

R. 9.340

-1-

T.D.
A/42

APROXIMACION HISTOQUIMICA
AL ESTUDIO DE LA
ACTIVIDAD ESTROGENICA Y ANTIESTROGENICA

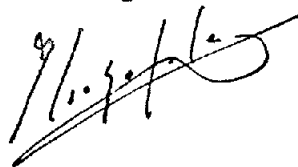
X

Aurelio Ariza Fernández

DON HUGO GALERA DAVIDSON, CATEDRATICO DE HIS
TOLOGIA Y EMBRIOLOGIA GENERAL Y ANATOMIA PA-
TOLOGICA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA -
UNIVERSIDAD DE SEVILLA,

CERTIFICA: Que bajo su dirección y en la Cá-
tedra que dirige, ha sido realizado
el trabajo titulado: "APROXIMACION HISTO-
QUIMICA AL ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ESTROGENICA
Y ANTIESTROGENICA", por Don Aurelio Ariza
Fernández, para optar al grado de Doctor en
Medicina y Cirugía.

Y para que así conste, expide el
presente certificado en Sevilla, Diciembre -
de mil novecientos ochenta y tres.



A mi padre

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis ha sido realizada bajo la dirección del Prof. Hugo Galera Davidson, Catedrático de Histología y Anatomía Patológica, Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla y del Prof. Sin Hang Lee, Associate Professor of Pathology, Yale University School of Medicine; Attending Pathologist, The Hospital of St Raphael, New Haven, Connecticut, EE.UU.

A ambos expreso mi reconocimiento por su entusiasta acogida y labor de mentores.

Gracias a Doris Barclay y Veronica Vigliotti por su colaboración en la preparación del material fotográfico e ilustraciones, Cindy Boughton por su asistencia técnica, Ursula von Scitovszky y Pamela Korsmeyer por su cooperación en la elaboración del manuscrito, y a los doctores María del Carmen Martínez, Pincas Bitterman, Miguel Coca-Prados, Miguel Alonso y Grace Hartman por su ayuda y sugerencias.

Por último, quiero expresar mi gratitud a Upjohn Company y Warner-Lambert Company por su suministro de antiestrógenos.

I N D I C E

	<u>página</u>
ABREVIATURAS.....	8
1. INTRODUCCION.....	9
1.1. Receptores de estrógenos y cáncer de mama.....	10
1.2. El método bioquímico para determinación de receptores de estrógenos.....	11
1.3. Esteroides fluorescentes.....	15
1.4. El método histoquímico para determinación de receptores de estrógenos.....	18
1.5. Interpretación de los resultados del método histoquímico.....	23
1.6. Aplicaciones diagnósticas del método histoquímico.....	29
1.7. Receptores de estrógenos en el útero de la rata.....	33

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	36
3. MATERIAL Y METODO.....	40
3.1. Animales de experimentación.....	41
3.2. Compuestos estudiados.....	41
3.3. Experimento para observar la actividad estrogénica.....	42
3.4. Experimento para observar la actividad antiestrogénica.....	42
3.5. Procedimiento experimental.....	43
4. RESULTADOS.....	45
4.1. Experimento para observar la actividad estrogénica.....	46
(Tabla 1).....	48
4.2. Experimento para observar la actividad antiestrogénica.....	49
(Tabla 2).....	50
5. DISCUSION.....	62
5.1. Antiestrógenos y receptores de estrógenos.....	63
5.2. Antiestrógenos y crecimiento celular.....	71
5.3. Naturaleza de la sustancia ligadora de estrógenos visualizada con la técnica histoquímica.....	75

6. CONCLUSIONES..... 85

7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS..... 89

ABREVIATURAS

E = estrógeno

AE = antiestrógeno

ER = receptores de estrógenos

Rn = receptor nuclear

Rc = receptor citoplásmico

E₂ = estradiol

DES = dietilestilbestrol

BSA = albúmina sérica humana

PBS = tampón fosfato salino

CMO = O-carboximetiloxima

FITC = isotiocianato de fluoresceína

1. INTRODUCCION

1.1. RECEPTORES DE ESTROGENOS Y CANCER DE MAMA

En 1896, décadas antes de que se aislase el primer cristal de una hormona esteroidea, el cirujano británico George Beatson [2] indujo regresiones de cánceres de mama avanzados mediante ooforectomía y denunció la estrecha relación existente entre este tumor y la función endocrina del ovario. Luego se constató que tan sólo 20-30% de los pacientes con cáncer de mama responden a la terapia endocrina [28,75] y que, por lo tanto, la aplicación no selectiva de ésta supondría someter a la mayoría de los pacientes a la posible morbilidad y mortalidad asociadas a este tratamiento [53].

Por consiguiente, era necesario el desarrollo de métodos que predijesen a priori qué pacientes podrían beneficiarse de esta modalidad terapéutica. Folca, en 1961 [23], administró derivados estrogénicos tritiados por vía intravenosa a pacientes con cáncer de mama a punto de ser sometidas a mastectomía y comparó la captación in vivo de hormona radioactiva por parte de los tejidos cancerosos. Los resultados revelaron que los tumores de los pacientes que luego respondían favorablemente a la adrenalectomía mostraban una captación significativamente más alta que la de aquellos que no respondían.

Más tarde, otros autores confirmaron estas observaciones con experimentos in vitro basados en la unión de ligandos radioactivos a secciones de tumor y a macromoléculas en el sobrenadante obtenido de homogeneizados de tejido tumoral [31,35]. Las proteínas ligadoras de hormona esteroidea se denominaron receptores y se asumió que estaban localizadas en el citoplasma, aunque su localización intracelular exacta está aún por demostrar.

1.2 EL METODO BIOQUIMICO PARA DETERMINACION DE RECEPTORES DE ESTROGENOS

Después de estudiar una serie de pacientes con cáncer de mama avanzado, Jensen [31] describió la estrecha correlación existente entre las respuestas clínicas a la endocrinoterapia y la presencia de receptores de estrógenos (ER) extractables en biopsias de tumores. Numerosos laboratorios han confirmado las observaciones de Jensen [31] y fijado en un 32-60% la proporción de pacientes con cáncer de mama que muestran remisión objetiva tras endocrinoterapia seleccionada mediante el método bioquímico [29,31,57].

Sin embargo, existe la necesidad de perfeccionamiento de los métodos de discriminación de casos que se puedan beneficiar de la terapia hormonal, por dos motivos: (1) la imposi-

bilidad de obtener una mayor proporción de respuestas entre los pacientes ER-positivos; y (2) el hecho de que alrededor del 10% de los casos ER-negativos responden favorablemente a la manipulación endocrina. En este sentido, los intentos de hacer cuantitativo el ensayo bioquímico han tenido algún éxito; algunos estudios han demostrado una relación directa entre la concentración de receptores de estrógenos en el tejido tumoral y la efectividad de las terapias endocrinas [29]. Aun así, quedan escollos que, por ser inherentes al método bioquímico, se muestran difíciles de salvar.

El uso de proteínas ligadoras de estrógenos en el sobrenadante de homogeneizados de tejido tumoral como índice de la dependencia hormonal de los tumores plantea un serio problema, en tanto en cuanto el carcinoma de mama humano no es una masa homogénea de células epiteliales malignas. Por el contrario, los especímenes de estos tumores siempre contienen componentes celulares no cancerosos, tales como estroma, células epiteliales ductales y células inflamatorias, mezclados en proporciones variables. Todas estas células contienen proteínas extractables, y algunas de ellas pueden tener incluso receptores de esteroides. Por consiguiente, la concentración de proteínas receptoras, cuantificada en el sobrenadante de un homogeneizado tumoral, está decisivamente influenciada por la composición celular de la muestra seleccionada para análisis y por la extractabilidad de las proteínas (receptoras y no receptoras) de los distintos

componentes celulares de la muestra. Por lo tanto, el valor cuantitativo de los sitios ligadores de esteroides, que generalmente se expresan en fentomoles por miligramo de proteína, puede que no represente el verdadero status fisiológico de las células cancerosas [49].

Otro problema es la pobre reproducibilidad de los valores de proteína receptora obtenidos mediante el método bioquímico del carbón activo cubierto con dextrano y posterior análisis de Scatchard. King [40] seleccionó nueve tumores sólidos y diez citosoles tumorales y envió una muestra de cada uno de ellos a cinco laboratorios distintos para determinación bioquímica de receptores de estrógenos. Los resultados obtenidos para los tumores sólidos o para los citosoles fueron muy discordantes de un laboratorio a otro, con la excepción de un fibrosarcoma y de una muestra de suero etiquetada a propósito como citosol. Para un mismo tumor, los resultados variaron entre "no medible" y cientos de fentomoles por miligramo de proteína.

A la vista de los defectos inherentes al método bioquímico del carbón activo cubierto con dextrano, muchos autores han explorado la posibilidad de llevar a cabo la reacción de unión de esteroides en suspensiones de células cancerosas o directamente sobre células cancerosas en una preparación histológica. Para ello han utilizado un puente esteroide-

anticuerpo o una hormona marcada con colorante. Puesto que las células cancerosas son fácilmente discernibles al microscopio, el número de células cancerosas ER-positivas observadas puede usarse como parámetro para comparar los grados de actividad ligadora de esteroide demostrados en los distintos casos.

Aunque los métodos histoquímico y bioquímico tienen como objetivo la detección de la misma reacción de unión, no hay que olvidar que la conformación estructural de los receptores, las propiedades químicas de los ligandos utilizados en la reacción, y el medio en el cual la reacción tiene lugar son bastante diferentes. Por consiguiente, las fuerzas intermoleculares en juego en el mecanismo de unión ligando-receptor puede que no sean idénticas en ambas circunstancias [39].

1.3. ESTEROIDES FLUORESCENTES

Las hormonas esteroideas se unen a sus receptores específicos con una afinidad más alta que a otros componentes tisulares. Así pues, parecería lógico pensar que si unimos un colorante a una molécula de esteroide de tal forma que se preserven los determinantes fisiológicos de la hormona, este complejo puede actuar como un marcador histológico de los receptores.

Dandliker, en 1976 [15], fue el primero en utilizar el 17β -estradiol (E_2) marcado con fluoresceína con el propósito de visualizar la captación de hormona por parte de suspensiones y fragmentos celulares. El reactivo se sintetizó mediante condensación de 17β -estradiol-6-oxicarboximetiloxima (17β - E_2 -6-CMO) con amina fluoresceínada (isotiocianato de fluoresceína, FITC), de tal forma que el colorante fluorocromo estuviese unido a la posición 6 de la hormona esteroidea. Sin embargo, este autor fue incapaz de bloquear la unión a las células mediante hormona no marcada.

Una de las principales dificultades que presenta el uso de estrógeno fluoresceinado como reactivo histológico es su baja solubilidad en soluciones acuosas a pH fisiológico. La unión de un colorante fluorescente a un derivado esteroideo no parece aumentar significativamente la solubilidad de este último. En consecuencia, la intensidad de fluorescencia que manifiestan las células ligadoras de esteroide es bastante débil. Los intentos de usar una concentración casi saturada de estos compuestos no hidrófilos ha terminado siempre en una precipitación de los reactivos.

