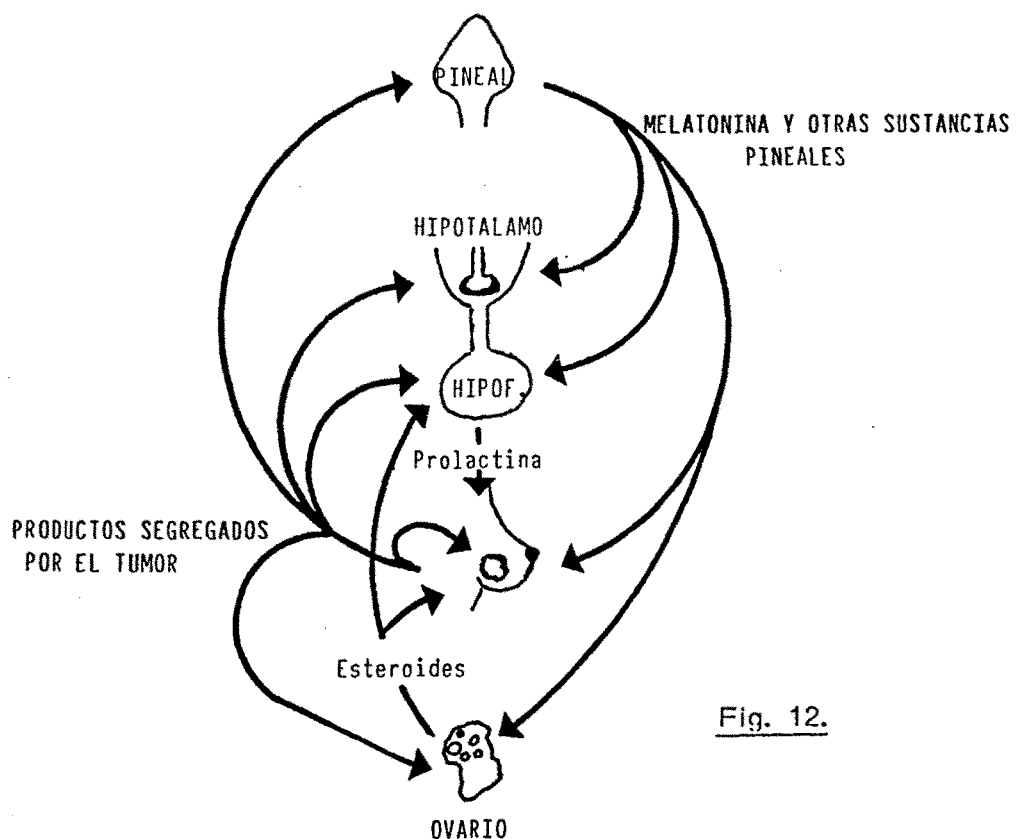


Fig. 12.

Entre las principales teorías que se postulan para explicar las acciones antineoplásicas de la pineal, se distinguen unas que relacionan la actividad de esta glándula con la tumorigénesis en general, y otras que la relacionan más en particular con los tumores de la esfera endocrina.

TEORIAS QUE RELACIONAN LA GLANDULA PINEAL Y LOS TUMORES HORMONODEPENDIENTES

- Modificación en los niveles de estrógenos. Una de las hipótesis más aceptadas se basa en que el desarrollo de los tumores mamarios podría deberse a una disminución de la actividad de la glándula pineal, bien por una alteración en el fotoperíodo, por cambios en la actividad simpática, por una calcificación pineal acelerada o por cambios en los sistemas de "feed-back" pineales en relación con hormonas periféricas. Esta teoría se fundamenta en la relación existente entre cáncer de mama e hiperestrogenismo, y por la observación de que la melatonina inhibe la producción de estrógenos ováricos, de gonadotrofinas hipofisarias y así mismo el desarrollo y maduración sexual (Cohen M. y cols. 1978).

La demostración, en los últimos años, de receptores específicos para la melatonina a nivel de gónadas, apoya la posibilidad de un efecto directo de esta hormona en los órganos del sistema reproductor (Cohen M. y cols. 1978).

- Modificaciones en la prolactina. Otros autores sugieren un papel permisivo de los estrógenos en el cáncer mamario y dan un papel más activo a la prolactina (Tapp E. 1978; Tamarkin L. y cols. 1981).

Estos autores refieren que, si bien los estrógenos juegan un papel importante en la inducción del cáncer mamario, tumores en animales que inicialmente tenían niveles altos de estrógenos, pueden desarrollarse perfectamente en ausencia de los esteroides ováricos, siempre y cuando se mantengan elevados los niveles de prolactina; así mismo observan como, en animales hipofisectomizados y ovariectomizados con tumores mamaros inducidos por DMBA, la simple administración de estrógenos es insuficiente para mantener el desarrollo tumoral. Estudiando niveles de hormonas circulantes (gonadotrofinas, estradiol, cortisol y prolactina) en animales con tumores mamaros inducidos por DMBA, y sometidos a pinealectomía e inyecciones de melatonina, encuentran niveles bajos de prolactina en los animales tratados con melatonina, mientras que las ratas pinealectomizadas tenían altos niveles de prolactina y alta incidencia tumoral; la administración de melatonina a los animales pinealectomizados restauró la incidencia tumoral a valores semejantes a los de los animales no tratados, sin llegar a los valores obtenidos en los animales intactos tratados con melatonina, es decir, que la presencia de la pineal sería necesaria para que se manifiesten los efectos antineoplásicos de la melatonina, quizás porque en estos efectos colaboren también otras sustancias pineales para las cuales la melatonina podría actuar como un factor de liberación.

En definitiva, a pesar de haberse comprobado que la administración de prolactina tiene efectos estimuladores sobre el crecimiento de tumores mamaros inducidos por DMBA, los niveles séricos de prolactina en animales tratados con DMBA están en el rango de la normalidad, tanto antes de la aparición del tumor como en la fase estacionaria, crecimiento rápido o regresión (Gala R.R., Loginsky S.J. 1973; Nagasawa H. y cols.

1973).

- Modificaciones de los sistemas de "feed-back" hipotalámicos. Stoll B.A. (1972) y Dillman V.M. (1971) sugieren que la sensibilidad hipotalámica a los mecanismos de control "feed-back" tiende a disminuir con factores tales como el stress o la edad. Según estos autores la administración de sustancias pineales puede aumentar la sensibilidad del sistema hipotálamo-hipófisis al "feed-back" de regulación de la periferia.

- Modificaciones en los neurotransmisores. Meites J. (1980) estudiando la influencia de la prolactina en el desarrollo de tumores mamarios inducidos químicamente, afirma que la serotonina es una de las sustancias hipotalámicas más importantes, que estimula la liberación de prolactina, por aumento de la liberación de la hormona liberadora de la prolactina. En animales con tumores inducidos por DMBA, la administración de serotonina produce una inhibición del desarrollo tumoral, significativamente más pronunciada en ratas pinealectomizadas que en ratas intactas. Esto sugiere que drogas de acción central pueden tener diferentes efectos según el animal haya sido o no pinealectomizado y que las monoaminas, involucradas en la regulación de la actividad hipotalámica e hipofisaria, pueden jugar un papel importante en el eje pineal-hipotálamo-hipófisis en relación con el crecimiento neoplásico (Guerinot F. y cols. 1975; Lapin V. 1976; Lapin V., Ebels I. 1981).

TEORIAS QUE RELACIONAN LA GLANDULA PINEAL CON LA TUMOROGENESIS EN GENERAL

- Modificación en la GH. Tapp E. (1980 a) intentando

analizar las alteraciones citológicas de la glándula pineal de autopsias de pacientes muertos de cáncer, observa como aquellos tumores que cursan con niveles bajos de GH, la pineal ejerce su máximo efecto inhibitorio sobre el tumor. Starr K.W. (1970) descubre un alto nivel de hormona del crecimiento en algunos tumores que él llama "somatotrópicos"; el tratamiento con melatonina origina una normalización de la GH sérica, acompañada de espectaculares resultados en cuanto a la regresión tumoral. El control de la GH por la melatonina pineal ha sido ratificado por muchos autores (Smythe G.A., Lazarus L. 1973). Así mismo, parte de las acciones de la pineal sobre la GH, se han descrito mediatizadas por acciones sobre la somatostatina (Webb S.M. y cols. 1984). Como la secreción de hormonas peptídicas, tales como la prolactina, GH, está bajo un mecanismo de control aminérgico, estos autores postulan que los metabolitos amino-orto-metilados tienen un efecto opuesto en el receptor de la amina, en comparación con el de la propia amina. La melatonina, como un derivado orto-metilado de la serotonina, podría invertir la influencia de la serotonina sobre la GH, o mejor inhibir el estímulo de liberación de hormona somatotrópica producido por la serotonina.

- Modificaciones en la homeostasis de la glucosa. Otro posible camino descrito por el que la pineal puede influir sobre el crecimiento y desarrollo tumoral es por una alteración de la homeostasis de la glucosa, induciendo cambios metabólicos en los tejidos circundantes a las células tumorales (Quay W.B., Gorray K.C. 1980). Esta alteración podría producirse por :

* inhibición de la secreción de GH (Starr K.W. 1970; Smythe G.A., Lazarus L. 1973).

* inhibición de la somatomedina, hay evidencias recientes de la acción inhibitoria a nivel periférico de la melatonina sobre la somatomedina (Smythe G.A., Lazarus L. 1973).

* inhibición del eje hipotálamo-hipófisis-adrenocortical. Se ha descrito que en determinadas condiciones la pineal puede influir sobre este eje, disminuyendo la liberación de hormona adrenocorticotrópica (ACTH) y glucocorticoides (Milne R. y cols. 1968; Reiter R.J., Fraschini F. 1969). En animales pinealectomizados se ha descrito aumento de insulina en plasma (Milcu S. y cols. 1963).

* efectos sobre la actividad adrenomedular. Las catecolaminas adrenomedulares juegan un papel importante en el control de la gluconeogénesis en la rata, probablemente a través de su acción sobre los sistemas enzimáticos de síntesis de glucosa en el hígado. La síntesis nocturna de norepinefrina adrenal puede ser inhibida por la pinealectomía, incluso hay evidencias de modificaciones temporales en las características de las vesículas sinápticas, en las terminaciones de los nervios sobre las células secretoras de adrenalina de la médula adrenal de ratas pinealectomizadas (Kachi T. y cols. 1977).

- Modificación del sistema inmunitario. Existen autores que afirman que el efecto estimulador de la pinealectomía sobre el desarrollo tumoral, está basado en una alteración de la respuesta inmunológica (Rodin A.E. 1963; Das Gupta T.K., Terz J. 1967 a, 1967 b), sin embargo, la influencia de la pineal sobre el sistema inmunitario es aún un tema de controversia. Mientras Jankovic B.D. y cols. (1970) no encuentran alteraciones en la respuesta inmunitaria de ratas

pinealectomizadas, dato corroborado posteriormente por Rella W., Lapin V. (1976), otros trabajos describen alteraciones en la inmunidad inducidas por la pinealectomía (Csaba G. y cols. 1966), postulando una correlación entre el timo y la pineal, describiendo cambios morfológicos, así como signos de involución acelerada a nivel del timo en animales pinealectomizados (Csaba G. y cols. 1966; Vaughan M.K., Reiter R.J. 1972; Csaba G., Barath P. 1975).

- Modificaciones de la proliferación celular. Puesto que la ablación de la glándula pineal se sigue de una hiperplasia de los órganos reproductores, apareciendo efectos opuestos después de la administración de extractos pineales; teniendo en cuenta que la característica esencial que diferencia la multiplicación celular normal del proceso neoplásico es la división incontrolada, dando lugar a un desarrollo anormal, numerosos investigadores se han preguntado si los compuestos pineales tienen una influencia directa reguladora sobre el desarrollo celular. En una investigación de sustancias inhibidoras del desarrollo de varios tejidos animales, dos extractos lipídicos de glándula pineal bovina mostraron tener alta actividad citotóxica en test de "screening" microbiológicos (Bardos T.J. y cols. 1968). Bindoni M. (1971) estudió el efecto de la pinealectomía sobre la división celular en varios tejidos, muestran un alto índice mitótico, así como alta incorporación de P^{32} en el DNA de las células de animales pinealectomizados, demostrando este aumento del índice mitótico también en células tumorales (Bindoni M. 1971; Bindoni M., Stanzani S. 1971). Este mismo autor compara el desarrollo e índice mitótico de tumores de Ehrlich, en ratones que estaban intactos o pinealectomizados, encontrando que sólo en el grupo de los pinealectomizados estaba aumentado el desarrollo y el índice mitótico de los tumores, comparándolo con el grupo

de intactos, lo que sugiere que la pineal frena la proliferación celular neoplásica.

La melatonina, cuando es inyectada en dosis de 100 o 200 microgramos / gr. de peso corporal en ratones con transplantes de hepatomas, produce un efecto semejante al de la colchicina, con detección en metafase, demostrándose aumento de las figuras mitóticas en este período (Vasillev S.V. 1979). La detección de la mitosis por parte de la melatonina ha sido descrito por muchos autores (Banerjee S., Margulis L. 1973; Bindoni M. y cols. 1976).

Células derivadas de metástasis nodulares de melanoma humano, obtenidas por biopsia, fueron expuestas a concentraciones crecientes de melatonina, obteniendo en el 55 % de los casos, un descenso en las mitosis proporcional al aumento de melatonina; en el 45 % restante, la melatonina aumentó la formación del tumor melánico, indujo cambios en los tipos celulares o no tuvo efecto; sin embargo, en la mayoría de los casos la melatonina pareció inhibir la proliferación de células neoplásicas (Meyskens F.L., Salmon S.F. 1981).