Para disolver las hormonas esteroideas en solución acuosa se debe emplear una molécula hidrófila como portadora. A este fin se ha seleccionado la albúmina sérica humana (BSA), debido a su fácil disponibilidad. Cada molécula de BSA puede acoplarse con 20-30 residuos esteroideos y 4-11 residuos de colorante. En el presente, estos conjugados de esteroides fluorescentes hidrófilos parecen ser los reactivos fluorescentes más prometedores para la detección de receptores de estrógenos en secciones de criostato [49]. La figura 1 ilustra la secuencia de reacciones químicas que se dan en la preparación del 17β -E₂-6-CMO-BSA-FITC. También se han preparado compuestos similares para el estudio de los receptores de progesterona y andrógenos.

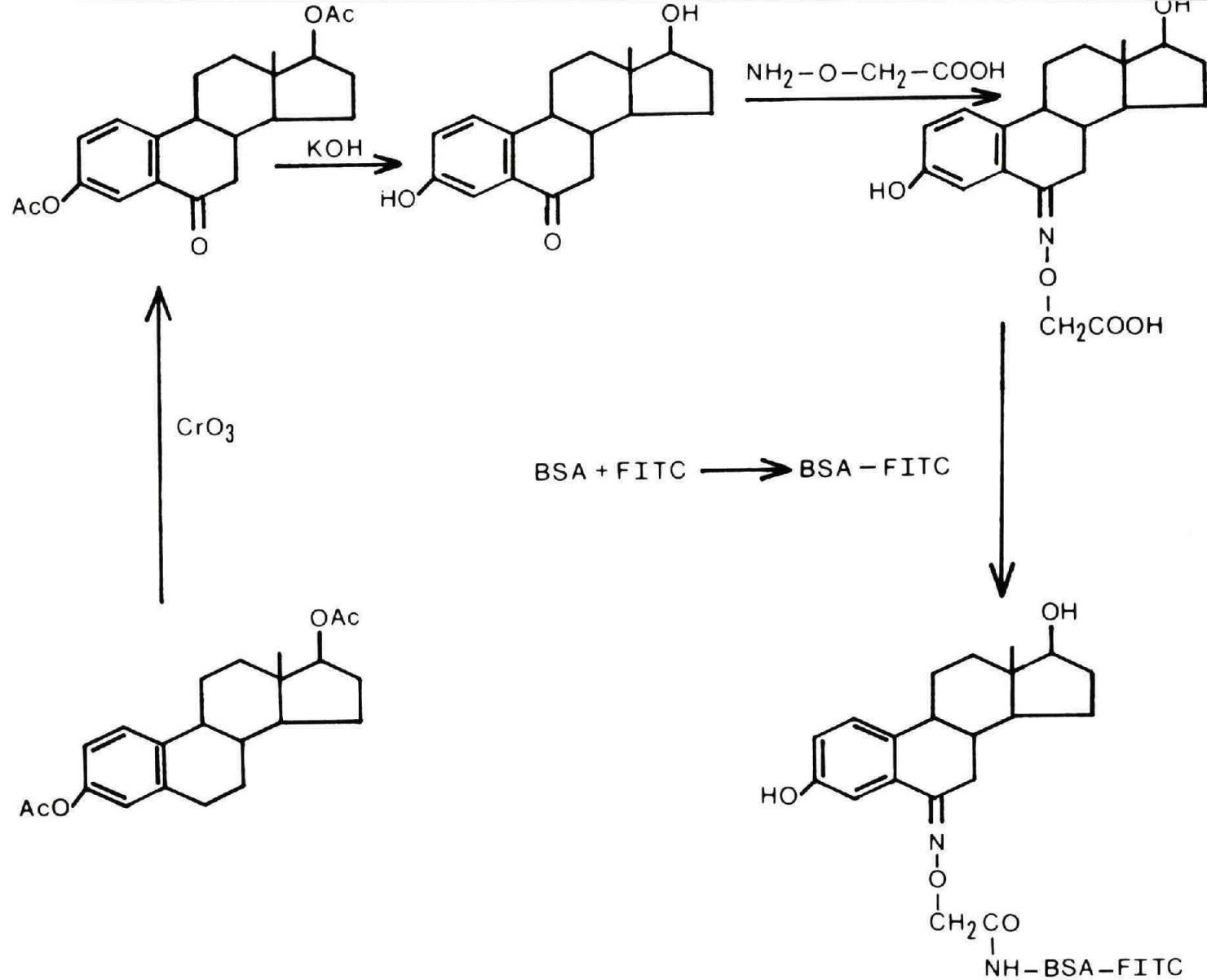


FIGURA 1: Secuencia de reacciones químicas involucradas en la síntesis de 17 β -estradiol-6-CMO-BSA-FITC.

1.4. EL METODO HISTOQUIMICO PARA DETERMINACION DE RECEPTORES DE ESTROGENOS

Tan pronto como sea posible tras la obtención del espécimen a analizar, se obtendrán varias secciones mediante criostato. Si se requiere transporte, el espécimen deberá sumergirse en al menos 20 volúmenes de tampón fosfato salino (PBS) frío en un recipiente repleto de hielo triturado; el análisis habrá de tener lugar en el transcurso de menos de 24 horas.

La demostración de actividad ligadora de esteroides por parte de las células de un tejido requiere preservar las proteínas receptoras en una forma relativamente insoluble, de modo que no sean barridas por los reactivos o por el líquido de enjuagado. El método de elección para "inmovilizar" los receptores es, en el momento presente, el secado al aire de las preparaciones en un ambiente frío (0-5°C). Conviene resaltar que los bloques de tejido que han permanecido durante muchas horas en un criostato o congelados a -20°C no son adecuados para este procedimiento.

El procedimiento de tinción recomendado por Lee [45] incluye los siguientes pasos:

- (1) obtener en el criostato secciones de tejido de 6-10 micras de espesor;
- (2) secar las secciones al aire a 4°C durante una hora;
- (3) rehidratar las secciones cubriéndolas con unas cuantas gotas de BSA al 2% disuelta en PBS de pH 7,4;
- (4) transcurridos unos segundos, drenar y enjuagar el PBS en exceso;
- (5) cubrir la sección 0,1 ml de conjugado de esteroide fluorescente e incubarla en cámara húmeda por dos horas a temperatura ambiente;
- (6) drenar el conjugado y enjuagar la sección en PBS, cuidadosamente y sin agitarla;
- (7) sumergir en una placa de Petri con PBS el extremo del portaobjetos sobre el que descansa el tejido, de forma que éste quede sumergido y mirando hacia abajo, y el

extremo opuesto del portaobjetos descansa sobre el borde de la placa de Petri;

(8) transcurridos 30 minutos, cambiar el PBS y sumergir la preparación por otros 30 minutos;

(9) drenar y enjugar el PBS en exceso, secar la preparación a temperatura ambiente y cubrirla con glicerina amortiguada y un cubreobjetos.

La intensidad de fluorescencia de las células dotadas de receptores no parece disminuir significativamente en los dos o tres días que siguen a la tinción. Así pues, la lectura de resultados deberá llevarse a cabo dentro de este período de tiempo y, preferiblemente, tan pronto como se haya completado el procedimiento.

Varias observaciones han venido a demostrar que el 17β -E₂-6-CMO-BSA-FITC se une específicamente a receptores de estrógenos en secciones de criostato:

(1) este conjugado tiñe selectivamente células por todos consideradas como efectoras para los estrógenos, tales como las células epiteliales ductales de la glándula mamaria, las células epiteliales del endometrio y las células musculares lisas del miometrio, pero no tiñe las células epi-

teliales o musculares del tracto gastrointestinal, por ejemplo;

(2) el complejo BSA-FITC, sin derivado esteroideo, no muestra ninguna diferencia en su afinidad por las células efectoras o no efectoras;

(3) la intensidad de fluorescencia manifestada por las células efectoras tras la aplicación del conjugado de estradiol fluorescente es proporcional al número de residuos esteroideos unidos a la proteína portadora (en general, se requieren al menos 20 moles de residuos esteroideos unidos a un mol de BSA para que el conjugado muestre una afinidad adecuada hacia los receptores celulares);

(4) la tinción de las células efectoras por estradiol fluorescente puede bloquearse mediante reincubación de las secciones en 17β -E₂-BSA sin FITC;

(5) el complejo 11α -hidroxiprogesterona-BSA es incapaz de bloquear la tinción por 17β -E₂-6-CMO-BSA-FITC, y el 17β -E₂-6-CMO-BSA no produce bloqueo de la tinción por 11α -hidroxiprogesterona-BSA con fluoresceína; estos hechos son muy significativos si se tiene en cuenta que las células positivas para los receptores de estrógenos lo suelen ser también para los de progesterona [49].

Las constantes de disociación (K_d) calculadas en base a proteínas receptoras solubilizadas libres y ligandos esteroideos no tienen aplicación en el método histoquímico, en el cual se usa un reactivo con tres compuestos (esteroide, BSA y colorante fluorocromo). La afinidad entre los receptores celulares insolubles y el conjugado de esteroide fluorescente no viene determinada tan sólo por los residuos esteroideos, sino también por las características físico-químicas del portador y del colorante. El conjugado teñirá cualquier estructura que tenga una afinidad alta por el colorante; por ejemplo, los reactivos marcados con fluoresceína pueden teñir los eosinófilos, ya que la estructura molecular de la fluoresceína es muy similar a la de la eosina. Por suerte, la tinción inespecífica es tan débil, o tan evidente desde el punto de vista histológico, que no representa dificultad alguna.

1.5. INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS DEL METODO HISTOQUIMICO

El principio de la determinación histoquímica de los receptores de estrógenos (ER) en tumores es la estimación del porcentaje de células ER-positivas dentro de una población dada de células cancerosas. El cálculo aproximado de la proporción de células fluorescentes y no fluorescentes efectuado por un anatomopatólogo usando una lente de mediano aumento suele proporcionar información bastante precisa acerca del status receptor de un tumor.