- Modificaciones en el metabolismo de las pteridinas. Durante los últimos años, varios autores han encontrado alteraciones en el metabolismo de las pteridinas en tumores malignos desarrollados "in vivo" e "in vitro" (Stea B. y cols. 1978; Wachter H. y cols. 1979); estos autores analizando su distribución total en diferentes órganos y regiones cerebrales en la rata, mostraron que la mayor cantidad de pteridinas se encontraba en la glándula pineal. La síntesis de pteridinas puede influir la actividad del enzima HIOMT en la glándula pineal y puede estar involucrada en la

en la biosíntesis de indoles pineales (Ebels I. 1980; Lapin V., Ebels I. 1981). Revisando la literatura científica se ha observado que en gran número de casos patológicos, el metabolismo de las pteridinas, tanto conjugadas como no conjugadas es anormal (Ebels I. 1980). De lo anterior se deduce que el metabolismo de las pteridinas puede ser importante con respecto a la relación entre la actividad pineal y el desarrollo tumoral.

JUSTIFICACION

JUSTIFICACION

El desarrollo experimental que presentamos encuentra su justificación en los siguientes puntos, ya comentados a lo largo de la introducción y que ahora resumimos :

1. - La glándula pineal ejerce sobre el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas acciones que, por su naturaleza, pueden dividirse en antigonadotróficas y antiesteroideas. Estas últimas, mucho menos estudiadas que las primeras, consistirían en un bloqueo de las acciones de los esteroides gonadales a nivel de sus órganos diana.

2. - Es conocido que las acciones de la glándula pineal pueden ser potenciadas, asociando a la privación de luz algunas maniobras experimentales como bulbectomía olfatoria, reducción de la ingesta alimentaria, anosmia periférica o exposición prolongada al frío. Algunas de estas maniobras potenciadoras han sido descritas por nuestro grupo de trabajo (Cos S. 1983; Cos S. y cols. 1983; Mediavilla M.D. y cols. 1983; Cos S. y cols. 1984; Mediavilla M.D. y cols. 1984, 1985; Sánchez-Barceló E.J. y cols. 1985 a, 1985 b, 1986).

3. - Se ha estudiado la influencia de la glándula pineal sobre el desarrollo de tumores mamarios hormonodependientes, en cuyo crecimiento juegan un papel importante los estrógenos. El modelo experimental utilizado en estos trabajo ha sido la inducción tumoral con DMBA, valorando los efectos de cambios en el fotoperíodo, pinealectomía

y administración de melatonina.

4. - No hay pues trabajos en los que se incorporen, al estudio de la relación pineal-tumor mamario, los conocimientos en torno a las maniobras potenciadoras de la actividad pineal. La utilización de estas maniobras nos permite estudiar lo que ocurre cuando los efectos de la actividad pineal son máximos y compararlo frente a un nivel de actividad normal o una supresión de la función pineal, por ablación de la glándula. Estos modelos experimentales ofrecen la ventaja de jugar siempre con niveles "fisiológicos" de hormonas pineales endógenas y no con la administración exógena de dosis de rango farmacológico.

5. - Se desconocen los mecanismos a través de los cuales la pineal ejerce sus acciones antitumorales. Dadas las características de hormonodependencia de los tumores mamarios que consideramos y la posible actividad antiesteroidea de las sustancias pineales, cabe formular la hipótesis de que acciones antiestrogénicas pinealdependientes ejercidas a nivel de la mama sean las responsables de estos efectos.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

1.- Estudiar la influencia de la glándula pineal en la sensibilidad a la aparición de tumores mamarios inducidos por administración de 7,12-dimetilbenzantraceno (DMBA).

2.- En tumores mamarios hormonodependientes, inducidos por DMBA, estudiar el papel de la glándula pineal en el crecimiento tumoral.

3.- Analizar si la influencia de la glándula pineal, en el desarrollo de tumores mamarios hormonodependientes, puede tener su origen en acciones antiestrogénicas de las sustancias pineales ejercidas a nivel del propio tejido tumoral.

SERIES EXPERIMENTALES

SERIES EXPERIMENTALES

Planteamos tres series experimentales, orientadas cada una de ellas a desarrollar cada uno de los objetivos :

- SERIE I -

Encaminada al estudio de la influencia de la actividad de la glándula pineal en la aparición de tumores mamarios, en animales tratados a los 55 días de edad con DMBA. Con el fin de obtener distintos grados de actividad pineal en el momento de administrar el agente cancerígeno, a los 28 días de edad dividimos los animales en tres grandes grupos :

- Animales sometidos a maniobras potenciadoras de los efectos de la actividad pineal.

- * Grupo E.- Animales ciegos por enucleación óptica bilateral.
- * Grupo EB.- Animales ciegos + bulbectomía olfatoria.
- * Grupo EH.- Animales ciegos + subnutrición.
- * Grupo EF.- Animales ciegos + exposición crónica a 10 °C de temperatura.

- Animales control (normofunción pineal).

- * Grupo O.- Animales intactos.

* Grupo S.- Animales pseudo-operados.

- Animales con supresión de la función pineal.

* Grupo P.- Animales pinealectomizados.

* Grupo EBP.- Animales ciegos + bulbectomía olfatoria.

* Grupo EHP.- Animales ciegos + subnutrición + pinealectomía.

* Grupo EFP.- Animales ciegos + exposición crónica a 10 °C de temp. + pinealectomía.

En todos los casos el número de animales por grupo fué de

20 - 25.

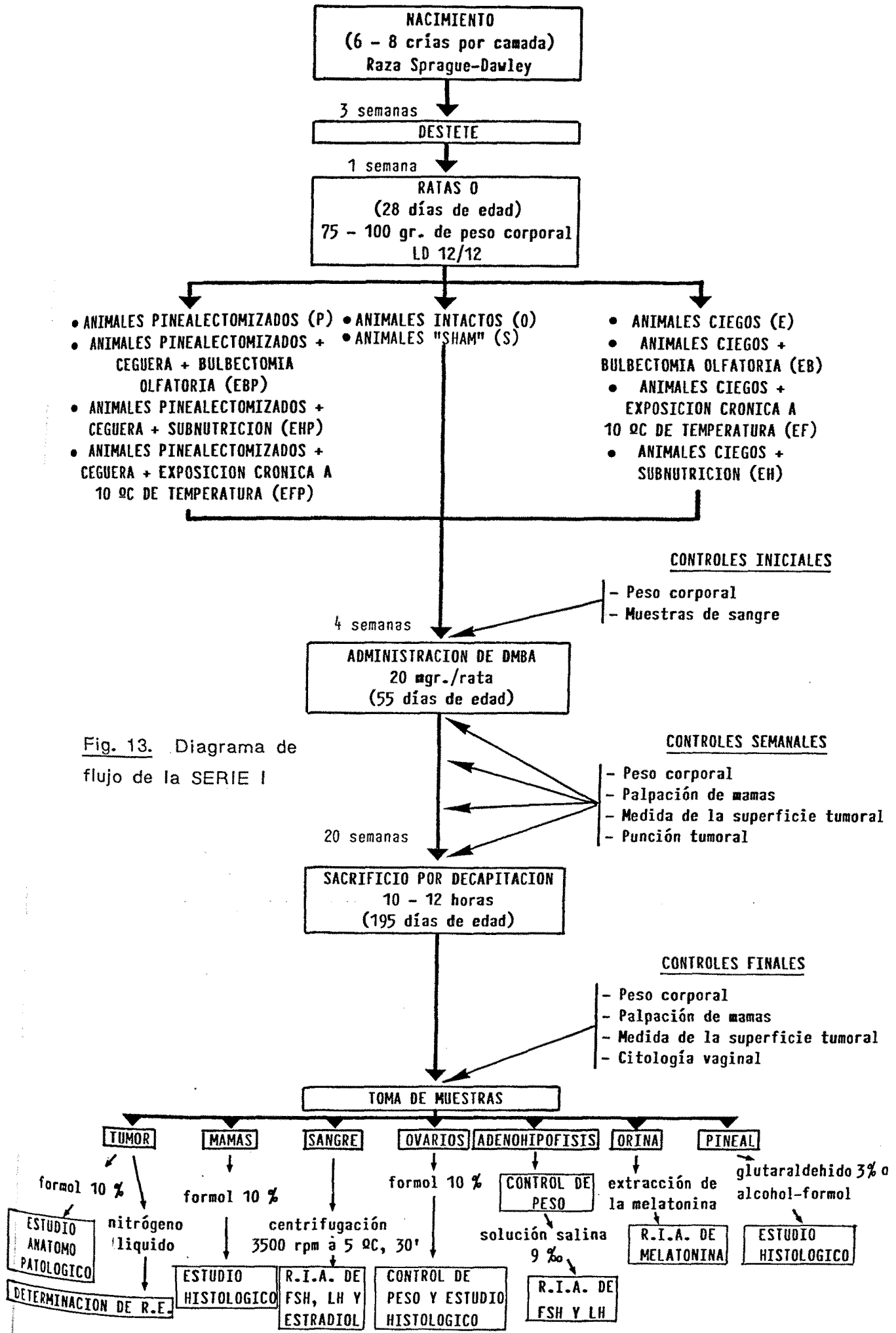


Fig. 13. Diagrama de flujo de la SERIE I

- SERIE II -

Esta serie tuvo por objeto el estudio de la influencia de diferentes niveles de actividad pineal en el desarrollo de tumores previamente inducidos por DMBA. Para ello distribuimos animales con tumoraciones con diámetro mayor de un centímetro, en tres grupos experimentales, divididos a su vez en subgrupos de 10 - 15 cada uno.

- Animales sometidos a maniobras potenciadoras de los efectos de la actividad pineal.

- * Grupo E.- Animales ciegos.
- * Grupo EB.- Animales ciegos + bulbectomía olfatoria.
- * Grupo EH.- Animales ciegos + subnutrición.
- * Grupo EF.- Animales ciegos + exposición crónica a 10 °C de temperatura.

- Animales control (normofunción pineal).

- * Grupo O.- Animales intactos.

- Animales con supresión de la función pineal.

- * Grupo P.- Animales pinealectomizados.
- * Grupo EBP.- Animales ciegos + bulbectomía olfatoria + pinealectomía.
- * Grupo EHP.- Animales ciegos + subnutrición + pinealectomía.
- * Grupo EFP.- Animales ciegos + exposición crónica a 10 °C de temp. + pinealectomía.

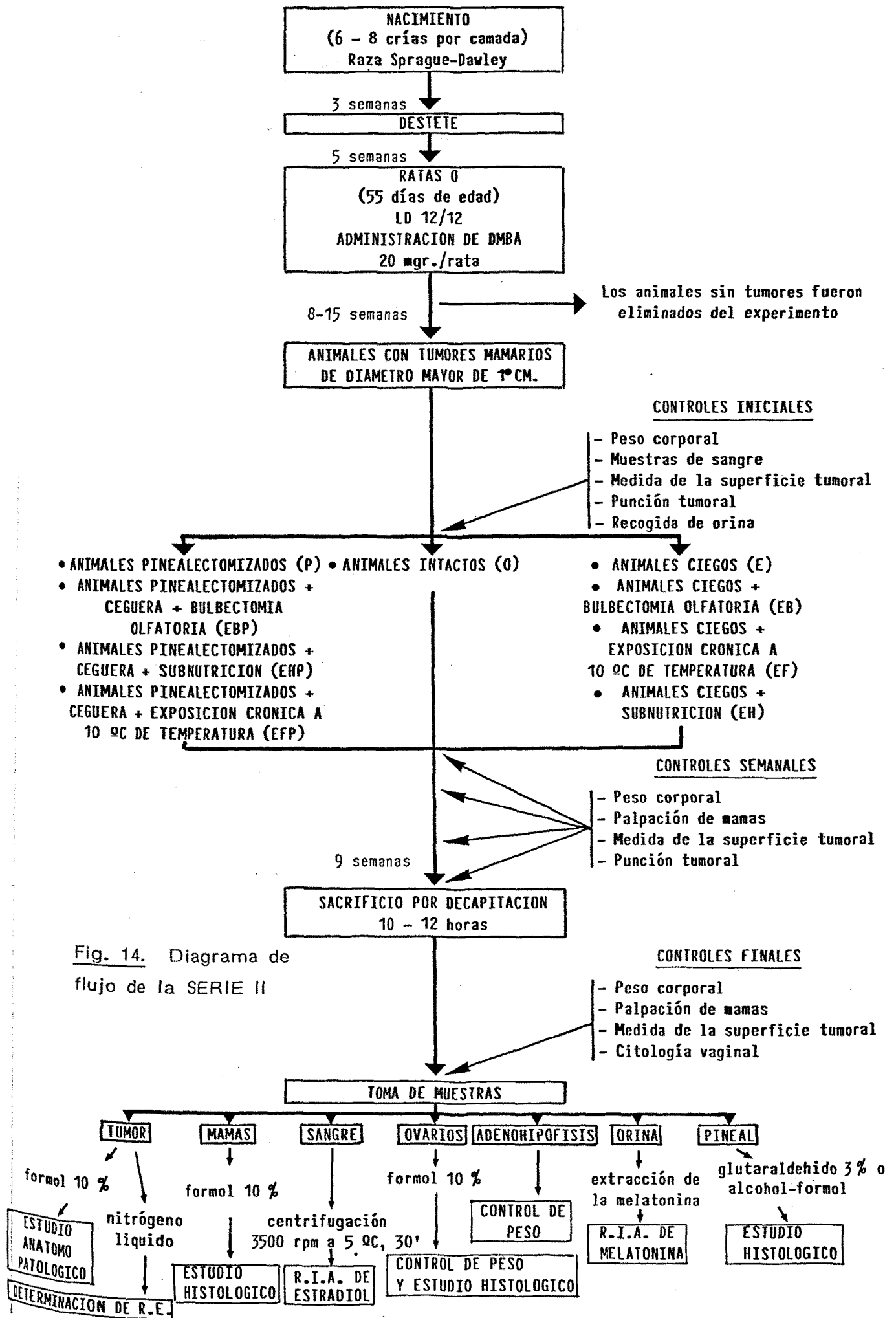


Fig. 14. Diagrama de flujo de la SERIE II

- SERIE III -

Una vez comprobado que la actividad pineal influye sobre el desarrollo de los tumores mamarios inducidos por DMBA, en este experimento tratamos de verificar si tales acciones pueden deberse a una actividad antiestrogénica de las sustancias pineales ejercida a nivel del propio tumor. Con este fin, en animales portadores de adenocarcinomas mamarios de diámetro mayor de un centímetro, practicamos simultáneamente ovariectomía y algunas de las maniobras experimentales capaces de potenciar o suprimir los efectos de la actividad pineal. Todos los animales recibieron diariamente desde el momento de la ovariectomía dosis idénticas (10 microgramos / rata) de fosfato de poliestradiol. Los grupos experimentales, formados por 10 - 15 animales cada uno fueron los siguientes :

- Animales sometidos a maniobras potenciadoras de los efectos de la actividad pineal.

* Grupo CEH.- Animales ovariectomizados + ceguera + subnutrición + tratamiento con estradiol.

* Grupo CEF.- Animales ovariectomizados + ceguera + exposición crónica a 10 °C de temperatura + tratamiento con estradiol.

- Animales control (normofunción pineal).

* Grupo C.- Animales ovariectomizados + tratamiento con estradiol.

- Animales con supresión de la función pineal.

* Grupo CP.- Animales ovariectomizados +
pinealectomía + tratamiento con
estradiol.

* Grupo CEHP.- Animales ovariectomizados + ceguera
+ subnutrición + pinealectomía +
tratamiento con estradiol.

* Grupo CAFP.- Animales ovariectomizados + ceguera
+ exposición crónica a 10 °C de
temperatura + pinealectomía +
tratamiento con estradiol.

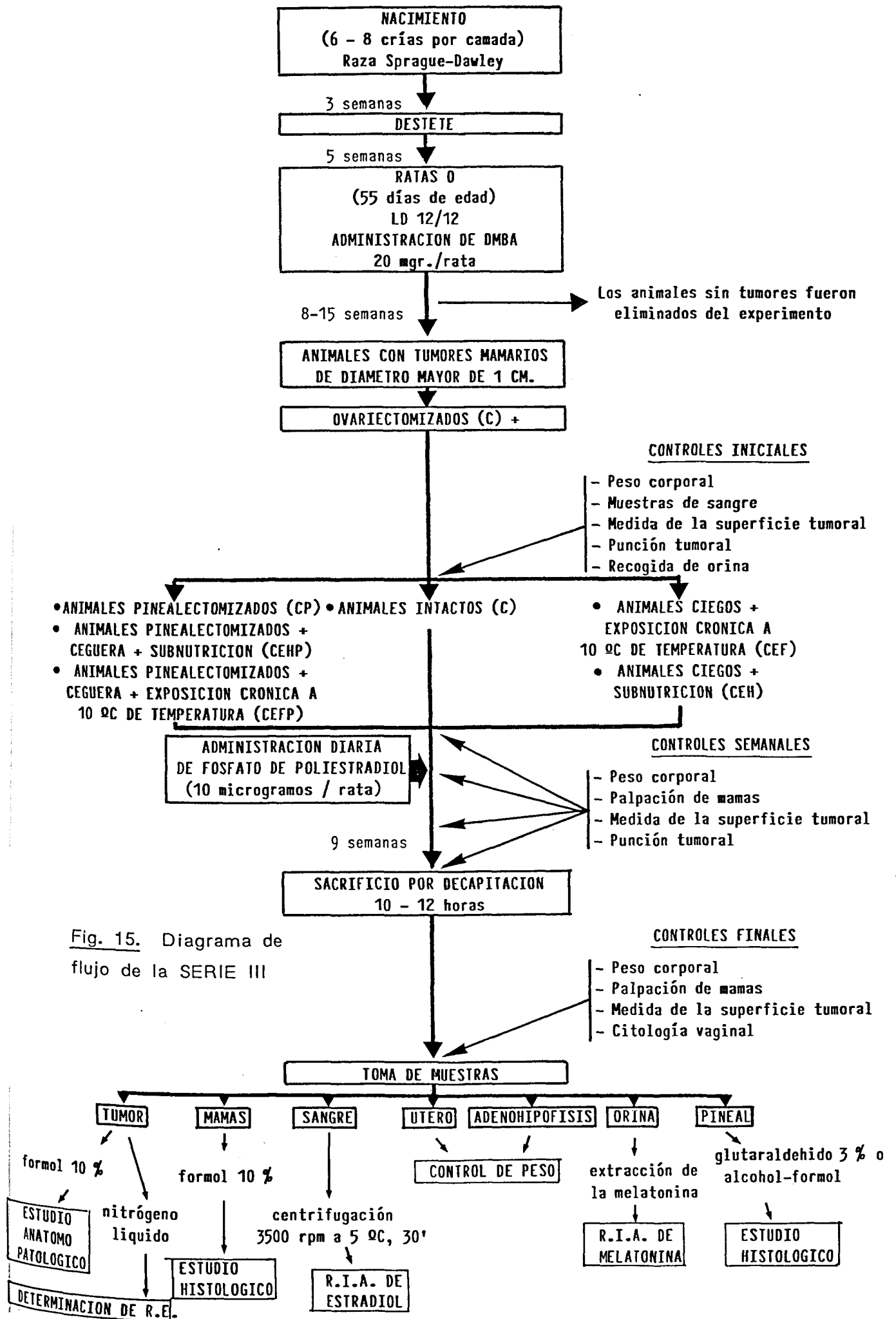


Fig. 15. Diagrama de flujo de la SERIE III

MATERIAL Y METODOS

MATERIAL Y METODOS

1 - ANIMALES DE EXPERIMENTACION

En las distintas series experimentales se han utilizado ratas hembra albinas (*rattus norvegicus*), de la cepa Sprague-Dawley, ya que como hemos visto anteriormente en la descripción del modelo tumoral utilizado, es la cepa más receptiva a la tumorigénesis con hidrocarburos aromáticos policíclicos (Boyland E., Sydnor K.L. 1962; Engelbart K., Gericke D. 1964 a). Los animales fueron controlados desde su nacimiento, fijando el número de crías por camada en 6 - 8 y el tiempo de lactación en 21 días, con el fin de homogeneizar al máximo su desarrollo.

Para los experimentos seleccionamos animales de 28 ± 1 día de vida, con un peso corporal comprendido entre 75 - 100 gramos. Una vez confeccionados los distintos grupos experimentales, verificamos su homogeneidad dentro de cada serie, mediante un test de análisis de la varianza. Desde el nacimiento hasta el momento de su utilización, los animales permanecieron estabulados a 22 ± 1 °C y con un fotoperíodo LD 12/12.

2 - CONDICIONES EXPERIMENTALES

2.1 - Comunes a todos los grupos

ESTABULACION - Los animales fueron dispuestos en

jaulas transparentes de policarbonato, de dimensiones 15x25x50 centímetros, en número de 3 - 4 por jaula. Las ratas sometidas a subnutrición fueron situadas una por jaula, con el fin de efectuar controles fiables de ingesta.

ILUMINACION Y FOTOPERIODO - Desde el nacimiento y a lo largo de todo el experimento, los animales permanecieron expuestos a luz procedente de tubos fluorescentes de 40 watios que, en número de dos por cada sala, proporcionaban una intensidad luminosa de 300 ± 50 lux a nivel de las jaulas. La situación de las jaulas se modificaba periódicamente, con el fin de igualar la cantidad de energía luminosa recibida por cada una. Los ritmos luz - oscuridad (LD) fueron controlados mediante relojes interruptores, fijándose en 12 horas de luz por 12 de oscuridad (LD 12/12), con período de iluminación desde las 7.00 a las 19.00 horas.

TEMPERATURA Y HUMEDAD - Salvo para determinados grupos que tuvieron condiciones especiales, la temperatura de los ratarios se fijó en 22 ± 1 °C, mediante una estufa eléctrica dotada de termostato.

La humedad relativa se mantuvo en un grado aceptable (60 %) mediante bandejas con agua para evaporación.

VENTILACION - La ventilación de las salas se realizó mediante extractores de aire con un flujo de 150 litros / minuto, lo que garantizaba la renovación de los 20 m^3 de aire que poseía cada sala aproximadamente, en dos horas. Los extractores de las distintas salas fueron conectados a un interruptor programable común, fijando así el ritmo de ventilación en seis ciclos de tres horas de funcionamiento por una de interrupción. Este ritmo de ventilación permaneció fijo desde el nacimiento

de las crías hasta el final del experimento, con el fin de eliminar, o al menos compensar, cualquier tipo de efecto dependiente del ruido emitido por los ventiladores, o de la densidad de olores soportados por los animales.

ALIMENTACION - La alimentación, salvo para los grupos en los que se especifica lo contrario, consistió en pienso "standard" para animales de laboratorio y agua "ad libitum". El pienso utilizado (UAR) tenía la siguiente fórmula :

cereales, azúcar	83,1 %
proteínas vegetales (turtó)	6,9 %
proteínas animales (pescado)	6 %
complemento vitamínico-mineral	4 %

Con una composición porcentual de :

humedad	12 %
prótidos	17 %
lípidos	3 %
glúcidos (E.L.N.)	58,7 %
celulosa (Weende)	4,3 %
minerales	5 %

Valor energético 2900 calorías / Kg..

2.2 - Específicas de determinados grupos

SUBNUTRICION - La ingesta normal para nuestros animales fué definida por la diferencia entre la cantidad de pienso aportado diariamente y el remanente a las 24 horas; calculando la ingesta/rata/día

y posteriormente el promedio de todo el grupo, comprobando que la ingesta de nuestras ratas se ajustaba con los valores "standard" ya establecidos para esta cepa, según su edad y peso corporal (Altman P.L., Dittmer D.S. 1974).

Los animales de los grupos de subnutrición (H), situados uno por jaula, recibieron diariamente el 70 % de la ingesta considerada normal.

EXPOSICION A BAJAS TEMPERATURAS - Los animales expuestos a estas temperaturas, permanecieron en una habitación termorregulable a una temperatura de 10 ± 1 °C; dicha sala estaba dotada de un equipo frigorífico con motor compresor tipo K-L 220/380 V de gas freón.

3 - TECNICAS QUIRURGICAS

3.1 - Anestesia

En las intervenciones quirúrgicas realizadas, los animales fueron anestesiados con 2-2-2 tribromoetanol ($C_2 H_3 Br_3 O$) (Merck lote 4208384), preparado en una solución acuosa de 2,5 gramos/100 mililitros, administrada vía intraperitoneal, en dosis de 25 mgr./100 gramos de peso corporal (Figura 16).

Las operaciones de muy corta duración, como la enucleación bilateral de los globos oculares, se realizaron bajo una ligera anestesia con éter (Figura 17).



Fig. 16. Anestesia intraperitoneal.

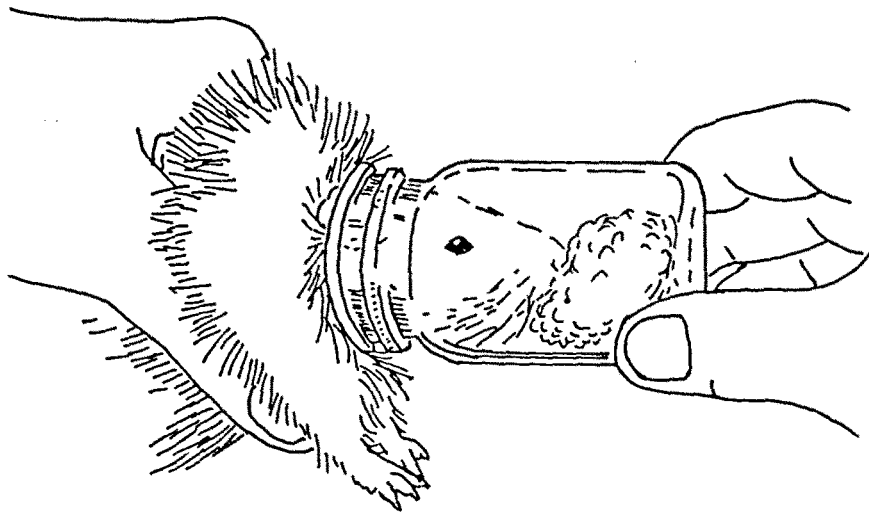


Fig. 17. Anestesia con éter.

3.2 - Ceguera

La ceguera se produjo por enucleación bilateral de los globos oculares, suturando posteriormente ambos párpados.

3.3 - Pinealectomía

La situación de la glándula pineal en los roedores, inmediatamente debajo de la confluencia de los senos venosos cerebrales longitudinal y transversos, la hace fácilmente accesible, por lo cual no hay grandes diferencias entre las distintas vías de acceso quirúrgico descritas. La mayoría de los autores realizan la pinealectomía según las técnicas de Hoffmann R.A., Reiter R.J. (1965 b) o de Kuszak J., Rodin M. (1977). Nosotros hemos utilizado la segunda de estas técnicas ya que, a nuestro juicio, nos aportaba en conjunto ventajas sustanciales con respecto a la otra técnica ya clásica, como son :

a) Todas las técnicas de pinealectomía descritas reconocen como incidente más llamativo la abundante sangría que se produce, sobre todo al "arrancar" la pineal y romper sus conexiones vasculares con los senos venosos, siendo esta hemorragia claramente inferior en la técnica de Kuszak y Rodin.

b) La visualización directa de la glándula garantiza el éxito de la ablación; por el contrario las otras técnicas, al realizar la extirpación sin observación directa de la glándula, tienen una pequeña incidencia de fracasos. Este hecho, aunque no muy grave, obliga a aumentar el número de animales, en prevención de posibles fallos.

c) Permite una perfecta sistematización de la operación ficticia en los animales control (sham).

La supresión del seno longitudinal, aunque a juicio de Kuszak y Rodin no presente ningún trastorno hemodinámico importante, quizás suponga, sin entrar en debate sobre ello, una mayor manipulación del cerebro en esta técnica con respecto a las otras.