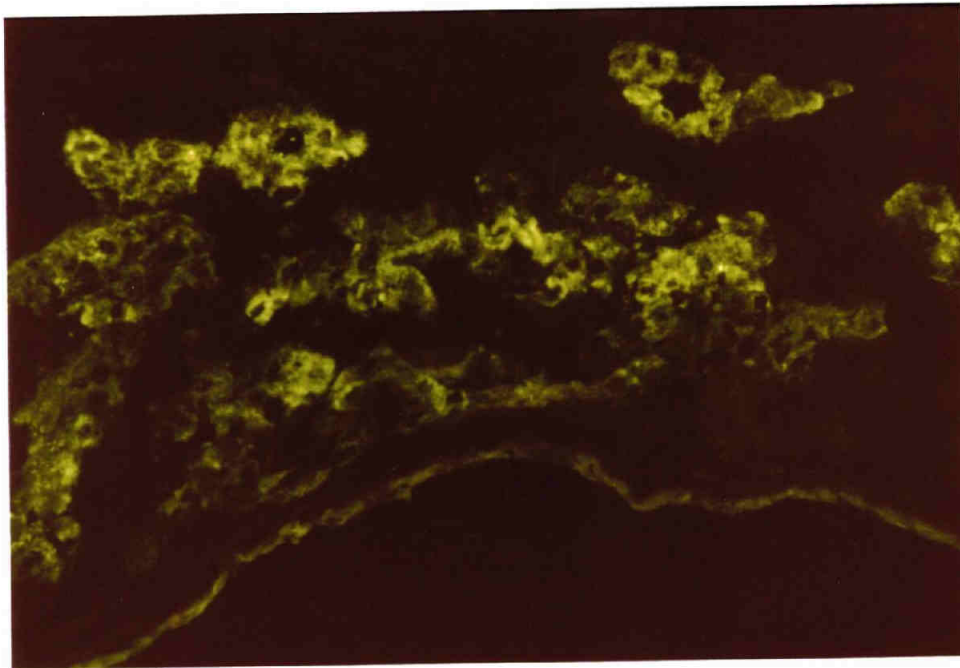
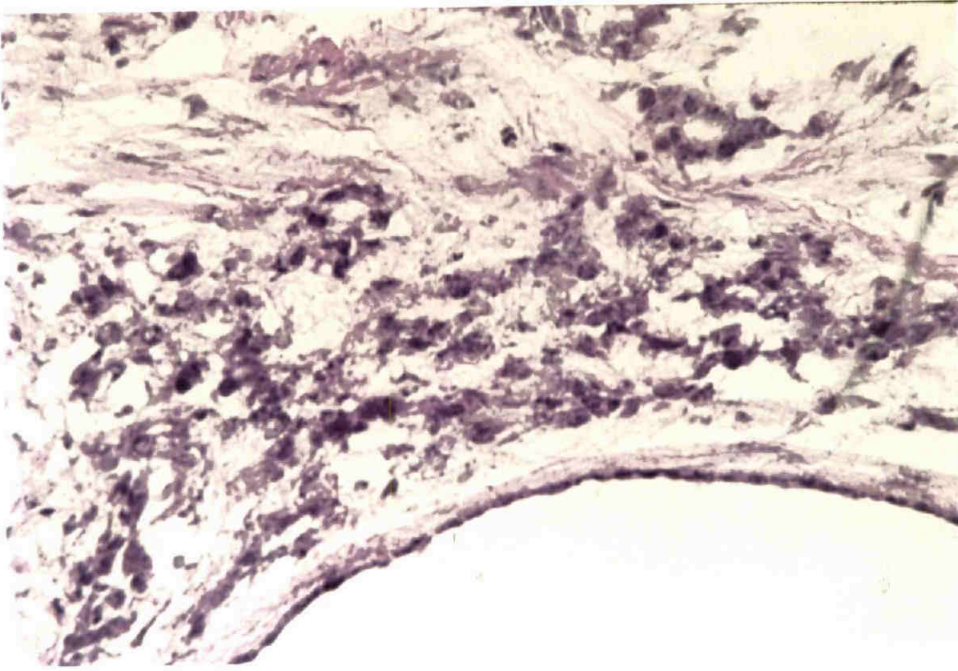
Para hacer más fácil la identificación de células cancerosas en una preparación histoquímica, es aconsejable disponer de un microscopio de fluorescencia y otro de luz, uno al lado del otro, de modo que una sección consecutiva teñida con hematoxilina-eosina pueda servir de guía. De otra forma, se podría infravalorar el número total de células cancerosas ER-negativas. Además, cuando las células cancerosas infiltran un lóbulo benigno, algunas de las células benignas ER-positivas pueden malinterpretarse como células cancerosas ER-positivas al microscopio de fluorescencia. Este error se puede prevenir si se usa como referencia una preparación te-

ñida con hematoxilina-eosina. Una solución alternativa a este problema es la dada por Gambacorta [24], que aplica al tejido el método histoquímico y a continuación una tinción ligera con hematoxilina; esta combinación permite un estudio morfológico detallado de las células fluorescentes y no fluorescentes, así como una valoración de su distribución dentro del tumor.

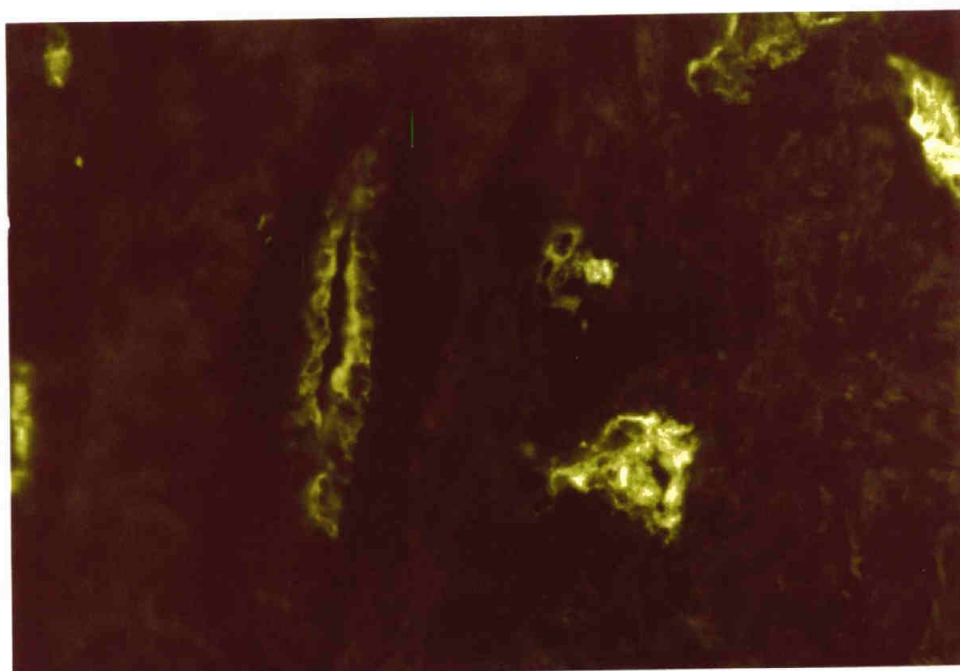
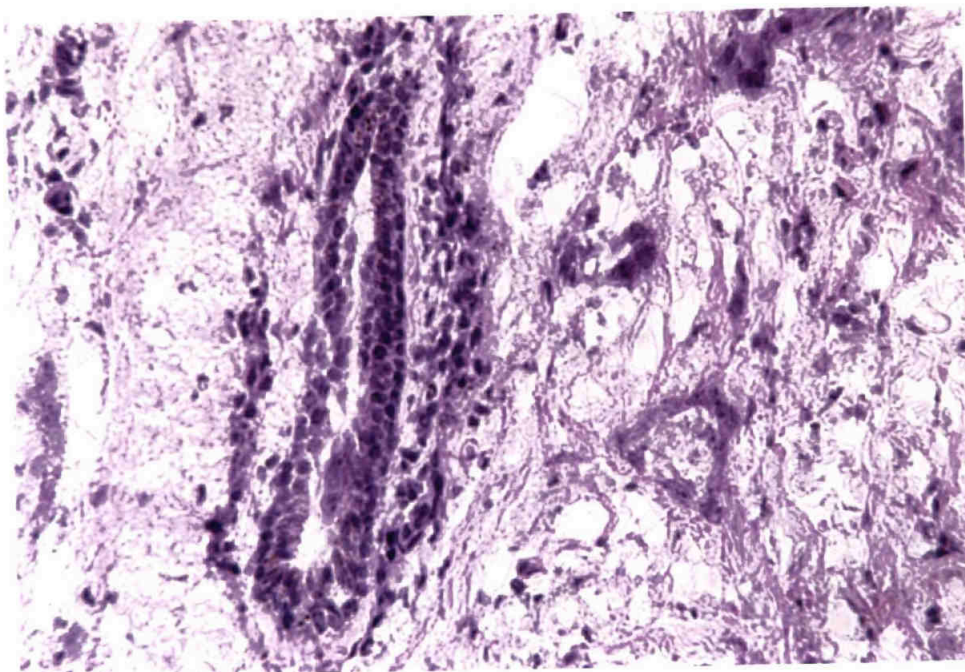
Quando se examinan las preparaciones histoquímicas, es aconsejable buscar las células epiteliales benignas, que hacen las veces de control positivo. Probablemente, todas las células epiteliales normales de la mama contienen receptores de estrógenos, aunque no todas ellas exhiben actividad ligadora de esteroide mediante la técnica histoquímica. Este procedimiento identifica como ER-positivas solamente aquellas células cuya capacidad de captación de esteroide está por encima de un cierto nivel. Aquellas células epiteliales ductales benignas que manifiesten la fluorescencia citoplásmica más intensa sirven como control positivo. Estas células ER-positivas pueden encontrarse en las glándulas mamarias de casi todas las mujeres en edad pre y perimenopáusica, especialmente cuando existe hiperplasia ductal, pero pueden estar ausentes en las mamas atróficas de las pacientes de mayor edad. Con estas células como patrón de comparación, las células cancerosas que manifiesten una intensidad similar de fluorescencia citoplásmica se consideran como ER-positivas, y se-

guramente contienen una cantidad de sitios receptores aproximadamente igual a la de las células ductales normales. Las células cancerosas que muestren una intensidad de fluorescencia mayor o menor que la de los controles se clasifican como fuertemente positivas o como negativas, respectivamente. El término "negativo" se utiliza para facilitar la comunicación con los clínicos, sin que implique un valor "cero".

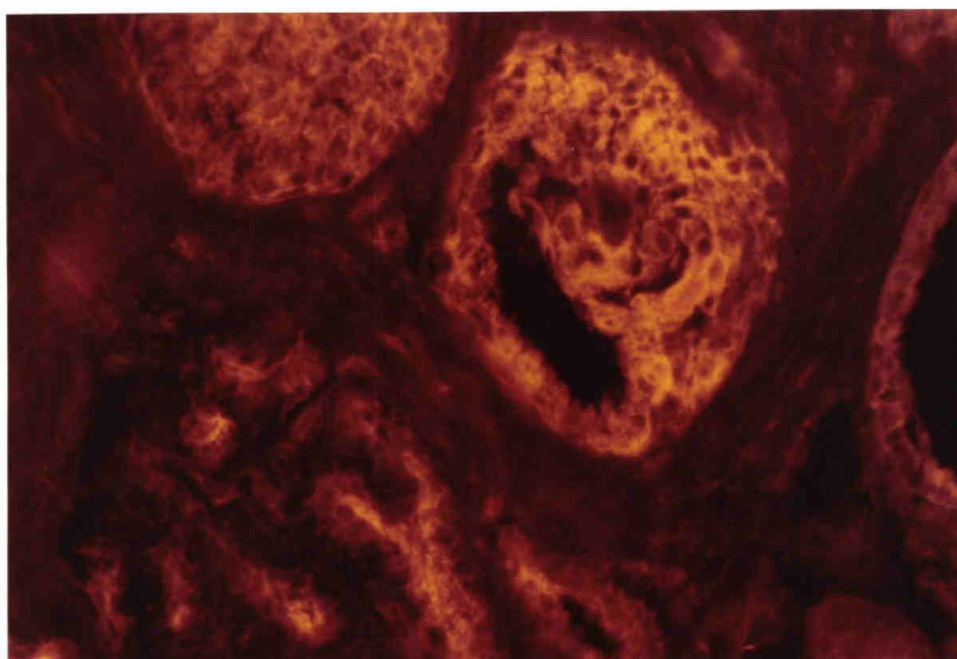
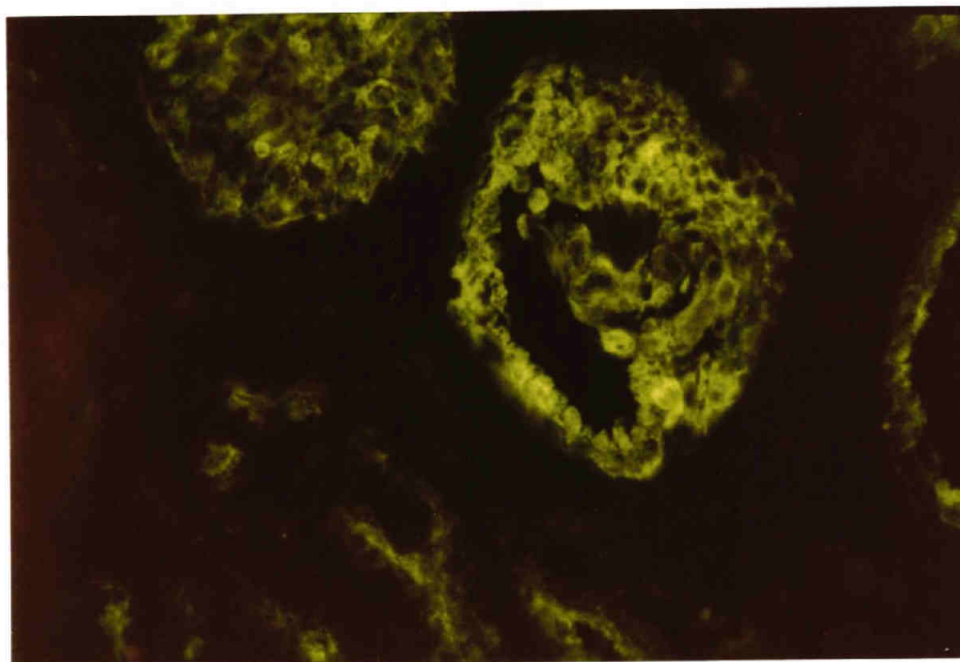
Para determinar la reproducibilidad de los resultados producidos por la técnica histoquímica, se pueden obtener secciones consecutivas de tejido tumoral. Las células ER-positivas y ER-negativas en secciones adyacentes deben aparecer en grupos de idéntica distribución geográfica. En el caso de cánceres con un componente intraductal y otro infiltrante, conviene evaluar el status receptor de ambos componentes de forma separada, puesto que la mayoría de los carcinomas intraductales (excepto los de tipo papilar) están compuestos por células ER-negativas. El carcinoma papilar intraductal, por otra parte, frecuentemente contiene focos de células cancerosas que son positivas para los receptores de estrógenos y para los de progesterona [45-47,49]. Algunos de estos puntos se ilustran en las figuras 2, 3, 4, 5, 6 y 7.