3.3.1 - Técnica de J. Kuszak y M. Rodin

Para minimizar la posibilidad de infección y facilitar la cirugía se rasura la zona quirúrgica (Figura 18), fijando seguidamente la cabeza del animal anestesiado en un soporte de características semejantes al utilizado para cirugía estereotáxica (Figuras 19 y 20). Antes de realizar la incisión se practica un habón subcutáneo con 0,1 ml. de anestésico local (lidocaína al 2 %) (Figura 21). A continuación se realiza una incisión medial longitudinal en la piel, desde el punto bregma hasta unos 5 mm. dorsal al lambda (Figura 22), se separan los bordes y se expone la cubierta craneal desperiostizándola (Figuras 23 y 24). Tomando como centro el punto lambda, se realiza un trépano con la forma de un rectángulo de 7,5 x 12,5 mm. de lado (Figura 25). Tras retirar el fragmento óseo quedan expuestos los senos venosos (Figura 26), posteriormente se practica una doble ligadura en la parte más anterior del seno longitudinal, así como dos incisiones longitudinales en la duramadre, tangentes al citado seno venoso (Figura 27). Seguidamente se corta el seno longitudinal entre las dos ligaduras y rechazando hacia atrás el cabo central, puede visualizarse directamente la pineal y tomarse con unas pinzas (Figura 28). Después de extraer la glándula se vuelve a colocar el fragmento óseo en su lugar y se

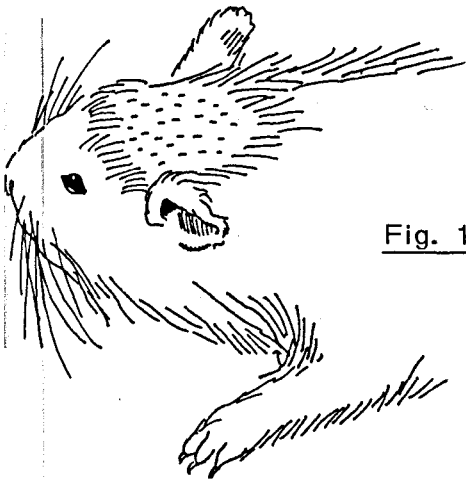


Fig. 18.

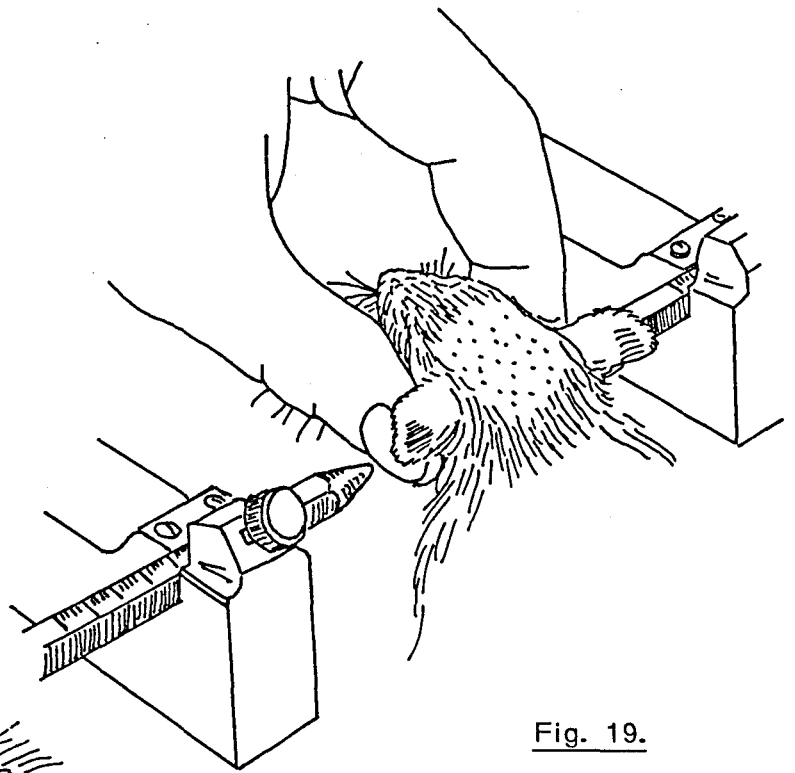


Fig. 19.

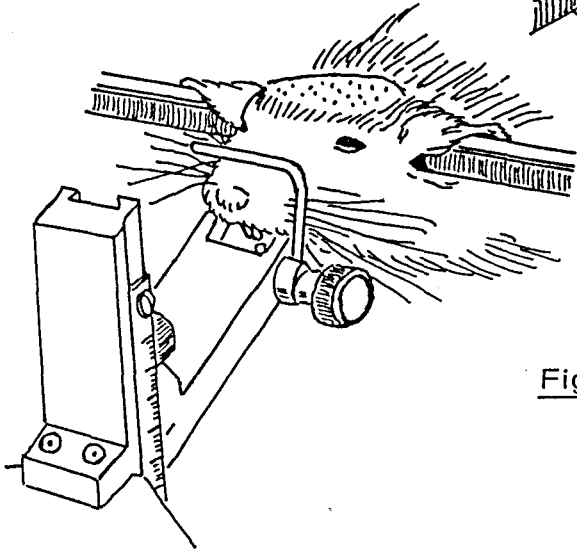


Fig. 20.

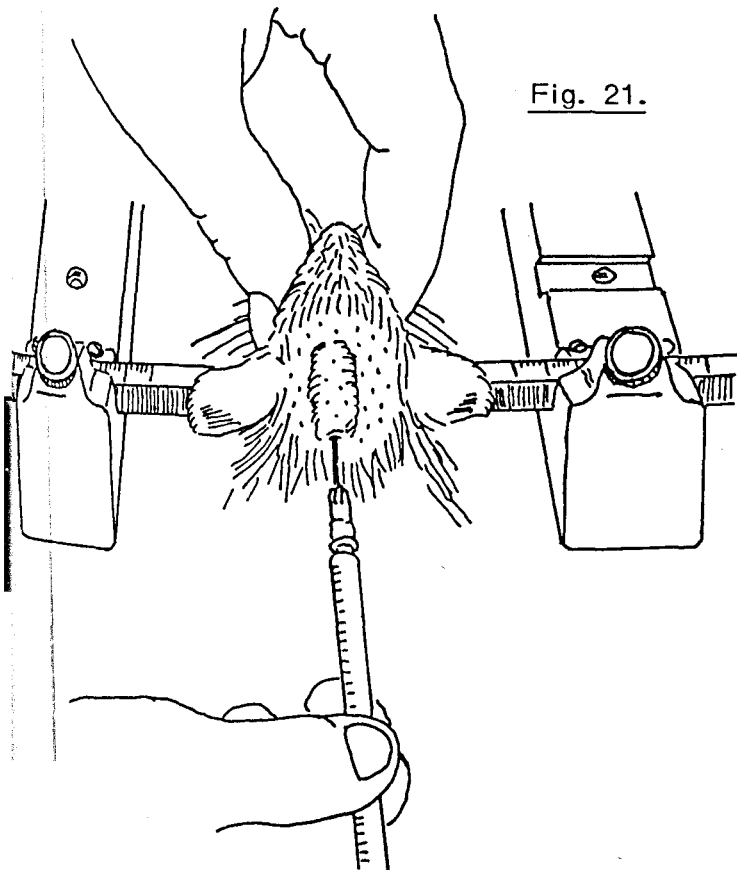


Fig. 21.

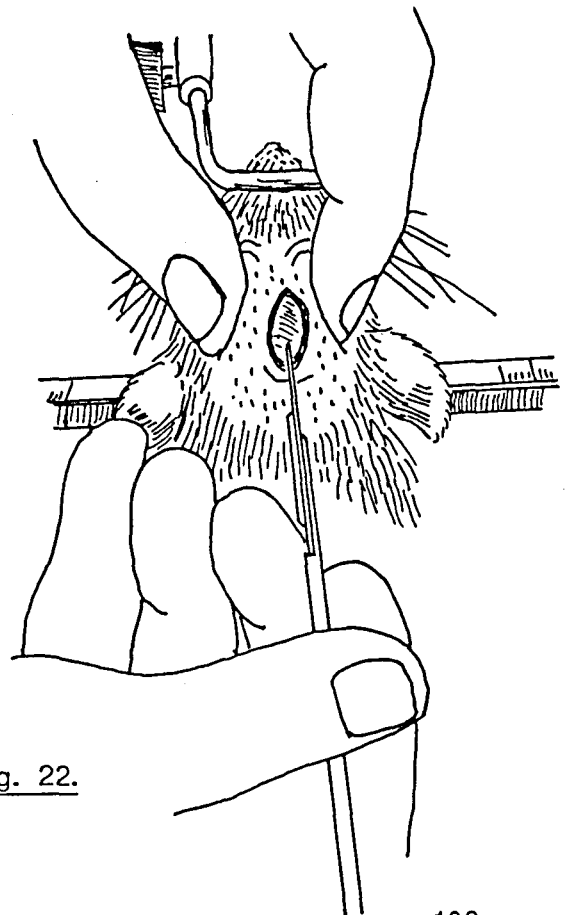


Fig. 22.

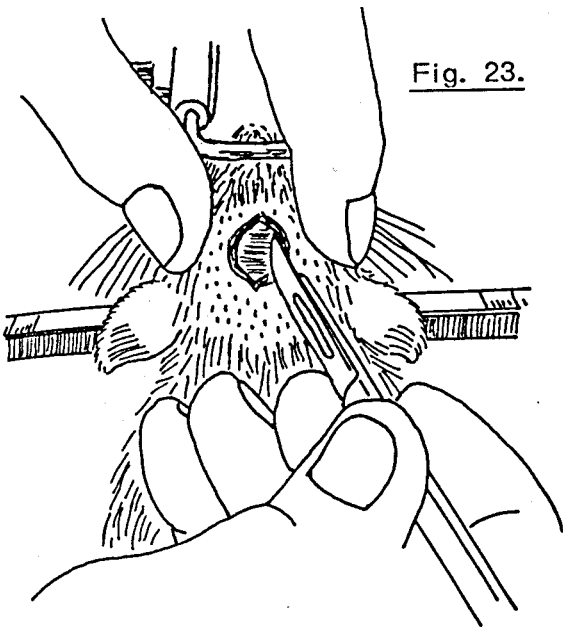


Fig. 23.

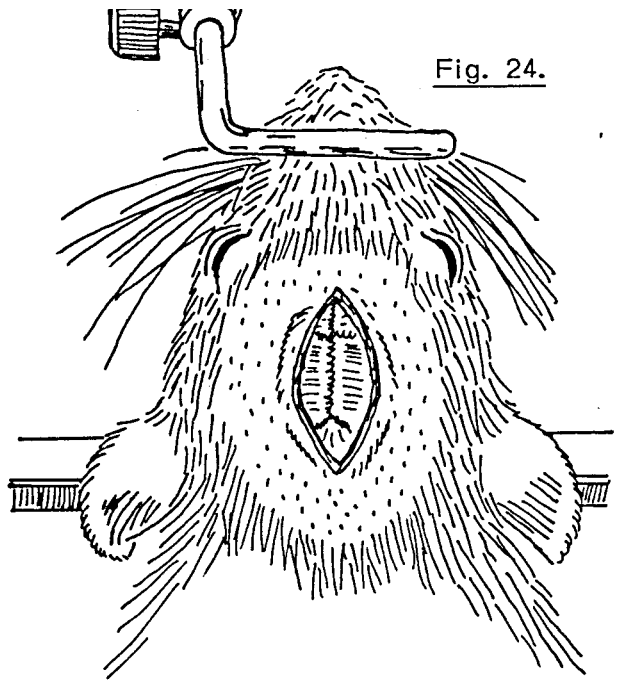


Fig. 24.

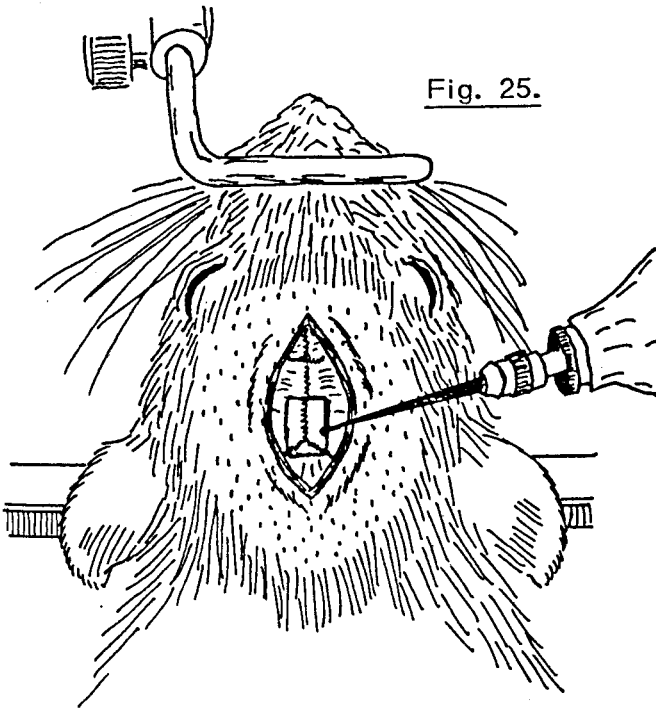


Fig. 25.

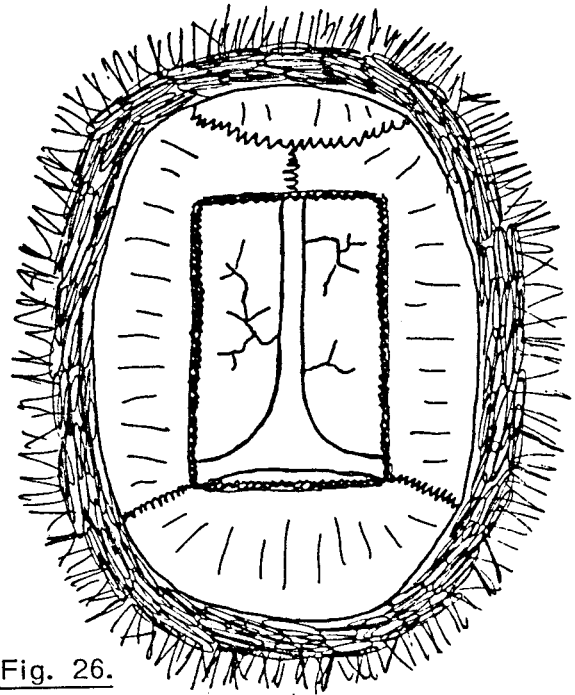


Fig. 26.