FIGURAS 2 y 3: Secciones consecutivas de un cáncer de mama humano mostrando la misma área teñida con hematoxilina-eosina (fig. 2) y con conjugado de estradiol fluorescente (fig. 3). Las células cancerosas de este tumor son en su mayoría ER-positivas (x44).



FIGURAS 4 y 5: Secciones consecutivas de la glándula mamaria humana mostrando el mismo ducto normal teñido con hematoxilina-eosina (fig. 4) y con conjugado de estradiol fluorescente (fig. 5). Las células ductales benignas ER-positivas sirven como control positivo para valorar la presencia de ER en las células cancerosas adyacentes (x282).



FIGURAS 6 y 7: Secciones consecutivas de un área de papilomatosis de la glándula mamaria humana mostrando la misma zona teñida con conjugado de estradiol fluorescente (fig. 6) y con conjugado de progesterona fluorescente (fig. 7). Nótese la actividad ligadora de estrógeno y de progesterona. Los sitios receptores de estrógeno aparecen en verde y los de progesterona en naranja (x282).

1.6. APLICACIONES DIAGNOSTICAS DEL METODO
HISTOQUIMICO

Una aplicación importante de la técnica histoquímica es la identificación de cánceres de mama sensibles a la terapia hormonal. El método histoquímico puede utilizarse como suplemento de la técnica bioquímica o como alternativa a la misma, especialmente cuando el material no es adecuado para la preparación de citosoles o cuando no se dispone de las facilidades necesarias para el ensayo bioquímico.

Los cánceres de mama humanos están compuestos de poblaciones heterogéneas de células ER-positivas y ER-negativas, mezcladas en proporciones variables. La mayoría de estos tumores están compuestos de células ER-negativas; las células cancerosas ER-positivas igualan o exceden el número de la ER-negativas en tan sólo el 20% de los casos. Se ha sugerido que un cáncer de mama que contenga una proporción de más de 50% de células ER-positivas en la población de células cancerosas infiltrantes sea considerado como potencialmente sensible a la hormonoterapia, puesto que de acuerdo con los criterios objetivos de evaluación de los efectos de la terapia hormonal, una reducción del 50% en el tamaño de una masa tumoral se considera como signo de regresión. Se requiere una correlación a gran es-

cala de los hallazgos histoquímicos con los resultados del tratamiento clínico para determinar si la proporción de 50% de células cancerosas positivas es una línea divisoria adecuada para la selección de pacientes para terapia endocrina. También se necesitan investigaciones que aclaren el valor de las determinaciones de otros receptores esteroideos celulares, tales como los de progesterona y testosterona.

En la mayoría de los cánceres de mama ER-positivos, la manipulación hormonal tan sólo induce remisiones parciales y de corta duración. Con el tiempo, casi todos los cánceres bajo tratamiento endocrino se hacen autónomos [70]. No se sabe si las proporciones de células cancerosas ER-positivas y ER-negativas cambian significativamente durante el curso de la terapia hormonal. A veces, un cáncer de mama contiene poblaciones nítidamente separadas de células ER-positivas y ER-negativas. Una hipótesis simplista sería que la manipulación hormonal afecta tan sólo al crecimiento de las células cancerosas ER-positivas, hasta que, con el tiempo, el tumor queda compuesto predominantemente de células ER-negativas.

La aplicación del método histoquímico a las distintas lesiones de la mama ha proporcionado las siguientes observaciones:

(1) Las células epiteliales de las lesiones papilomatosas benignas intraductales muestran un grado de actividad

ligadora de estrógenos bastante uniforme.

(2) Los carcinomas papilares intraductales a menudo muestran focos netamente separados de células cancerosas ER-positivas y ER-negativas. A veces se puede encontrar un grupo de células benignas ER-positivas que está comprimido por una masa cancerosa compuesta principalmente por células ER-negativas. Este fenómeno en el que un grupo de células ER-negativas parece proliferar a expensas del epitelio adyacente ER-positivo dentro del mismo ducto mamario se ha observado tan sólo en lesiones obviamente malignas y no en papilomas benignos; por consiguiente, este fenómeno puede servir como criterio potencial para diferenciar una lesión maligna de un tumor papilar benigno.

(3) Los carcinomas sólidos no infiltrantes están compuestos mayormente de células ER-negativas.

(4) Las células cancerosas en los carcinomas lobulares in situ parecen ser heterogéneas en cuanto a su positividad para los receptores de estrógenos ya desde los primeros estadios de su desarrollo, que se caracteriza por el crecimiento simultáneo de células ER-positivas y ER-negativas. En los mismos ductos terminales, este proceso lleva a una composición celular que es heterogénea incluso dentro de un pequeño segmento de un lóbulo, con las células cancerosas ER-positivas y ER-negativas creciendo unas al lado de otras.

A medida que se están estableciendo los criterios de aplicación del método histoquímico de receptores de estrógenos

en el cáncer de mama, está surgiendo la tendencia a extender la aplicación de este procedimiento al estudio de otros cánceres potencialmente hormono-sensibles, tales como los de endometrio, ovario y próstata.

Algunos autores han sugerido la existencia de receptores para los esteroides en el núcleo de las células cancerosas [75]. Con la técnica histoquímica se puede observar en ocasiones una ligera tinción del núcleo por el conjugado de estradiol fluorescente. Sin embargo, no podemos dar por hecha la existencia de receptores nucleares, puesto que la transferencia de productos de reacciones histoquímicas del citoplasma al núcleo es un fenómeno bien conocido de la histoquímica enzimática.

Ya que la síntesis de receptores de progesterona parece estar estimulada por los estrógenos [70], la presencia de proteínas receptoras de progesterona en homogeneizados de tejido tumoral se ha interpretado como evidencia de la "operatividad" del sistema estrogénico de un tumor determinado [30, 44, 57]. Los hallazgos histoquímicos apoyan esta hipótesis al demostrar que la mayoría de las células positivas para los receptores de progesterona, sean benignas o malignas, contienen un nivel significativo de receptores de estrógenos [47].

1.7. RECEPTORES DE ESTROGENOS EN EL UTERO DE LA RATA

Durante muchas décadas se ha usado la respuesta biológica del aparato reproductor femenino, especialmente del útero y la vagina de los roedores, para valorar la actividad estrogénica y antiestrogénica [17]. Desde que se describió que determinados tejidos efectores retenían el ^3H -estradiol inyectado a ratas, se ha prestado mucha atención al estudio de las proteínas receptoras de estrógenos del útero de la rata. Se han llevado a cabo numerosos intentos para purificar y caracterizar estas proteínas de unión, así como para definir su distribución intracelular exacta en el útero bajo distintas condiciones fisiológicas y experimentales [33]. Basándose en la cuantificación de la actividad ligadora de estrógenos de las fracciones citosólica y nuclear de homogeneizados tisulares, se desarrolló un esquema de la interacción esteroide-receptor que es ampliamente aceptado en la actualidad.

Aunque la investigación bioquímica llevada a cabo con homogeneizados tisulares ha contribuido de forma impor-

tante al estudio de la acción de las hormonas esteroideas, su metodología no ha tenido en cuenta el hecho de que el útero se compone de muchos tipos celulares. Cada uno de estos tipos responde a la estimulación hormonal con distinta sensibilidad y contiene un número diferente de receptores citoplásmicos. Además, la contaminación del citosol por componentes solubles derivados de otros organelos intracelulares es inevitable con el tratamiento mecánico que se requiere para pulverizar el tejido uterino congelado. Por otra parte, no existen estudios que hayan verificado la pureza de las fracciones nucleares empleadas en los estudios bioquímicos. Por consiguiente, la única información obtenida se refiere al número de sitios de unión de los estrógenos en el sobrenadante del homogeneizado de tejido procedente de la totalidad del útero.

En el presente trabajo utilizamos la técnica histoquímica para localizar los sitios receptores de estrógenos intracelulares en secciones de criostato del útero de la ratona, usando el complejo macromolecular hidrófilo de estradiol fluorescente como reactivo histoquímico. Esta técnica tiene la ventaja de permitir el estudio de la actividad ligadora de estrógenos de numerosas células efectoras en gran número de secciones de tejido con un mínimo esfuerzo. Esto facilita

el estudio comparativo de esta actividad en un tipo celular específico bajo distintas condiciones fisiológicas y experimentales.

2. PLANTEAMIENTO

DEL

PROBLEMA

En 1978, Lee [45] describió un método histoquímico para el estudio de los receptores de estrógenos en el cáncer de mama humano. Desde su introducción, el enfoque histoquímico entró en conflicto de método e intereses con el tradicional análisis bioquímico [66,56,4,21,64,77,26,58,12,34,60,63,79,61 y 27]. La técnica histoquímica ha sido acogida con entusiasmo en países como Italia [41,24,54 y 73], en tanto que el ensayo bioquímico continúa siendo extensamente aplicado en Estados Unidos, donde la existencia de una amplia y costosa infraestructura de tecnología y personal de cara al análisis bioquímico es uno de los factores que obstaculizan un debate objetivo.

La comparación de los resultados obtenidos mediante ambos métodos ha sido objeto de múltiples estudios [56,77,58,34,63,79,61 y 27] y la validez del ensayo histoquímico en la predicción de la respuesta del cáncer de mama a la terapia hormonal está documentada en la literatura [3,67,27,42 y 81]. El presente trabajo pretende ir más allá de la controversia en torno al cáncer de mama

y explorar otras aplicaciones del método histoquímico, con lo que esperamos al mismo tiempo aumentar su base científica.

Recientemente se ha demostrado que la inyección subcutánea de estradiol aumenta la síntesis de una(s) sustancia(s) ligadora(s) de estrógenos en el citoplasma del epitelio luminal del útero de ratas inmaduras y ratas adultas ovariectomizadas, en tanto que la progesterona, pero no la hidrocortisona, antagoniza este efecto [52]. Este fenómeno puede visualizarse fácilmente con la técnica histoquímica propuesta por Lee [51].

Por otra parte, el procedimiento clásico para valorar la actividad estrogénica de un compuesto es observar el grado de cornificación vaginal en ratas hembras adultas ovariectomizadas o el aumento del peso uterino en ratas inmaduras tras la inyección del compuesto problema. Para medir la actividad antiestrogénica se observa la capacidad del compuesto en estudio para inhibir la cornificación vaginal o el aumento del peso uterino inducido por estrógeno. Estos procedimientos conllevan muchos pasos, consumen mucho tiempo y son excesivamente laboriosos [17].

Nuestra hipótesis de trabajo es que el enfoque histoquímico ofrece un medio más simple para detectar y

estudiar los acontecimientos intracelulares provocados por compuestos estrogénicos o antiestrogénicos. Mediante el análisis histoquímico de los efectos de los estrógenos y antiestrógenos sobre los receptores de estrógenos en el útero de la rata, nos proponemos investigar la posibilidad de aplicar este enfoque a la observación de los fenómenos estrogénicos y antiestrogénicos a nivel celular.

3. MATERIAL

Y

METODO

3.1. ANIMALES DE EXPERIMENTACION

Los animales de experimentación utilizados fueron ratas hembras inmaduras de raza Sprague-Dawley, obtenidas de Charles River Breeding Laboratories, Wilmington, Massachusetts.

Estos animales eran recibidos con 17 días de edad, provistos de agua y comida para roedores ad libitum, y mantenidos en un ciclo artificial día-noche.

3.2. COMPUESTOS ESTUDIADOS

Las hormonas esteroideas (estradiol, dietilestilbestrol e hidrocortisona) y el tamoxifeno se obtuvieron de Sigma Chemical Company, St Louis, Missouri. La nafoxidina y el nitromifeno, ambos anti-estrógenos experimentales no disponibles comercialmente, fueron facilitados por Upjohn Company, Kalamazoo, Michigan y Warner-Lambert, Ann Arbor, Michigan, respectivamente.

3.3. EXPERIMENTO PARA OBSERVAR LA ACTIVIDAD ESTROGENICA

Para el experimento relacionado con la actividad estrogénica, 42 ratas fueron divididas al azar en siete grupos de seis. Cada uno de estos grupos recibió, durante cinco días, una inyección subcutánea diaria de 44 nM de uno de los siguientes compuestos: estradiol (grupo I), dietilestilbestrol (grupo II), hidrocortisona (grupo III), tamoxifeno (grupo IV), nafoxidina (grupo V), nitromifeno (grupo VI) y suero salino (grupo VII).

Todos estos productos fueron disueltos en etanol y diluidos con suero normal inmediatamente antes de su uso. La primera inyección se administró cuando las ratas tenían 22 días de edad. Se sacrificó un animal de cada grupo transcurridas 8, 24, 48, 72, 96 y 120 horas tras la primera inyección.

3.4. EXPERIMENTO PARA OBSERVAR LA ACTIVIDAD ANTIESTROGENICA

En cuanto al experimento para estudio de la actividad antiestrogénica, 20 ratas fueron divididas en cinco grupos de cuatro. Cada una de ellas recibió, durante cinco días, una inyección subcutánea diaria de 44 nM de los compuestos siguientes: tamoxifeno (grupo VIII), nafoxidina (grupo IX), nitromifeno (grupo X), hidrocortisona (grupo XI) o etanol al 2% en suero salino normal (grupo XII). Durante los días tercero, cuarto y quinto todas las ratas recibieron, además, una inyección

subcutánea de 10 nM de estradiol, administrada en sitio distinto. En este experimento, todos los animales fueron sacrificados 24 horas tras la primera inyección.

3.5. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

El sacrificio de los animales se llevó a cabo mediante exsanguinación cardíaca bajo anestesia profunda con cloroformo. Inmediatamente después se disecó el útero, que en estos animales posee una forma bicorne. Tras seccionar el órgano transversalmente en seis segmentos cilíndricos, se colocó a éstos verticalmente y se les cubrió con Tissue-Tek II OCT Compound (Lab-Tek Products, Naperville, Illinois). Mediante criostato, se hicieron secciones seriadas de estos bloques. Estas secciones, de 10 micras de espesor, fueron secadas al aire a 4°C durante una hora y luego rehidratadas con unas gotas de BSA al 2% disuelto en PBS de pH 7,4. Tras unos segundos, el PBS en exceso fue eliminado y las secciones fueron colocadas en una cámara húmeda con conjugado de estradiol fluorescente (17β -E₂-6-CMO-BSA-FITC con una razón molecular estroide:proteína:colorante de 26:1:4). Este conjugado se sintetizó siguiendo el procedimiento técnico descrito por Lee [45]; el significado de sus componentes ha sido expuesto en la sección 1.4 y en la figura 1. Tras dos horas en cámara húmeda, a temperatura ambiente, las secciones fueron enjuagadas en PBS durante una hora, secadas a temperatura ambiente, y cubiertas con glicerina

y cubreobjetos. El examen se efectuó en un microscopio de fluorescencia Zeiss equipado con filtros específicos para la excitación de la fluorescencia.

Un experimento adicional consistió en la administración de una sola inyección subcutánea de 44 nM de tamoxifeno a 24 ratas de 22 días de edad que fueron luego sacrificadas en grupos de cuatro a las 8, 24, 48, 72, 96 y 120 horas.

Además, mediante un experimento preliminar, se demostró que ninguna rata Sprague-Dawley muestra actividad ligadora de estrógenos en el útero antes de los 30 días de edad.

Como complemento a las tinciones con conjugado de estradiol fluorescente, se llevaron a cabo tinciones con hematoxilina-eosina de cada uno de los úteros estudiados.

Todas las observaciones hechas en los experimentos descritos se verificaron en al menos otra ocasión en el curso de experimentos sucesivos.

Como experimento de bloqueo, las secciones se preincubaron durante una noche a 4°C en 2×10^{-4} M de dietilestilbestrol en PBS. Luego se añadió E₂-BSA-FITC en una concentración equivalente a 2×10^{-6} M de derivado de estradiol. Las secciones se mantuvieron en esta solución durante 24 horas más y posteriormente se observaron al microscopio de fluorescencia, donde se comprobó su negatividad.

4. RESULTADOS

4.1. EXPERIMENTO PARA OBSERVAR LA ACTIVIDAD ESTROGENICA

(Tabla 1)

Las secciones de úteros de ratas inmaduras no tratadas (experimento preliminar) demostraron una intensidad de fluorescencia casi uniforme para todos los tipos celulares (incluyendo las células epiteliales luminales y glandulares, las células del estroma del endometrio y las células musculares lisas de miometrio) tras la tinción con el conjugado de estradiol fluorescente (17β -E₂-6-CMO-BSA-FITC). Los animales de control (grupo VII), a los que se habían administrado múltiples inyecciones de etanol al 2% en suero salino normal, mostraron un cuadro idéntico. Este grado de fluorescencia se tomó como intensidad basal, y probablemente es la consecuencia de la existencia en el útero de un número limitado de sitios ligadores de estrógenos que se hallan distribuidos de forma uniforme entre los distintos componentes celulares. Ninguno de los compuestos químicos estudiados provocó cambios en el patrón mencionado a las 8 horas de la primera inyección.

Veinticuatro horas tras la primera inyección de estradiol, dietilestilbestrol, tamoxifeno, nafoxidina o nitromifeno, todas las ratas comenzaron a mostrar intensa fluorescencia citoplásmica focal en algunas de las células epiteliales luminales. Este aumento de fluorescencia indica un

incremento en la actividad ligadora de estrógenos. Esta actividad ligadora alcanzó su punto máximo a las 48 horas tras la primera inyección en lo que respecta a los animales tratados con estradiol (grupo I), dietilestilbestrol (grupo II), tamoxifeno (grupo IV) o nitromifeno (grupo VI), en los que prácticamente la totalidad del epitelio luminal reveló una intensa fluorescencia citoplásmica que abarcaba la porción extranuclear de todas las células. En cambio, en el grupo de la nafoxidina (grupo V), la actividad ligadora no alcanzó su máximo hasta transcurridos cuatro días de la inyección inicial. Este nivel elevado de actividad ligadora se mantuvo en fase de plateau durante el resto del período experimental en los animales tratados con estradiol o dietilestilbestrol (grupos I y II). En cambio, en las ratas que recibieron inyecciones de antiestrógenos no esteroideos (grupos IV, V y VI), la actividad ligadora descendió precipitadamente a las 24-48 horas de alcanzar el punto máximo. Las figuras 8-13 ilustran esta secuencia para el tamoxifeno.

En los cinco grupos tratados con estrógenos o antiestrógenos (grupos I, II, IV, V y VI), las células epiteliales del endometrio retuvieron hasta el final del experimento la apariencia hipertrófica que habían adquirido durante el curso del mismo. Por otra parte, los úteros de las ratas a las que se inyectó hidrocortisona (grupo III) no desplegaron ningún aumento en la actividad ligadora de estrógenos.

En cuanto a las ratas que recibieron una sola inyección de 44 nM de tamoxifeno, mostraron el nivel máximo de actividad ligadora de estrógenos en el citoplasma a las 48 horas de la inyección. A continuación, la actividad ligadora disminuyó muy gradualmente, de tal forma que algunas células luminales aún exhibían intensa fluorescencia a los 4-5 días de la inyección.

Tabla 1. ACTIVIDAD LIGADORA DE ESTROGENOS MOSTRADA POR EL EPITELIO UTERINO DE LA RATA EN RESPUESTA A LA ADMINISTRACION SEPARADA DE ESTROGENOS, ANTIESTROGENOS O PRODUCTOS NEUTROS

GRUPO	COMPUESTO INYECTADO*	TIEMPO TRAS INYECCION INICIAL					
		8 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
I	estradiol	-	+	++	++	++	++
II	DES	-	+	++	++	++	++
III	cortisona	-	-	-	-	-	-
IV	tamoxifeno	-	+	++	+	-	-
V	nafoxidina	-	-	-	+	++	+
VI	nitromifeno	-	+	++	+	-	-
VII	salino	-	-	-	-	-	-

* Inyección subcutánea diaria de 44 nM durante cinco días

- denota actividad basal, + actividad ligera,
++ actividad intensa

4.2. EXPERIMENTO PARA OBSERVAR LA ACTIVIDAD ANTIESTROGENICA

(Tabla 2)

En las ratas que recibieron una inyección diaria de etanol al 2% en suero salino normal durante cinco días y una inyección diaria de 10 nM de estradiol durante los tres últimos días de ese período de cinco (grupo XII), se notó intensa actividad ligadora de estrógenos en el citoplasma.