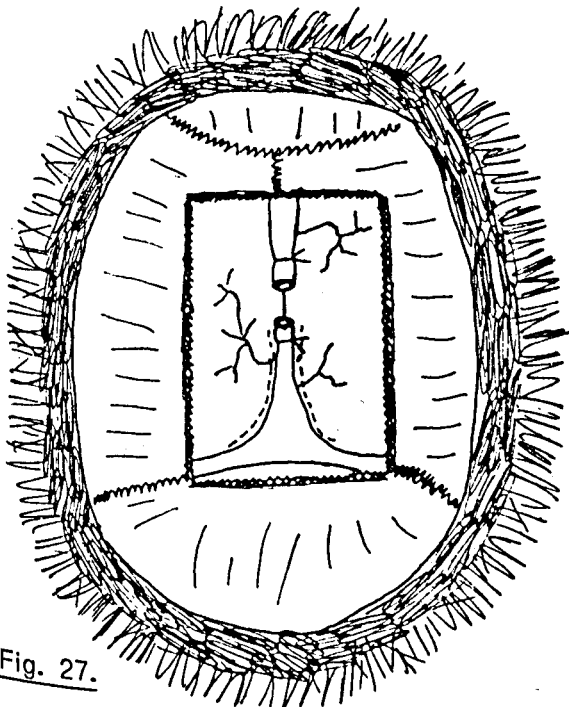


Fig. 27.

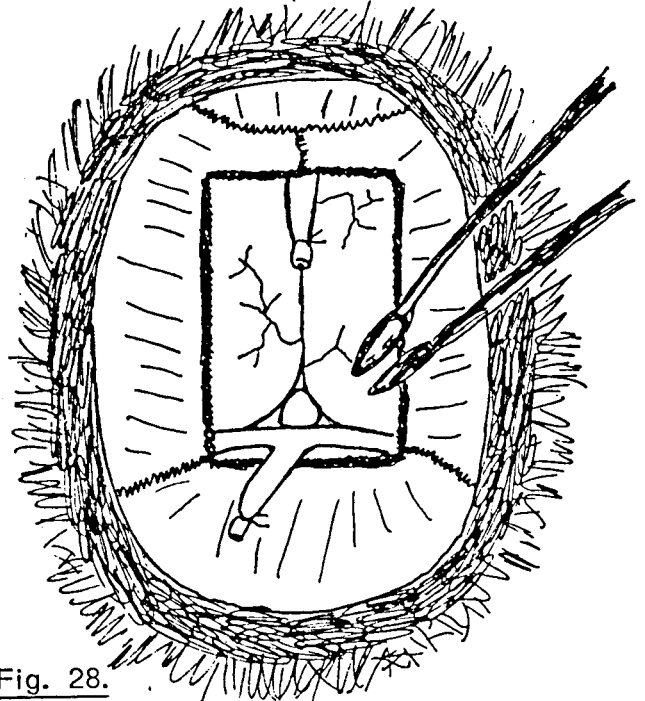


Fig. 28.

procede al cierre de la herida quirúrgica.

3.4 - Bulbectomía olfatoria

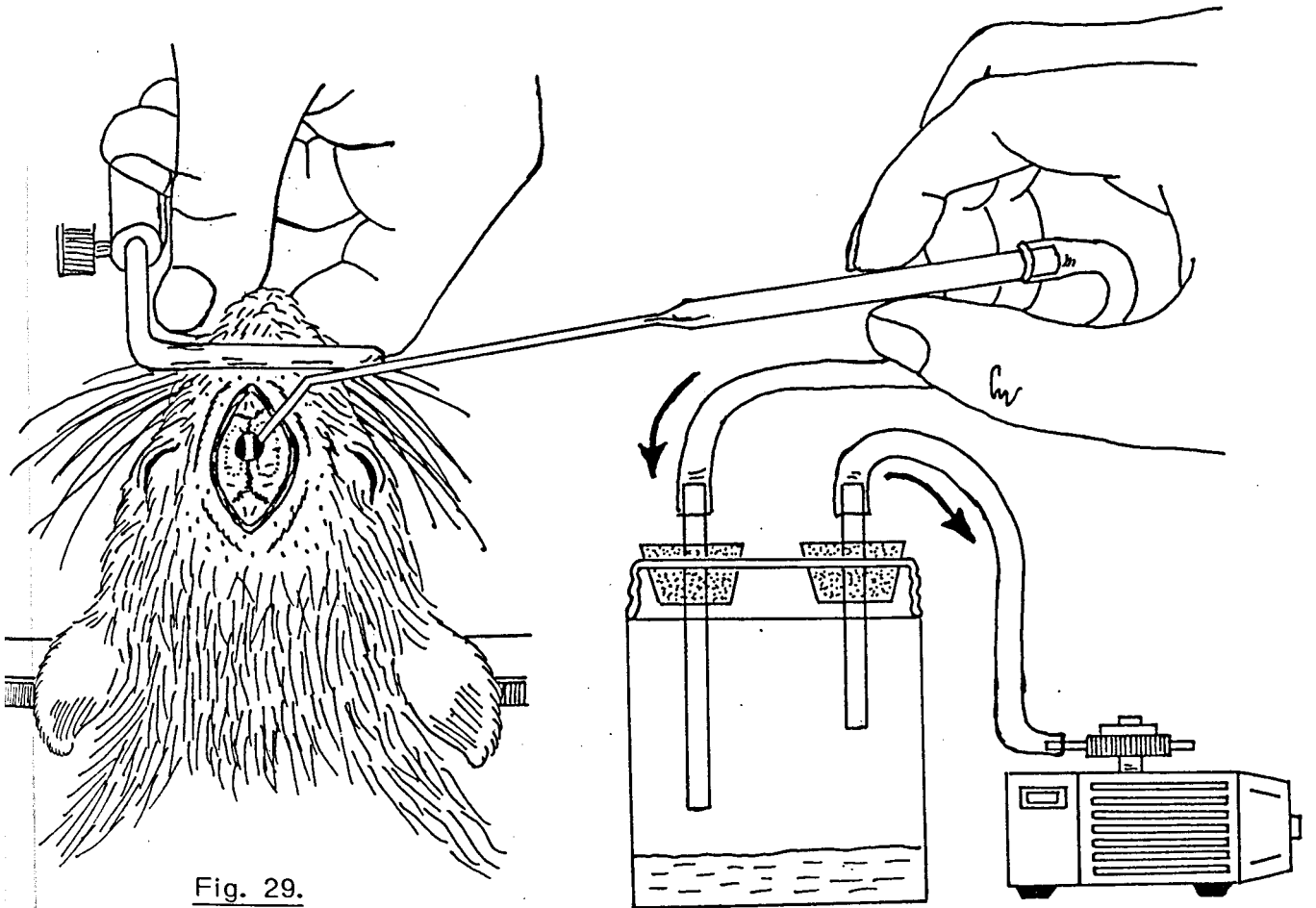


Fig. 29.

Tras anestesiar al animal, se rasura el área quirúrgico y se le fija la cabeza en un soporte semejante al utilizado para cirugía estereotáxica; seguidamente se practica una incisión longitudinal de unos 10 mm. sobre la zona frontal. A continuación desperiostizamos los huesos frontales y abrimos un orificio de trépano de unos 2 mm. de diámetro, en la zona media, sobre los relieves óseos marcados por los bulbos olfatorios. A través del orificio se introduce una pipeta de vidrio, conectada a un aspirador, succionando ambos bulbos olfatorios (Figura 29). Por último se

tapa con cera el orificio y se sutura la herida.

3.5 - Ovariectomía

Se realiza a través de una incisión de unos 2 cm. en la línea media del abdomen, separando los dos músculos rectos. Los ovarios se localizan fácilmente siguiendo los cuernos uterinos hasta las trompas, donde aparecen envueltos en un acúmulo de grasa. A continuación se pinza el extremo de la trompa uterina mediante unas pinzas hemostáticas finas y se corta el ovario y la grasa que lo envuelve. Es innecesario ligar el extremo cortado de la trompa uterina. La incisión se cierra en dos planos, el músculo y la piel.

3.6 - Pseudo-operaciones

Para valorar los efectos dependientes del "stress" quirúrgico y anestésico, así como las lesiones inespecíficas provocadas por el acto quirúrgico, realizamos el correspondiente grupo "sham" o pseudo-operados, repitiendo todas las maniobras, a excepción del paso final de extirpación del órgano.

3.7 - Cuidados postoperatorios

Durante los cinco días posteriores a la intervención quirúrgica se añadió antibiótico al agua de bebida (ampicilina 250 mgr./500 cc. de agua). Para una mayor homogeneidad en los grupos experimentales hicimos extensivo el tratamiento antibiótico a los animales pseudo-operados y a los controles intactos.

4 - PAUTA DE ADMINISTRACION DE ESTRADIOL

Utilizamos fosfato de poliestradiol (Estradurin), que representa por sus características farmacológicas la forma ideal de administración de esta clase de esteroides, en solución acuosa de 10 microgramos/ml., administrado diariamente por vía subcutánea (1 cc./rata).

5 - INDUCCION TUMORAL

Obviamente un cáncer mamario inducido es más deseable para la experimentación si cumple los siguientes criterios (Dao T.L. 1964) : técnica de inducción sencilla, corto período de inducción, incidencia tumoral 100 % y producción de tumores hormonodependientes. Como hemos visto en el apartado de carcinogénesis de la introducción, existen diversas formas de inducir cáncer mamario, siendo de todas ellas la carcinogénesis química la más utilizada, y dentro de ella los hidrocarburos aromáticos policíclicos, por tratarse de los agentes carcinogénicos conocidos más potentes. De entre ellos hemos elegido para nuestro dispositivo experimental el 9,10-dimetil-1,2 benzantraceno (7,12-dimetil-benzantraceno) (DMBA) por cumplir los requisitos anteriormente expuestos y debido a que la mayor parte de los trabajos que relacionan glándula pineal-cáncer mamario están realizados sobre modelos de adenocarcinomas mamaros inducidos por DMBA (Figura 30).

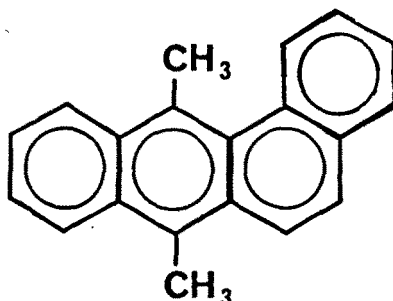


Fig. 30.

Administramos DMBA (Sigma lote 93F-0353) en solución preparada en el momento de su utilización. El tratamiento consistió en una dosis única de 20 mgr. de DMBA/rata disuelto en 1 ml. de aceite de girasol, administrado a través de una sonda intragástrica, en ratas de 55 días de edad. Esta es la pauta considerada actualmente como más efectiva y su justificación ha sido explicada detalladamente en la descripción del modelo tumoral en el apartado de carcinogénesis de la introducción (Huggins C. y cols. 1959; Huggins C. y cols. 1961 a, 1961 b; Huggins C., Yang N.C. 1962; Dao T.L. 1964; Daniel P.M., Prichard M.M.L. 1964, 1967; Dao T.L. 1969).

6 - VALORACION TUMORAL

6.1 - Medida de la superficie tumoral

La superficie tumoral fué calculada semanalmente, según la pauta descrita por Rose D.P. y Noonan J.L. (1982). Midiendo con un calibre nonius el diámetro máximo (L) y el diámetro mayor perpendicular al anterior (W), la superficie tumoral fué calculada según la fórmula :
$$S = (L/2) \cdot (W/2) \cdot \pi$$
, expresandola en cm^2 .

6.2 - Controles de citología por punción tumoral

Semanalmente se realizaron punciones de todos los tumores según el método clásico de punción - aspiración con aguja fina, siguiendo la técnica descrita por Martin H.E., Ellis E.B. (1934). A continuación se realizó una tinción tipo giemsa (Panoptico Rápido QCA) de todas las muestras. Con microscopía óptica se valoraron cuatro parámetros :

* Fondo, distinguiéndose dos tipos : tipo A con predominio de hematíes, mastocitos, células espumosas y esferas de secreción y tipo B con predominio de necrosis y hemorragia.

* Grupos celulares, de menor a mayor malignidad : cohesivos, laxos y células sueltas.

* Citoplasma : redondo, alargado o vacuolado.

* Núcleo, diferenciando : N₁ atipia leve, N₂ atipia moderada, N₃ atipia grave, N₄ adenocarcinoma.

6.3 - Biopsias tumorales

Antes de realizar el estudio histológico de los tumores, éstos fueron identificados, valorando su localización, encapsulación, color, diámetros tumorales, presencia de hemorragia y necrosis. Separamos un fragmento de cada tumor, antes de su fijación, para destinarlo a la medida de receptores estrogénicos, según la pauta que describiremos más adelante.

Para el estudio histológico las muestras fueron fijadas en formol al 10 %, siguiendo la pauta descrita más adelante. La tinción de los cortes se realizó con hematoxilina-eosina (Luna L.G. 1968). Al microscopio se valoraron los siguientes datos : características del tumor, tejido mamario circundante, presencia de hiperplasia ductal o nódulos alveolares hiperplásicos, signos de regresión y adenopatias, siguiendo los criterios establecidos para el diagnóstico de estas lesiones (Young S. y cols. 1963; Dao T.L. 1964; Daniel P.M., Prichard M.M.L. 1964; Middleton P.J. 1965; Daniel P.M., Prichard M.M.L. 1967; Beuving L.J. y cols. 1967; Sinha D., Dao T.L. 1974, 1975; Haslam S.Z., Bern H.A. 1977; Either S.P., Ullrich R.L. 1982).