El aumento de fluorescencia inducido por las inyecciones de estradiol no fue afectado por la administración previa concomitante de hidrocortisona (grupo XI), pero fue neutralizado por los tres anti-estrógenos no esteroideos estudiados (grupos VIII, IX y X). Es destacable el hecho de que tras cinco días de administración diaria de tamoxifeno (grupo IV) o nitromifeno (grupo VI), la actividad ligadora de estrógeno del epitelio luminal era tan débil que la intensidad de fluorescencia exhibida por estas células fue a menudo menor que la observada en úteros de animales de control no tratados (grupo VII).

En el curso de estos experimentos, tan sólo tres ratas mostraron fluorescencia del núcleo de las células epiteliales y ausencia de fluorescencia en el citoplasma. Los tres animales habían recibido antiestrógenos no esteroideos. Puesto que esto pareció ser un hecho aislado y no reproducible, no dimos ningún significado a esta observación.

Tabla 2. ACTIVIDAD LIGADORA DE ESTROGENOS EN EL EPITELIO
 UTERINO DE LA RATA EN RESPUESTA A LA ADMINISTRACION
 COMBINADA DE ESTROGENOS, ANTIESTROGENOS Y PRODUCTOS
 NEUTROS

GRUPO	COMBINACION INYECTADA*	FLUORESCENCIA
VIII	tamoxifeno + estradiol	-
IX	nafoxidina + estradiol	-
X	nitromifeno + estradiol	-
XI	hidrocortisona + estradiol	++
XII	salino + estradiol	++

* Inyección subcutánea diaria de 44 nM de tamoxifeno, nafoxidina, nitromifeno, hidrocortisona o suero salino durante cinco días; inyección diaria de 10 nM de estradiol durante los días tercero, cuarto y quinto.

- denota actividad basal, ++ actividad intensa

El examen de las tinciones con hematoxilina-eosina demostró que tanto los estrógenos como los antiestrógenos no esteroideos provocan hipertrofia e hiperplasia del epitelio uterino, patente ya a las 24 horas de la administración de estos compuestos. La hipertrofia e hiperplasia inducidas por los antiestrógenos persisten aun durante la fase anti-estrogénica de estas drogas, revelando que la actividad ligadora de estrógenos y el crecimiento celular siguen cursos independientes (Tabla 3).

Tabla 3. CRECIMIENTO DE LAS CELULAS DEL EPITELIO UTERINO DE LA RATA EN RESPUESTA A LA ADMINISTRACION DE ESTROGENOS, ANTIESTROGENOS, COMBINACIONES DE AMBOS O PRODUCTOS NEUTROS

COMPUESTO INYECTADO	TIEMPO TRAS INYECCION INICIAL					
	8 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
estradiol*	-	+	++	+++	+++	+++
tamoxifeno*	-	+	++	+++	+++	+++
tamoxifeno + E ₂ **	-	+	++	+++	+++	+++
salino	-	-	-	-	-	-

* Inyección subcutánea diaria de 44 nM durante 5 días

** Inyección subcutánea diaria de 44 nM de tamoxifeno durante cinco días y de 10 nM de estradiol durante los días tercero, cuarto y quinto.

- denota no crecimiento, + crecimiento ligero,

++ crecimiento moderado, +++ crecimiento intenso

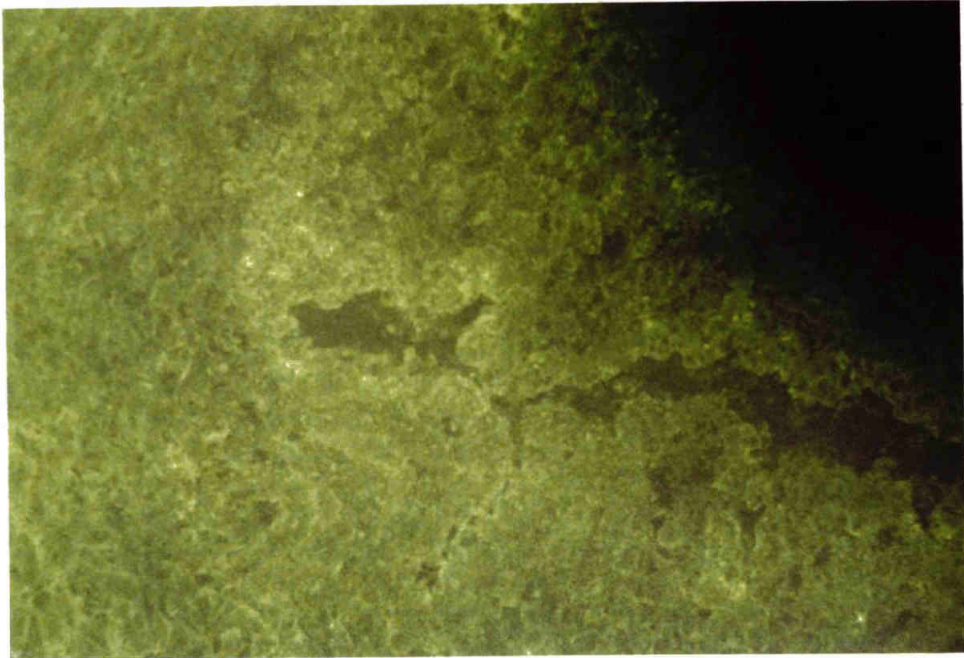


FIGURA 8. Sección de útero de rata inmadura a la que se inyectaron 44 nM de tamoxifeno por vía subcutánea y se sacrificó 8 horas después. La tinción con 17β -E₂-6-CMO-BSA-FITC muestra una intensidad de fluorescencia uniforme para todos los tipos celulares, idéntica a la observada en ratas no tratadas. Este grado de fluorescencia se toma como intensidad basal (x88).

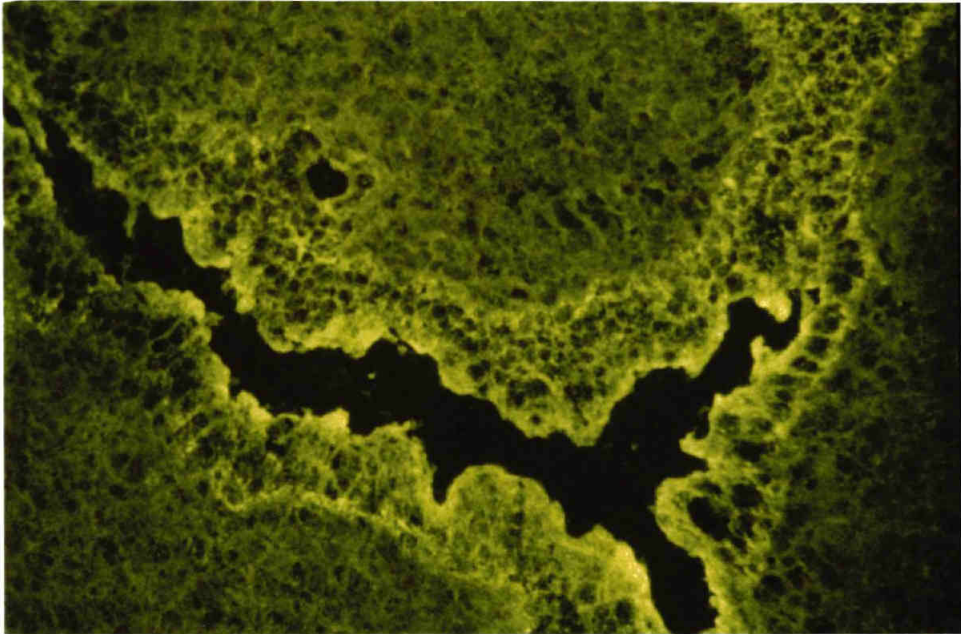


FIGURA 9: Sección de útero de rata inmadura a la que se inyectaron 44 nM de tamoxifeno por vía subcutánea y se sacrificó 24 horas más tarde. La tinción con 17β -E₂-6-CMO-BSA-FITC revela fluorescencia citoplásmica focal en algunas células del epitelio luminal. El incremento de fluorescencia traduce el aumento de la actividad ligadora de estrógenos (x282).

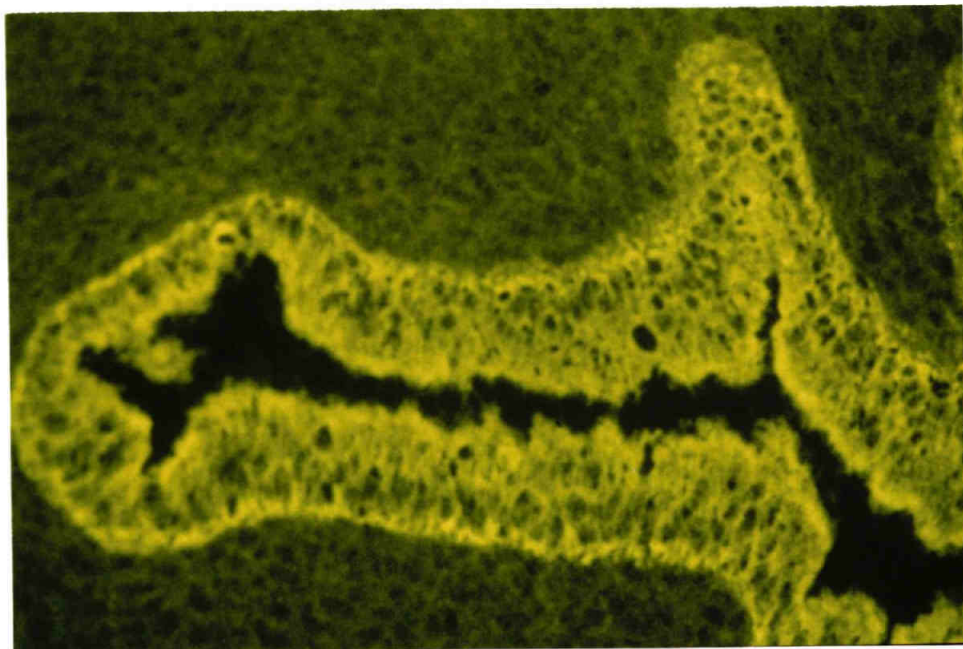


FIGURA 10: Sección de útero de rata inmadura a la que se administró una inyección subcutánea diaria de 44 nM de tamoxifeno durante dos días y se sacrificó al tercer día. La tinción con 17β -E₂-6-CMO-BSA-FITC muestra intensa fluorescencia en todo el epitelio luminal, marcando el punto de máxima actividad ligadora de estrógenos (x282).

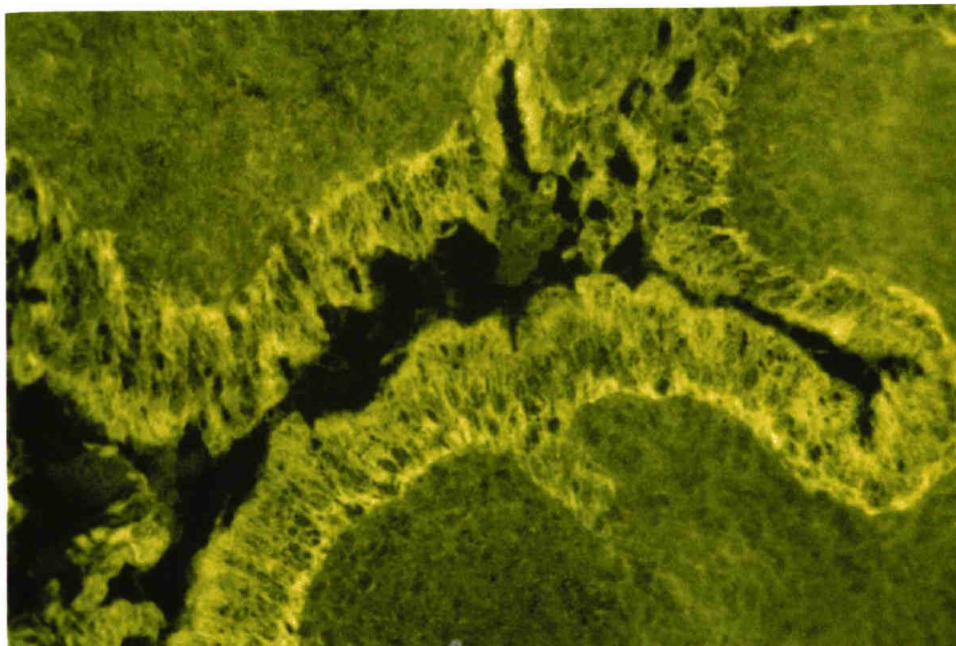


FIGURA 11: Sección de útero de rata inmadura a la que se administró una inyección subcutánea diaria de 44 nM de tamoxifeno durante tres días y se sacrificó al cuarto día. La tinción con 17β -E₂-6-CMO-BSA-FITC revela un descenso de la actividad ligadora de estrógenos con respecto a la mostrada en la figura 10. Esto marca la desaparición del efecto estrogénico del tamoxifeno y el inicio de su acción antiestrogénica (x282).

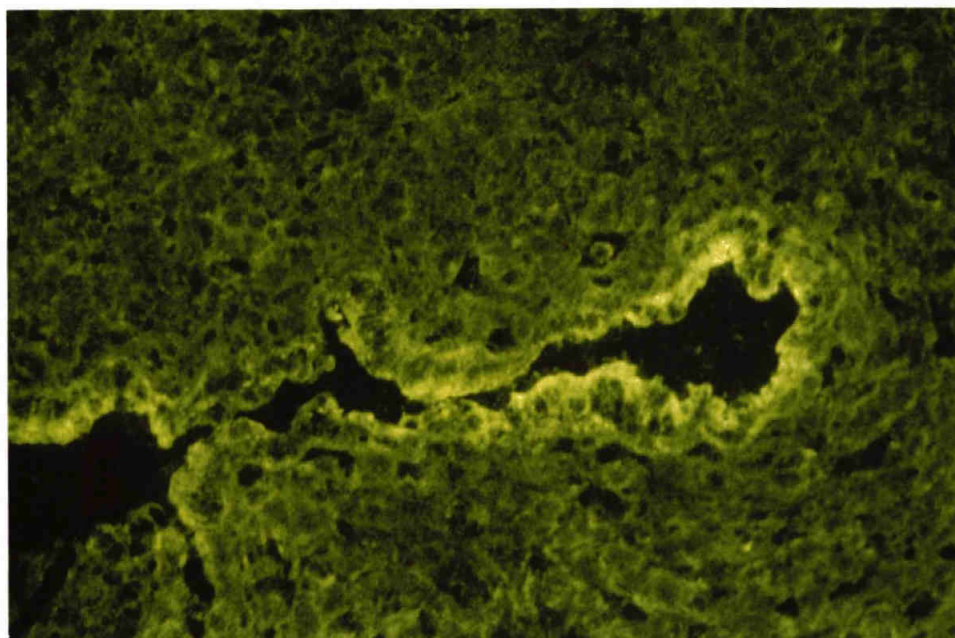


FIGURA 12: Sección de útero de rata inmadura a la que se administró una inyección subcutánea diaria de 44 nM de tamoxifeno durante cuatro días y se sacrificó al quinto día. La tinción con 17β -E₂-6-CMO-BSA-FITC demuestra que la actividad ligadora de estrógenos del epitelio luminal ha caído bruscamente con respecto a la mostrada en la figura 11. La acción antiestrogénica del tamoxifeno continúa su desarrollo (x88).

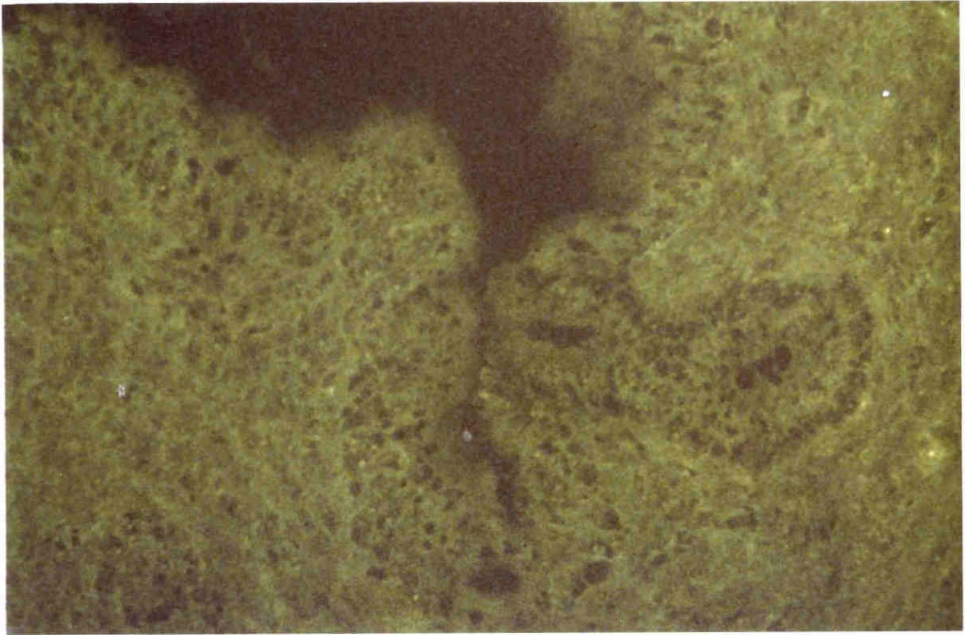


FIGURA 13: Sección de útero de rata inmadura a la que se administró una inyección subcutánea diaria de 44 nM de tamoxifeno durante 5 días y se sacrificó al sexto día. La tinción con 17β -E₂-6-CMO-BSA-FITC muestra que la actividad ligadora de estrógenos ha vuelto al nivel basal. La acción antiestrogénica del tamoxifeno es completa (x88).

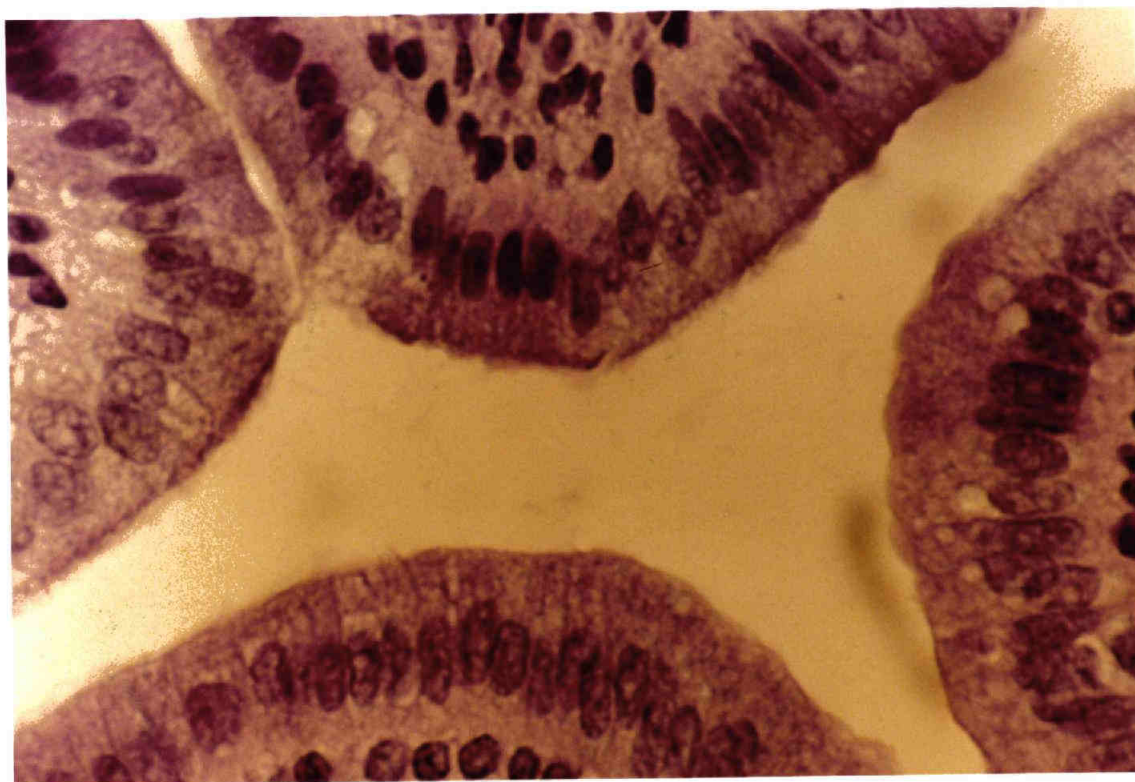


FIGURA 14A: Tinción con hematoxilina-eosina de útero de rata inmadura a la que se administró una inyección subcutánea diaria de 44 nM de tamoxifeno durante cinco días y se sacrificó al sexto día. Nótese la marcada hipertrofia e hiperplasia del epitelio uterino. Una sección consecutiva teñida con 17β -E₂-6-CMO-BSA-FITC (figura 13) revela que la actividad ligadora de estrógenos ha descendido a nivel basal, lo que demuestra que la acción antiestrogénica del tamoxifeno y su efecto sobre el crecimiento celular discurren a través de mecanismos distintos (x400).



FIGURA 14B: Tinción con hematoxilina-eosina de útero de rata inmadura a la que se administró suero salino. Nótese la atrofia del epitelio y compárese con la hiperplasia e hipertrofia presentes tras la administración de tamoxifeno ilustradas en la figura 14A (x400).

En resumen, los resultados obtenidos mostraron que la administración de 17β -estradiol o dietilestilbestrol induce un aumento sostenido de la actividad ligadora de estrógenos. La inyección repetida de antiestrógenos (tamoxifeno, nafoxidina o nitromifeno) tan sólo causa un aumento inicial transitorio de la actividad ligadora de estrógenos en las células del epitelio luminal, que luego se vuelven refractarias a ulteriores estímulos estrogénicos. La hidrocortisona se comporta como un esteroide neutro, en tanto en cuanto ni aumenta la actividad ligadora del citoplasma ni suprime el aumento inducido por los estrógenos.