7 - DURACION DEL EXPERIMENTO

La duración de las series experimentales fué diferente, según estudiáramos los efectos en la inducción o en el desarrollo de tumores previamente inducidos. Así, la Serie I, en la que los animales, una vez sometidos a diferentes tratamientos quirúrgicos o no quirúrgicos, recibían el DMBA, valorando seguidamente los efectos de los diversos tratamientos en la inducción del tumor, tuvo una duración de 28 semanas; mientras que las Series II y III, en las que los animales con tumores mayores de 1 cm. de diámetro eran sometidos a los tratamientos descritos, estudiando su efecto en la evolución y desarrollo del tumor, tuvieron una duración de 9 semanas.

8 - RECOGIDA DE DATOS

8.1 - Datos previos a la inducción tumoral en la Serie I

En esta serie los animales fueron sometidos a las distintos maniobras experimentales a los 28 días de edad, para recibir el tratamiento con DMBA 27 días después (55 días de edad). Con el fin de definir algunos parámetros del estado de los animales, previo a la inducción tumoral, en estos animales se realizó :

- Medida del peso corporal (Figura 31).
- Recogida de muestras de sangre obtenidas por punción de la vena yugular externa, bajo una ligera anestesia con éter, según una modificación de la técnica descrita por Aydin G., Zincke H. (1982) (Figura 32). Las muestras, tras coagulación, se centrifugaron a 3500 rpm.

durante 30 minutos a 5 °C; el suero se conservó en tubos kartel a -20 °C para análisis posteriores.

8.2 - Datos previos a los distintos tratamientos en las Series II y III

En ambas series, una vez que, tras la administración del DMBA a los 55 días de edad, habían aparecido tumoraciones de diámetro mayor de 1 cm., sacrificamos por decapitación 10 animales, para tener un control del estado previo a la aplicación de los distintos tratamientos quirúrgicos y no quirúrgicos. Se realizó :

- Medida del peso corporal (Figura 31).
- Recogida de muestras de sangre que fueron sometidas a la pauta descrita anteriormente.
- Disección de la pineal, fijada en alcohol-formol o glutaraldehido al 3 % para un posterior análisis histológico.
- Recogida de ovarios, que fueron fijados en formol al 10 %, seguido de disección, pesado y análisis histológico.
- Medida de la superficie tumoral y posteriormente biopsia de los tumores, en los que estudiamos :
 - * diagnóstico anatomopatológico
 - * presencia o no de receptores estrogénicos
- Recogida de orina. Antes del sacrificio se introdujo a las ratas en jaulas metabólicas individuales, recogiendo muestras de orina diurna y nocturna por separado. Las muestras recogidas fueron guardadas a -20 °C para posteriormente realizar la extracción y determinación de melatonina.

8.3 - Recogida de datos durante el experimento

En el transcurso del experimento se realizaron :

- Controles semanales de peso corporal (Figura 31).
- Controles diarios de ingesta en los animales de los grupos controles y subnutridos (ver apartado 2.2 de material y métodos).
- Palpación semanal de las mamas en todos los animales, para determinar el momento de aparición de las tumoraciones (latencia tumoral).
- Control semanal de la evolución de la superficie tumoral.
- Biopsia tumoral semanal siguiendo el método descrito anteriormente. Estas muestras fueron destinadas a estudios de citología.
- Control semanal de la temperatura rectal en los animales expuestos a bajas temperaturas.

Para todos estos controles se procedió previamente a anestesiarse a los animales con éter, para facilitar su manejo.

8.4 - Recogida de datos finales

Los animales fueron sacrificados por decapitación, tras anestesia ligera con éter, entre las 10 y las 12 horas. En todos los animales se realizó :

- Recogida de la sangre (4 - 5 ml.) que sufrió un proceso idéntico al anteriormente descrito.
- Antes del sacrificio se introdujeron los animales, durante

24 horas, en jaulas metabólicas, recogiendo fraccionadamente la orina correspondiente al día y a la noche.

- Medida del peso corporal final (Figura 31).

- Durante los últimos días se controló la citología vaginal, tomando diariamente frotis de cada rata. Sujetando la rata lavamos varias veces la vagina, con un cuentagotas con 3 - 4 gotas de agua, transfiriendo una gota de fluido vaginal a un portaobjetos para examinar las células mediante microscopio (Figura 33).

- Recogida de la adenohipófisis que, una vez pesada en fresco, se conservó en tubos kartel, en 50 microlitros de solución salina al 9 ‰ a -20 °C.

- Recogida de la pineal, que se fijó en alcohol-formol o glutaraldehído al 3 % para estudios posteriores.

- Recogida de ovarios, fijándolos en formol al 10 %. A los 6 días se procedió a su disección, separándolos de toda la grasa circundante. Una vez realizada esta tarea se efectuó el control de peso de los ovarios, estableciendo así mismo los pesos relativos de cada órgano (peso del órgano/100 gr. de peso corporal). Seguidamente se realizó el estudio histológico según las técnicas descritas más adelante.

- En la serie III, al tratarse de animales castrados, recogimos los úteros, como control de la actividad pineal; los úteros fueron pesados en fresco y deshidratados tras permanecer 24 horas en una estufa a 80 °C.

- Recogida de mamas que fueron fijadas con formol al 10 % para un posterior estudio histológico.

- Recogida de los tumores introduciéndolos en recipientes con formol al 10 % para un estudio anatomopatológico posterior. Además de ésto se controló su superficie, número y localización, así como

Fig. 31.

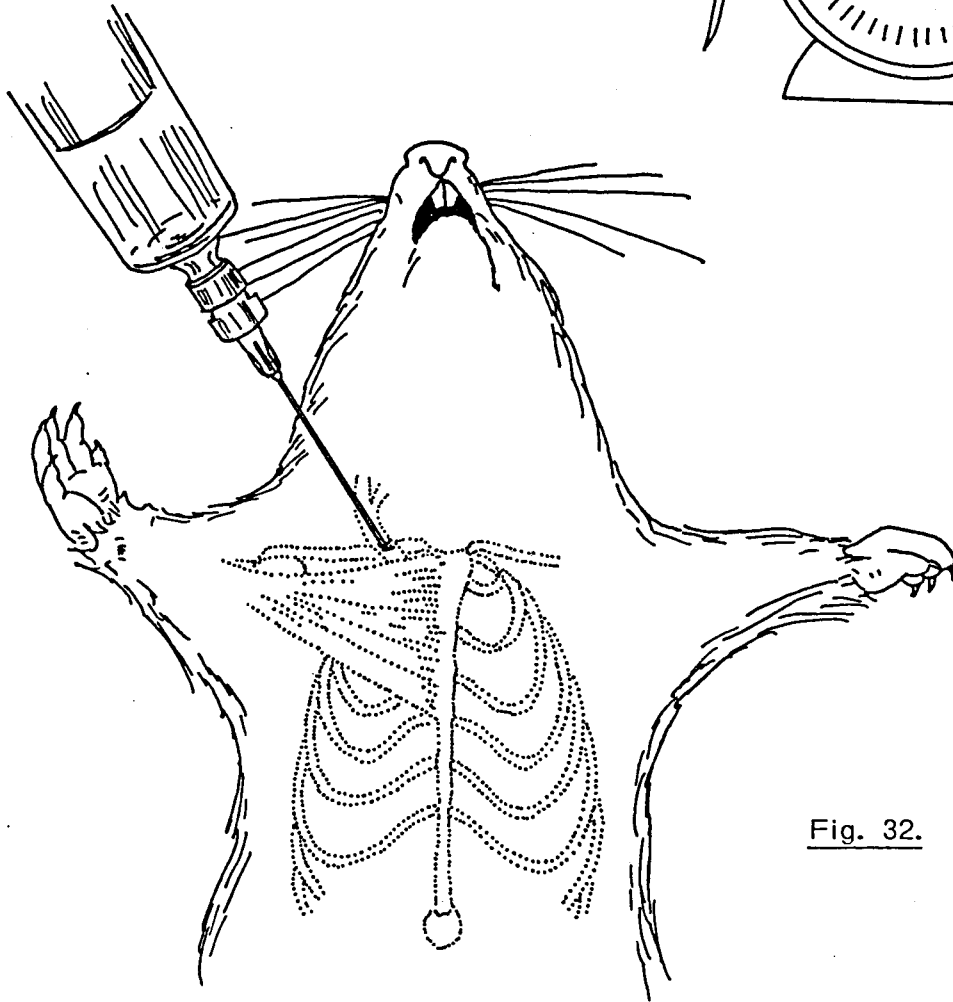
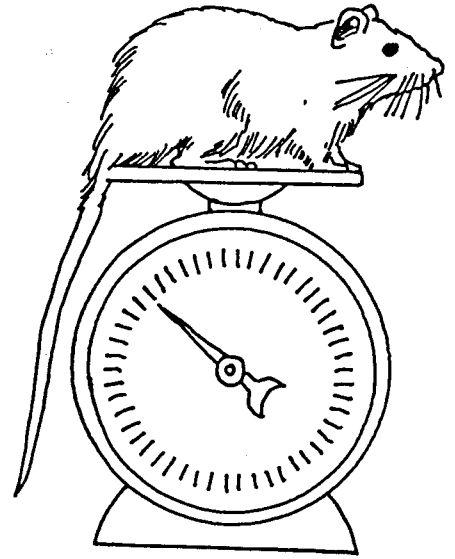


Fig. 32.



Fig. 33.

un fragmento de tumor fué introducido en nitrógeno líquido y conservado a -70 °C para estudiar la presencia o no de receptores estrogénicos.

9 - TECNICAS HISTOLOGICAS

9.1 - Microscopía óptica

PROCESOS COMUNES

- Deshidratación : Los pases realizados fueron

- * Agua destilada, 24 horas
- * Alcohol 80º, dos pases de 24 horas cada uno
- * Alcohol 96º, 24 horas
- * Alcohol 100º, dos pases de dos horas cada uno
- * Benzoato de metilo, dos pases de dos horas cada uno
- * Benzol, 5 minutos

- Inclusión en parafina :

- * Parafina blanda, dos pases de 4 horas cada uno en una estufa a 57 °C
- * Parafina dura, 6 horas en estufa a 57 °C
- * Inclusión en moldes de parafina

- Cortes de las piezas : Utilizamos un microtomo vertical, realizando cortes de 6 micras de espesor, manteniéndolos en una estufa a 37 °C durante 24 horas para el secado de los mismos.

PROCESOS ESPECIFICOS

- Tinción HEMATOXILINA-EOSINA : Esta técnica

se empleó para el estudio histológico de los ovarios y de las mamas, así como para el estudio anatomopatológico de los tumores mamarios. Se llevó a cabo en los siguientes pasos :

I- Fijación con formaldehído al 10 %, permaneciendo 48 horas en inmersión. Transcurridas las primeras 24 horas los ovarios se cortan en dos transversalmente, con el fin de homogeneizar el grado de fijación de las partes corticales y profundas.

II- Deshidratación, ya descrita.

III- Inclusión en parafina.

IV- Corte de la pieza.

V- Desparafinización. Realizamos inmersión en :

* xileno, de 15 a 30 minutos

* alcohol 100º, 5 minutos

* alcohol 96º, 5 minutos

* alcohol 70º, 5 minutos

* agua destilada

VI- Tinción con hematoxilina-eosina

* hematoxilina, 20 minutos

* paso por agua destilada

* paso rápido por alcohol 96º con ácido clorhídrico

* lavado en agua corriente hasta que los colores adquieran un azul fuerte

* eosina, 3 minutos

* lavado en agua corriente 3 - 4 minutos

* alcohol 96º, dos pases de 5 minutos

cada uno

* alcohol absoluto, 5 minutos

* xileno, de 15 a 30 minutos

- Tinción VIOLETA DE CRESILO : Esta técnica fué utilizada para el estudio histológico de las pineales, realizandose los siguientes pasos :

I- Fijación con alcohol-formol (60 % de alcohol de 96º y 40 % de formol al 15 %) permaneciendo 3 - 4 días en dicha solución.

II- Deshidratación, ya descrita.

III- Inclusión en parafina.

IV- Corte de la pieza.

V- Desparafinización en

* xilol, 30 minutos

* alcohol 100º, 5 minutos

* alcohol 96º, 5 minutos

* alcohol 70º, 5 minutos

* agua destilada

VI- Tinción con violeta de cresilo

* violeta de cresilo, 20 minutos

* lavado en agua destilada, dos pasos rápidos

* paso por alcohol de 96º para diferenciar

* alcohol 100º, 1 minuto

* toluol, 5 minutos

* montaje con balsamo del canada

9.2 - Microscopía electrónica

La pauta seguida fué :

I- Fijación con glutaraldehido al 3 %.

II- Postfijación :

* glutaraldehido al 3 %, 2 horas a
4 - 6 °C

* tampon lavador, 3 horas a 4 -
6 °C

* ácido ósmico, 1 hora a 4 - 6 °C

III- Deshidratación :

* agua destilada, paso rápido

* acetona al 30 %, 15 minutos

* acetona al 50 %, 30 minutos

* acetona al 70 %, 30 minutos

* acetona al 70 % más acetato de
uranilo a saturación, 12 horas a
4 - 6 °C

* acetona al 90 %, dos pasos de 15
minutos

* acetona al 100° más sulfato de
cobre a saturación, 45 minutos

IV- Inclusión en araldita :

* óxido de propileno, 15 minutos

* óxido de propileno, 30 minutos

* óxido de propileno más araldita I
en proporción 3 / 1, 30 minutos

* óxido de propileno más araldita I

en proporción 2 / 2, 2 horas

* óxido de propileno más araldita I

en proporción 1 / 3, 2 horas

* araldita I, 12 horas a 40 °C

* araldita II, 75 minutos a 40 °C

* llenado de cápsulas

V- Corte de las piezas. Se realizaron cortes semifinos de 0,7 - 1 micra de espesor y cortes ultrafinos de 500 - 700 Å. Con esta técnica se realizó un estudio morfológico de las glándulas pineales.

10 - TECNICAS ANALITICAS

10.1 - Radioinmunoanálisis de estradiol

Las medidas se realizaron en el suero obtenido a partir de muestras de sangre, centrifugado a 3500 r.p.m. durante 30 minutos a 4 °C y conservado a -20 °C hasta su utilización. Utilizamos el RSL Estradiol-17 beta kit, de Radioassay Systems Laboratories Inc., que aporta la enorme ventaja de no requerir extracción previa de la hormona, con una fiabilidad semejante a la de los métodos convencionales.

Este kit utiliza un antisuero, obtenido de conejo, con alta especificidad para el estradiol-17 beta y escasas reacciones cruzadas : 1,15 % a estriol, 0,68 % a estradiol-17 alfa, 15 % a estrona y < 0,01 % a testosterona, dihidrotestosterona, colesterol, pregnenolona, sulfato de pregnenolona, 17-hidroxipregnenolona, progesterona, 17 alfa-hidroxiprogesterona, 20 alfa-dihidroprogesterona, desoxycortisol, 11-desoxycortisol, cortisol, corticosterona, aldosterona, androstenediona,

dihidroepiandrosterona, androsterona y eticolanona.

Como trazador utiliza el I^{125} y como precipitante antisuero de gammaglobulina de conejo.

La realización del radioinmunoanálisis la llevamos a cabo según las pautas indicadas en el kit.

10.2 - Radioinmunoanálisis de FSH y LH

Las determinaciones de FSH y LH fueron realizadas en muestras de suero y de adenohipófisis.

HOMOGENEIZACION DE LAS ADENOHIPOFISIS

El protocolo realizado fué el siguiente :

- Sonicación (sonicador Labsonic 1510) durante 5 segundos, en 500 microlitros de buffer fosfato 0,1 M (pH = 6,8). El homogeneizado resultante se deposita en tubos de vidrio cerrados con parafilm. Todas las maniobras se realizaron a 0 °C, manteniendo en todo momento las muestras en bandejas con hielo.

- Centrifugado durante 30 minutos a 3500 r.p.m. y 5 °C.

- Separación del sobrenadante, que se distribuye en alícuotas de 200 microlitros, conservadas a -20 °C hasta la realización del radioinmunoanálisis y de las determinaciones de proteínas.

DETERMINACION DE PROTEINAS EN LOS
HOMOGENEIZADOS

En los extractos de adenohipófisis medimos el contenido proteico, con el fin de expresar la FSH y LH determinadas en los radioinmunoanálisis como pico o nanogramos de hormona / microgramo de proteínas totales. La valoración la llevamos a cabo por el método del Azul Brillante.

Reactivo empleado : 100 mg. de Coomasie Brilliant Blue G-250 disuelto en 47,5 ml. de etanol absoluto más 100 ml. de ácido fosfórico 85 % y completado con agua hasta 1 litro.

Pauta seguida :

- tubos "blanco", contienen los mismos reactivos que los problemas, pero sustituyendo los 50 microlitros de homogeneizado por una cantidad igual de buffer.

- tubos para la curva de calibración, se preparan con la misma cantidad de reactivo, sustituyendo la muestra problema por 50 microlitros de cada una de las diluciones de la curva "standard" realizadas previamente con distintas cantidades de albúmina sérica bovina y solución salina.

- tubos problema, que contienen 25 microlitros del homogeneizado, 75 microlitros de solución salina y 1 mililitro del reactivo empleado.

La lectura de los tubos se realizó entre 5 y 30 minutos después de la adición del reactivo a 595 nm de longitud de onda.

REALIZACION DEL RADIOINMUNOANALISIS

- Antisuero . Los antisueros específicos frente a FSH y LH de rata (NIAMD anti-rat FSH y NIAMD anti-rat LH) fueron proporcionados por el "Rat Pituitary Distribution Program" del NIAMD (National Institute of Arthritis and Metabolic Diseases, National Institutes of Health, Bethesda). Estos anticuerpos proceden de conejos y se suministran de forma liofilizada.

- Marcaje de las hormonas . En ambos ensayos empleamos como trazador el I^{125} que se une a los restos tirosínicos de las hormonas. La técnica de marcaje empleada fué la de Hunter W.M. y Greenwood F.C. (1962), de la cloramina T. Consiste en la oxidación del yoduro radiactivo con la cloramina T y el metabisulfito, que actúa como reductor. Una vez realizado el marcaje, el antígeno marcado se separa del resto de los productos de la reacción, por cromatografía en gel de Sephadex 75.

- Separación de la hormona marcada libre del complejo $H^*Ac_H H$. Utilizamos el método del doble anticuerpo empleando como segundo anticuerpo Antirabbit Gamma Globulin (Antibodies Incorporation, Davis, California).

- Curvas "standard" . Para realizar las curvas "standard" utilizamos concentraciones conocidas de LH (NIAMD-rat-LH-RP-1) y de FSH (NIAMD-rat-FSH-R-1). Con ello se preparan soluciones madre de

1 mg. / ml., a partir de los cuales se obtienen, por diluciones sucesivas en albúmina sérica bovina al 1 % en buffer fosfato, una serie de puntos, por triplicado, según la gama de concentraciones que esperamos encontrar en las muestras. Utilizamos como en cualquier otro radioinmunoanálisis dos curvas "standard", una al comienzo y otra al final del ensayo, así como otros puntos de referencia como son los controles de precipitación inespecífica, los "blancos" o controles de radiactividad total y los "ceros" o controles de máxima unión antígeno - anticuerpo.

El protocolo seguido fué el siguiente :

- * Pipetear 100 microlitros de cada muestra problema y de los "standard" y 200 microlitros del buffer del radioinmunoanálisis en todos los tubos, salvo en los "blanco" y los "cero", que llevan 300 microlitros.

- * Añadir 100 microlitros del anticuerpo en todos los tubos, excepto en los "blanco" y en los controles de precipitación inespecífica.

- * Pipetear la hormona marcada 100 microlitros/tubo, aproximadamente 10000 CPM.

- * Agitar e incubar 3 días a 4 °C.

- * Añadir el segundo anticuerpo 100 microlitros/tubo y agitar.

- * Incubar 24 horas a 4 °C.

- * Centrifugar a 3000 r.p.m., durante 60 minutos a 4 °C.

- * Recogida del sobrenadante.

- * Lectura en contador gamma durante 2 minutos por muestra.

10.3 - Radioinmunoanálisis de melatonina en orina

OBTENCION DE LAS MUESTRAS

La orina de 24 horas se recogió manteniendo a las ratas individualizadas en jaulas metabólicas durante este período de tiempo. La diuresis total fué colectada en dos fracciones, la correspondiente al período de iluminación (7.00 a 19.00 horas) y la orina correspondiente al período de oscuridad (19.00 - 7.00 horas del día siguiente). Los colectores de orina de las jaulas metabólicas permanecieron sumergidos en hielo durante toda la fase de recogida. La orina colectada en cada fracción del fotoperíodo fué medida y guardada a -20 °C hasta el momento de realizar el radioinmunoanálisis.

EXTRACCION DE LA MELATONINA DE LA ORINA

Las muestras de orina (1 a 4 ml. según diuresis) fueron depositadas en tubos de ensayo con 7 ml. de diclorometano puris (CH_2Cl_2) (Merck lote 46 K 3702849) y agitadas por rotación durante 30 minutos. Tras centrifugado durante 15 minutos, a 4 - 5 °C y 3000 r.p.m., eliminamos la fase acuosa por aspiración y añadimos a cada tubo 1 ml. de Na OH 1M con el fin de eliminar la 6-OH-melatonina que presenta reacciones cruzadas con el antisuero de melatonina. Repetimos la agitación y centrifugación como en la fase anterior y tras aspirar de nuevo la fase acuosa evaporamos el diclorometano, situando los tubos en un baño a 37 °C en una campana de extracción de gases. Las muestras son posteriormente resuspendidas en 200 microlitros del buffer del radioinmunoanálisis. Recuperación aproximadamente del 50 %.

REALIZACION DEL RADIOINMUNOANALISIS

- Antisuero . Utilizamos el antisuero de melatonina obtenido en ovejas por el grupo de la Dra. J. Arendt en la Universidad de Surrey comercializado por Guildhay Antisera (lote 704/6483). Presenta las siguientes reacciones cruzadas : 0,91 % a N-acetiltriptamina, 0,33 % a 6-hidroximelatonina, 0,22 % a N-acetiltriptofano, < 0,06 a N-acetilserotonina, 6-sulfato de hidroximelatonina, triptofol, 5-metoxitriptofol, 5-hidroxitriptamina, 5-hidroxi-indol-acético, 5-metoxitriptamina, triptófano y triptamina. Lo utilizamos a una dilución inicial de 1 / 2000.

- Trazador . Melatonina tritiada de baja actividad específica (45,1 mCi/mmol) suministrado por New England Nuclear (lote 2261-023).

- Separación de la hormona marcada libre . Se realiza por métodos de adsorción mediante solución de charcoal dextrano (10 gr. de charcoal activado + 0,1 gr. de dextrano 70 + 500 ml. de buffer del ensayo).

- Buffer del ensayo . Utilizamos buffer tricina 0,1 M / litro más 9 gr. de cloruro sódico y 1 gr. de gelatina (pH = 5,3).

- Liquido de centelleo . Utilizamos Kontrogel.

- Curvas "standard" . Partiendo de una solución madre de melatonina (Sigma, lote 123F-0037) en alcohol absoluto

(1 mg. / ml.) preparamos diluciones en buffer de ensayo hasta alcanzar las concentraciones de 0, 2,5, 5, 12,5, 25, 50, 100 y 250 pgr. / 0,5 ml.. Además de las soluciones "standard" utilizamos otros puntos de referencia, como son : "ceros", controles de precipitación inespecífica, "blancos".

- Protocolo :

* Pipetear 500 microlitros de cada muestra y de los "standard".

* Añadir 200 microlitros del anticuerpo en todos los tubos, excepto en los "blancos" y en los controles de precipitación inespecífica, vortear e incubar a temperatura ambiente 30 minutos.

* Añadir 100 microlitros de melatonina tritiada, vortear e incubar a 4 °C 18 horas.

* Separar el anticuerpo unido a la melatonina de la fracción libre por incubación durante 15 minutos a 4 °C con 500 microlitros de charcoal dextrano, vortear antes de incubar.

* Centrifugar 15 minutos a 1500 r.p.m. a 4 °C.

* Pipetear 700 microlitros del sobrenadante en viales con 4 ml. de líquido de centelleo.

* Lectura en contador beta de centelleo.

10.4 - Enzima Inmunoensayo para la determinación de receptores estrogénicos

OBTENCION DE LAS MUESTRAS

Tras la decapitación una parte del tumor recién extirpado

se destinaba a la determinación de receptores; para ello, una vez retirada la grasa y el tejido necrótico de la muestra, se congelaba lo más rápidamente posible por inmersión en nitrógeno líquido, manteniendo posteriormente la muestra en un congelador a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

PULVERIZACION DE LAS MUESTRAS

Previo a su homogenización pulverizamos el tejido con un pulverizador, previamente enfriado, y lo depositamos en un tubo con 10 volúmenes de solución tampon. Utilizamos la siguiente solución tampon compuesta por : 10mM de TRIS, 1,5 mM de EDTA, 5 mM de molibdato de sodio (dihidratado), añadiendo en el momento de su uso 50 microlitros de monotioglicerol 0,1 % por cada 50 ml. de solución.

HOMOGENIZACION

Una vez diluido el tejido pulverizado en 10 volúmenes de tampon de homogenización frio ($2\text{ a }8\text{ }^{\circ}\text{C}$), en un tubo de ultracentrifugación previamente enfriado, lo homogenizamos con un sonicador modelo Labsonic 1510, con ráfagas inferiores a 5 segundos, manteniendo el homogenizado a una temperatura de $2 - 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante este proceso. Seguidamente ultracentrifugamos el homogenizado a 100000 xg durante una hora a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Del sobrenadante obtenido determinamos la concentración de proteínas por el método de Lowry.

DETERMINACION DE PROTEINAS

Antes de realizar el inmunoensayo determinamos las

proteínas en cada citosol, siguiendo la pauta clásica de Lowry O.H. y cols. (1951).

INMUNOENSAYO ENZIMATICO

Utilizamos esta técnica como alternativa a la determinación de receptores por el método clásico del carbón-dextrano, que solamente permite la determinación del receptor libre. La técnica que empleamos está basada en la obtención de anticuerpos monoclonales frente a la proteína estructural del receptor y consecuentemente permite medir la concentración total de receptores, no sólo los libres. Se trata de un inmunoensayo enzimático de fase sólida basado en el principio "sandwich". Esferas recubiertas de anti-RE (rata, monoclonal) se incuban con las muestras o con los "standares" o controles apropiados. Durante la incubación, el receptor estrogénico presente en las muestras, "standares" o en el control, se une a la fase sólida. Los materiales no unidos presentes en la muestra se eliminan por aspiración del líquido y lavado de las esferas. El anti-RE, conjugado con peroxidasa de rábano picante, se incuba con las esferas, y si hay receptores estrogénicos en la muestra, el conjugado se une al receptor estrogénico en la superficie de la esfera. El conjugado no unido se aspira y las esferas se lavan. A continuación se incuban las esferas con una solución de sustrato enzimático (peróxido de hidrógeno y orto-fenilendiamina-2 CL H) con lo que se desarrolla un color que es la medida de la cantidad de conjugado unido a las esferas. La reacción enzimática se suspende por adición de ácido sulfúrico 1 N y la intensidad del color desarrollado se mide usando un espectrofotómetro colocado a 492 nm, siendo proporcional a la concentración de receptores estrogénicos en la muestra.

En el procedimiento del test seguimos las instrucciones del kit Abbott ER-EIA Monoclonal.

11 - ANALISIS ESTADISTICO Y DISEÑO GRAFICO

Los resultados individuales obtenidos para cada una de las variables estudiadas fueron referidos a cada grupo experimental y expresados mediante las medidas clásicas de centralización y dispersión (Swoboda H. 1975) :

- media aritmética (\bar{X})
- desviación típica poblacional (σ)
- desviación típica muestral (s)
- error "standard" de la media (ESM)

Las diferencias entre los distintos grupos experimentales fueron estudiadas utilizando dos tipos de análisis distintos, dependiendo de la naturaleza de las variables estudiadas (Zar J.H. 1984).

11.1 - Tests Paramétricos

Fueron empleados para el análisis de muestras que reunieron los requisitos de :

- Ajustarse a una distribución normal
- Homogeneidad de las varianzas

Este fué el caso de : pesos corporales, peso de los órganos del eje hipófiso-gonadal, concentraciones séricas e hipofisárias de gonadotrofinas y estradiol circulante.

En todos estos casos realizamos los siguientes tratamientos estadísticos :

ANALISIS DE LA VARIANZA (Test F de SNEDECOR)

Nos indica si la heterogeneidad de las muestras se debe al azar (hipótesis nula H_0) o, por el contrario, es tributaria de los distintos tratamientos.

COMPARACIONES MULTIPLES (Test de STUDENT-NEWMAN-KEULS)

El hecho de no cumplirse la hipótesis nula H_0 en el análisis de la varianza, indica que hay diferencias significativas entre las medias de las poblaciones, estimadas por las medias de las muestras, sin embargo, la prueba F no permite especificar si hay o no diferencias entre pares de grupos concretos. Las diferencias entre pares de grupos fueron analizadas mediante el test de Student-Newman-Keuls para muestras con diferente número de observaciones.

11.2 - Tests No Paramétricos

El estudio de las diferencias en la latencia tumoral con los distintos tratamientos, así como la evolución de la superficie tumoral, se llevó a cabo mediante tests no paramétricos. En estos tests se considera el rango de cada elemento de una muestra en el total de la muestra. De esta manera el rango sustituye al elemento muestral en el análisis estadístico.

El protocolo seguido fué el siguiente :

ANALISIS DE LA VARIANZA POR RANGOS
(Test de KRUSKAL-WALLIS)

Este test nos informa de la existencia de diferencias significativas entre algunos de los grupos integrantes de una serie experimental. No permite, sin embargo, precisar cuales son los grupos diferentes entre si.

TEST DE CONTRASTES MULTIPLES (Test H de
KRUSKAL-WALLIS)

Cuando dentro de una serie experimental hay distintos tipos de tratamientos, que pueden ser agrupados por alguna característica común (ej. grupos de animales con hiper o hipoactividad pineal por distintas maniobras) y nos interesa compararlos en conjunto frente a otro(s) grupo (s) aislado(s) aplicamos el test H de Kruskal-Wallis. Este test utiliza la media de los rangos de los elementos de cada grupo, a diferencia del test anteriormente mencionado que utiliza la suma de los rangos.

COMPARACIONES MULTIPLES NO PARAMETRICAS
(Test de DUNN)

Permite estudiar las diferencias entre dos grupos a partir de la media de rangos. Es semejante a tests paramétricos como el de Student-Newman-Keuls o Tukey, estando especialmente indicado cuando, como en nuestro caso, el número de datos de cada grupo no es igual.

TEST DEL χ^2

Dado un parámetro muestral que se distribuye de una manera determinada entre los distintos grupos experimentales, nos puede interesar conocer si esta distribución responde al azar o por el contrario se debe a los efectos de las maniobras experimentales realizadas en cada caso. Para ello se compara mediante el test χ^2 descrito por Karl Pearson, los parámetros reales hallados con la distribución teórica, supuesta la no influencia de las maniobras realizadas. Aplicamos este análisis al estudio de la diferencia entre localizaciones tumorales, mortalidad debida al tumor y características anatomopatológicas de los tumores y de las mamas no tumorales.

11.3 - Nivel de significación

En todos los casos hablamos de diferencias significativas cuando la probabilidad es igual o menor que 0,05.

Los cálculos de las medidas de centralización y dispersión, así como los análisis de las varianzas paramétricos (ANOVA), fueron realizados con una calculadora HP-41 C, utilizando los programas editados por el propio fabricante.

Para el cálculo de los tests de Student-Newman-Keuls, Kruskal-Wallis y Dunn utilizamos un mini-ordenador modelo Dragon 32, unido a una impresora Centronics 739, confeccionando nuestros propios programas en Basic (Figuras 34, 35 y 36).

```

10 CLEAR 1000
20 INPUT "PARAMETROS ANALIZADOS?";K$:PRINT#-2,K$
30 INPUT "NUMERO DE GRUPOS";N1:NN=N1*(N1-1)/2
40 DIM B$(NN),C$(NN),A(NN),M(N1),N(N1),S$(N1)
50 PRINT "GRUPO, MEDIA Y NUMERO DE CASOS ORDENADOS DE MAYOR A MENOR (C,M,N)"
60 FOR I=1 TO N1
70 INPUT S$(I),M(I),N(I)
80 PRINT#-2,S$(I);M(I);N(I):NEXT
90 PRINT "ESM?"
100 INPUT EW:PRINT#-2,"ENS";EW
110 ES=EW/2
120 FOR I=1 TO N1-1
130 FOR J=N1 TO I+1 STEP-1
140 X=X+1:A(X)=(M(I)-M(J))/(SQR((ES*((1/N(I))+1/N(J))))))
150 B$(X)=S$(I):C$(X)=S$(J)
160 NEXTJ:NEXTI
170 FOR I=1 TO NN
180 PRINT#-2,B$(I);"-";C$(I);A(I)
190 NEXT

```

Fig. 34. Programa en BASIC para el cálculo del Student-Newman-Keuls.

```

10 PRINT"TEST DE KRUSKALL-WALLIS":PRINT#-2,"TEST DE KRUSKALL-WALLIS"
20 PRINT"PARAMETROS ANALIZADOS?":PRINT#-2,"PARAMETRO ANALIZADO?":INPUT X#:PRINT#
-2,X#
30 FOR E&HFFD7,0
40 CLS:INPUT"CUANTOS DATOS"IN
50 DIM V(N),W(N+1),Z(N),Y(N),B(N/2+2),C(N/2+2):
60 PRINT"ENTRADA DE DATOS:"
70 FOR I=1 TO N:PRINTI;" ";
80 INPUTW(I):Z(I)=W(I):V(I)=I:NEXT
90 M=N
100 F=0:FOR I=1 TO M-1
110 IF W(I)<=W(I+1) THEN 130
120 T=W(I):W(I)=W(I+1):W(I+1)=T:F=1
130 NEXT I:IF F=1 THEN M=M-1:GOTO100
140 FOR I=1 TO N
150 V(I)=I:IF W(I)=W(I+1) THEN GOSUB390:GOTO170
160 IF I>1 AND W(I)=W(I-1) GOSUB400
170 NEXT
180 INPUT"CUANTOS GRUPOS"IG
190 PRINT"NUMERO DE DATOS EN CADA UNO:"
200 FOR I=1 TO G
210 PRINTI;" ";:INPUTB(I)
220 NEXT:PRINT#-2,"RESULTADOS:":PRINT#-2,""
230 FOR I=1 TO N:FOR J=1 TO G
240 IF Z(I)=W(J) THEN Y(I)=V(J)
250 NEXT J:NEXT I
260 FOR I=0 TO G-1:FOR J=A+1 TO B(I+1)+A
270 C(I+1)=C(I+1)+Y(J)
280 PRINT#-2,Y(J);TAB(7);Z(J):NEXT J:PRINT#-2,"n=";B(I+1),"r=";C(I+1)
290 A=A+B(I+1)
300 NEXT I
310 FOR I=1 TO G:N1=N1+B(I):H1=H1+C(I)^2/B(I)
320 NEXT
330 H=12/(N1*(N1+1))*H1-3*(N1+1)
340 FOR I=1 TO G:T1=T1+(T(I)^3-T(I)):NEXT
350 C=1-T1/(N1^3-N):HC=H/C
360 PRINT#-2,"N=";N1,"H=";H
370 PRINT#-2,"T=";T1,"C=";C:PRINT#-2,"HC=";HC
380 END
390 C=C+1:RETURN
400 FOR J=I-C TO I
410 X=X+V(J):NEXT J:X=X/(C+1)
420 FOR J=I-C TO I
430 V(J)=X:NEXT J
440 G=G+1:T(G)=C+1:X=C:C=0:RETURN

```

Fig. 35. Programa en BASIC para el cálculo del Kruskal-Wallis.

```

10 CLEAR1000
20 PRINT"TEST DE DUNN":PRINT#-2,"NONPARAMETRIC MULTIPLE COMPARISONS WITH UNEQUAL
SAMPLE SIZES (DUNN)
30 PRINT"PARAMETROS ANALIZADOS?":INPUT Y$:PRINT#-2,Y$
40 CLS:PRINT"NUMERO DE GRUPOS":INPUT N1:NN=N1*(N1-1)/2:PRINT#-2,"NUMERO DE GRUPO
S=";N1
50 PRINT"NUMERO TOTAL DE CASOS ?":INPUT NT:PRINT#-2,"NUMERO TOTAL DE CASOS=";NT
60 DIM B$(NN),C$(NN),A(NN),M(N1),S$(N1)
70 PRINT"GRUPO, MEDIA DE RANGOS, NUMERO DE CASOS. (!ORDENADOS DE MAYOR A MENOR!)"
80 FOR I=1 TO N1
90 INPUT S$(I),M(I),N(I):NEXT
100 FOR I=1 TO N1
110 PRINT#-2,S$(I);M(I);N(I):NEXT
120 PRINT"SUMATORIO DE T ?":INPUT ST:PRINT#-2,"SUMATORIO DE T=";ST
130 AY=((NT)*(NT+1))/12
140 BY=ST/((12)*(NT-1))
150 FOR I=1 TO N1-1
160 FOR J=N1 TO I+1 STEP-1
170 X=X+1:A(X)=(M(I)-M(J))/(SQR((AY-BY)*((1/N(I)))+(1/N(J))))
180 B$(X)=S$(I):C$(X)=S$(J)
190 NEXT J:NEXT I
200 FOR I=1 TO NN
210 PRINT B$(I);"=";C$(I);A(I):NEXT
220 FOR I=1 TO NN
230 PRINT#-2,S$(I);"-" ;C$(I);A(I):NEXT

```

Fig. 36. Programa en BASIC para el cálculo del test de Dunn.

11.4 - Histogramas La realización de los histogramas fué mecanizada mediante un ordenador de propósito general HP - 1000, conectado a un plotter HP - 7225 B, utilizando un programa en Fortran IV confeccionado en nuestro departamento (Figura 37).

00004 IS ON CR19010 USING 00003 BLKS R=0063

```
FTN4,L
PROGRAM PLOTT
DIMENSION AL(12),DE(12),IROTU(70),INOM(12,6),IBAS(40)
WRITE(1,30)
FORMAT("ENTRAR EJE X, EJE Y, NUMERO DE BARRAS, Y FONDO DE ESCALA: _
1")
READ(1,*)IXB,IYB,N,FE
WRITE(1,31)
31 FORMAT("ENTRAR PIE DE FIGURA: ")
READ(1,7)(IROTU(I),I=1,35)
7 FORMAT(35A2)
WRITE(1,32)
32 FORMAT("ENTRAR BASE: _")
READ(1,33)(IBAS(I),I=1,20)
33 FORMAT(20A2)
FS=(IYB-1500)/FE
DO68 I=1,N
WRITE(1,69)I
69 FORMAT(13,2X,"VALOR Y DESVIACION: _")
READ(1,*)AL(I),DE(I)
68 READ(1,77)(INOM(I,J),J=1,6)
77 FORMAT(6A2)
IX=1000
IY=1500
WRITE(14,10)IX,IYB,IX,IY,IXB,IY
10 FORMAT("PU"/"PA",15,"",15/"PD"/"PA",15,"",15/"PD"/"PA",15,"",15
1/"PD")
IY=IYB
IY1=((IYB-1500)/2)+1500
IX=950
IX1=1050
IX2=400
DL=FE/2
WRITE(14,90)IX,IY,IX1,IY,IX2,IY,FE,IX,IY1,IX1,IY1,IX2,IY1,DL
90 FORMAT("PU"/"PA",15,"",15/"PD"/"PA",15,"",15/"PU"/"PA",15,"",15
1/"PD"/"LB",F5.1,"H"/"PU"/"PA",15,"",15/"PD"/"PA",15,"",15/"PU"/
2"PA",15,"",15/"PD"/"LB",F5.1,"H")
IK=(IXB-1000)/(N+1)
IL=.66*IK
WRITE(14,333)(IROTU(I),I=1,35)
333 FORMAT("PU"/"PA1200,500"/"PD"/"LB",35A2,"H")
DO40 I=1,N
IX=1400+(1/6*IK)+(I-1)*IK
IY=1500
IY1=1500+AL(I)*FS
IX1=IX+IL
IX2=IX+(IX1-IX)/2
IY2=IY1+DE(I)*FS
IX3=IX2-40
IX4=IX2+40
IYY=1125
WRITE(14,777)IX,IY,IX,IY1,IX1,IY1,IX1,IY,IX2,IY1,IX2,IY2
1,IX3,IY2,IX4,IY2,IX,IYY,(INOM(I,J),J=1,6)
777 FORMAT("PU"/"PA",15,"",15/"PD"/"PA",15,"",15/"PA",15,"",15/"PA"
1,15,"",15/"PU"/"PA",15,"",15/"PD"/"PA",15,"",15/"PU"/"PA",15,"",
2,15/"PD"/"PA",15,"",15/"PU"/"PA",15,"",15/"LB",6A2,"H")
40 CONTINUE
WRITE(14,667)(IBAS(I),I=1,20)
667 FORMAT("PU"/"PA500,1500"/"PD"/"D10,1"/"LB",20A2,"H")
999 WRITE(14,999)
FORMAT("IN")
END
END*
```

Fig. 37. Programa en FORTRAN IV para la realización de los histogramas.