5. D I S C U S I O N

5.1. ANTIESTROGENOS Y RECEPTORES DE ESTROGENOS

Debido a las grandes diferencias en las propiedades biológicas de los distintos antiestrógenos sintéticos no esteroideos, no es posible dar una definición simple de lo que es un antiestrógeno, como tampoco es probable que exista un mecanismo molecular único a través del cual estas drogas median su acción antagonista. De los cientos de antiestrógenos que se han sintetizado, el tamoxifeno y el clomifeno son los dos más utilizados en la clínica. Los dos anteriores, junto con la nafoxidina y el nitromifeno, son los que han sido objeto de más investigaciones, quizás no porque sean los más activos o los mejores instrumentos de estudio, sino porque los laboratorios farmacéuticos respectivos los han puesto a disposición de los investigadores. Básicamente, esas fueron las circunstancias que nos llevaron a seleccionar el tamoxifeno, la nafoxidina y el nitromifeno para nuestro estudio, entre los muchos antiestrógenos no esteroideos existentes.

Una de las interpretaciones más en boga del mecanismo de acción de los antiestrógenos no esteroideos es que éstos median su actividad antagonista a través de los recep-

tores de estrógenos. La difusión pasiva parece ser el mecanismo por el cual los antiestrógenos y sus metabolitos penetran las células, donde son retenidos merced a su unión con los receptores de estrógenos. La interacción con los receptores de estrógenos puede ser más débil (v.g., tamoxifeno) o más fuerte (v.g., monohidroxitamoxifeno) que la que se produce entre el receptor y el estradiol. El complejo antiestrógeno-receptor de estrógeno sufre el mismo fenómeno de activación que se ha descrito para el complejo estradiol-receptor de estrógeno. El complejo antiestrógeno-receptor citoplásmico es translocado al núcleo, donde forma un complejo antiestrógeno-receptor nuclear que interacciona con sitios de unión en la cromatina (aceptor). No se sabe si el aceptor del complejo antiestrógeno-receptor nuclear es el mismo que el del complejo estrógeno-receptor nuclear. El complejo estrógeno-receptor nuclear interacciona con la cromatina de tal manera que pone en marcha una serie de respuestas bioquímicas y fisiológicas que incluyen la reposición ("replenishment") de receptores citoplásmicos [59,72].

Según algunos autores, la interacción del complejo antiestrógeno-receptor a nivel del núcleo debe ser diferente de la mostrada por el complejo estrógeno-receptor, pues con el primero tan sólo ocurren algunas de las respuestas evocadas por el segundo. A altas dosis, los antiestrógenos inhiben la reposición ("replenishment") de receptores citoplásmicos, con

lo que desciende el nivel de estos receptores. Esto podría explicar algunos de los efectos antagonistas mostrados por los antiestrógenos no esteroideos [11,39].

Estos postulados sobre el mecanismo de acción de los antiestrógenos prestan un marco teórico a las observaciones prácticas de los efectos estrogénicos y antiestrogénicos causados por las drogas antiestrogénicas sintéticas no esteroideas.

El aumento del peso uterino en ratas jóvenes castradas se utilizó en el pasado como determinante de actividad estrogénica sistémica [5]. Luego se hizo obvio que la castración de animales era un paso innecesario y se comenzaron a usar ratas o ratones inmaduros [43]. Estos métodos se han aplicado al estudio de la actividad antiestrogénica sistémica mediante la administración simultánea del compuesto-problema y de un estrógeno.

Así pues, los métodos para valoración de antiestrógenos se han desarrollado a partir de métodos ya establecidos para valoración de estrógenos. Con los típicos estudios uterotróficos que se utilizan para demostrar el carácter agonista y antagonista de los antiestrógenos, se observa que aunque los antiestrógenos administrados por separado aumentan el peso uterino, la estimulación que provocan tras tres días

de administración es menor que la causada por una pequeña dosis de estradiol (0,125 microgramos). La administración concomitante de un antiestrógeno y de estradiol disminuye significativamente la respuesta uterina al estradiol. En base a tales observaciones, los antiestrógenos no esteroideos están considerados como agonistas parciales y antagonistas parciales de la acción estrogénica en el útero de la rata [18,36,16, 17].

Los resultados de nuestro estudio demuestran que este patrón de fenómenos agonistas-antagonistas puede seguirse a nivel celular mediante la técnica histoquímica para determinación de receptores de estrógenos, expresado en forma de estimulación y represión de la síntesis de una(s) sustancia(s) ligadora(s) de estrógenos en las células luminales del epitelio uterino de la rata.

En efecto, la inducción de la síntesis de receptores de estrógenos comenzó a manifestarse a las 24 horas del inicio de la administración de compuestos estrogénicos (estradiol o dietilestilbestrol) o antiestrogénicos (tamoxifeno, nafoxidina o nitromifeno). A las 48 horas, la actividad ligadora de estrógenos alcanzó su punto máximo (un día más tarde en el caso de la nafoxidina), y a partir de ahí las acciones de las drogas estrogénicas y de las drogas antiestrogénicas

divergieron: los estrógenos continuaron la estimulación de la síntesis de sitios receptores en fase de plateau, en tanto que los antiestrógenos ocasionaron una reducción brusca en los niveles de receptores citoplásmicos. Estos hallazgos histoquímicos ilustran el punto de inflexión de la acción de las drogas antiestrogénicas, cuando el efecto agonista se torna antagonista.

El efecto antagonista de los antiestrógenos no esteroideos se puso también de manifiesto cuando éstos neutralizaron la capacidad del estradiol para inducir la síntesis de sitios receptores de estrógenos en el útero de la rata. El suero salino y la hidrocortisona se manifestaron incapaces de antagonizar este efecto.

Es interesante la comparación de los efectos del tamoxifeno sobre el útero de la rata cuando se administra una sola inyección de 44 nM en lugar de múltiples inyecciones. Hemos observado que el nivel máximo de actividad ligadora de estrógenos en el citoplasma de las células del epitelio luminal ocurrió a las 48 horas tras la inyección única, lo que es muy similar a lo que tuvo lugar con inyecciones múltiples. En cambio, con la inyección única la actividad ligadora de estrógenos pareció disminuir más gradualmente, de modo que 4-5 días después de la inyección aún podían observarse células lu-

minales que exhibían intensa actividad ligadora de estrógenos en su citoplasma. Las ratas que recibieron una inyección diaria durante tres o cuatro días resultaron ser negativas para la captación de estrógenos 24 horas tras la última inyección. Se ha postulado que la capacidad de los antiestrógenos para estimular la reposición ("replenishment") de la población citoplásmica de receptores de estrógenos constituiría el mecanismo de sus efectos antagonistas [37,22,71]. Probablemente un mecanismo similar es el que opera en la supresión de su propia acción estrogénica inicial.

En cuanto a los antiestrógenos esteroideos, investigaciones histoquímicas previas [52] han demostrado que la progesterona no induce actividad ligadora de estrógenos en el epitelio uterino, aunque sí produce bloqueo de la síntesis de receptores citoplásmicos inducida por estradiol.

En el presente estudio, la hidrocortisona se mostró como un esteroide neutro, al no demostrar actividad estrogénica ni antiestrogénica.

Estos fenómenos se observaron previamente con el método bioquímico [8] y los hemos reproducido ahora mediante el método histoquímico.

Se podría argüir que las inyecciones repetidas de antiestrógenos simplemente habrían saturado los sitios receptores ya presentes en las células epiteliales y, por lo tanto, estos sitios receptores citoplásmicos, saturados por los antagonistas, no podrían demostrarse histoquímicamente. Este argumento es fácilmente rebatible si tenemos en cuenta que todos los estrógenos y antiestrógenos estudiados causaron un aumento inicial de la actividad ligadora de estrógenos del citoplasma. Esta observación no es consistente con una simple acción de bloqueo físico. Además, la administración diaria continua de dosis equimolares de estradiol o dietilestilbestrol no condujo a la disminución de la actividad ligadora de estrógenos en el citoplasma.

Los sitios de unión intracelulares de las células efectoras ricas en receptores de estrógenos, especialmente aquellos que están firmemente unidos al citoesqueleto, probablemente no pueden nunca saturarse in vivo con estrógenos o antiestrógenos inyectados subcutáneamente en un área tan alejada del útero, debido a que la concentración de estos productos químicos en la vecindad de las células efectoras vendrá determinada por la concentración de molécula portadora en el líquido intersticial y en el plasma, y no por la cantidad absoluta inyectada. En los ensayos sobre citosoles, la homogeneización del tejido solubiliza los sitios receptores

De esta forma, los receptores quedan disponibles para la interacción con estrógenos que previamente no tenían acceso a ellos. Así pues, los resultados finales de la técnica bioquímica podrían proporcionar un valor artificialmente elevado de sitios citoplásmicos ocupados.

La segunda pregunta que puede surgir es si los sitios de unión inducidos o suprimidos por estas hormonas o antihormonas podrían ser proteínas ligadoras no específicas. Esta pregunta ya quedó respondida en experimentos previos en los que la unión de estradiol fluorescente a las células epiteliales fue completamente bloqueada por dietilestilbestrol. Además, la unión de estradiol fluorescente a los sitios receptores resiste lavados prolongados en soluciones libres de ligando. Por consiguiente, se trata de sitios receptores de alta afinidad y alta especificidad para los estrógenos. La clasificación como tipo I de los sitios de unión demostrados en este trabajo sería prematura con nuestro actual estado de conocimientos. Igualmente difícil de evaluar es la posibilidad de que estos receptores puedan translocarse al núcleo in vivo.

5.2. ANTIESTROGENOS Y CRECIMIENTO CELULAR

La síntesis celular de esta substancia ligadora de estrógenos puede que no esté acoplada al proceso de crecimiento celular en general. Según las observaciones de este trabajo, tanto los estrógenos como los antiestrógenos parecen promover en el epitelio luminal del útero de la rata una hipertrofia e hiperplasia que, en los animales tratados con antiestrógenos, persiste incluso cuando la actividad ligadora de estrógenos no es ya detectable.

Otros investigadores han señalado que, tras un corto período de estrogenicidad, el tamoxifeno actúa como un antiestrógeno impidiendo la unión del estradiol a sus receptores, en tanto que continúa el aumento de peso de los órganos efectores [55].

En algunos experimentos, el tamoxifeno produjo un aumento del tamaño de las células del epitelio luminal, sin un incremento significativo en la división celular. Por el contrario, la hiperplasia provocada por el benzoato de estradiol se acompañó de un gran aumento de la división celular

[10]. En consecuencia, se ha llegado a proponer que la demostración de la inhibición de la síntesis de DNA o de la división celular podría ser tomada como punto de referencia para valorar el efecto antiestrogénico de una droga. En nuestro estudio, en cambio, la administración de tamoxifeno resultó en un alto índice mitótico (véase figura 14A), muy similar al exhibido por la hiperplasia exhibida por benzoato de estradiol.

La disminución de los receptores citoplásmicos tras un período inicial de inducción, y la estimulación del crecimiento celular en respuesta a la administración de tamoxifeno, constituyen dos hallazgos principales de nuestro estudio. Tal como ilustramos diagramáticamente en la figura 15, ambas encajan en el modelo actual del mecanismo de acción de los antiestrógenos no esteroideos propuesto por Katzenellenbogen [39]. En cualquier caso, conviene recordar que las explicaciones de que disponemos en la actualidad sobre el mecanismo de la acción antiestrogénica son en buena medida especulativas y que, en este campo, los conceptos más elementales son aún objeto de debate.

La heterogeneidad del sistema de receptores de estrógenos, tanto en lo que se refiere a su función como a su conformación molecular, ha sido resaltada por numerosos autores [9,19,76,82]. Debido a la complejidad de la trama cito-

esquelética, el citoplasma no se puede concebir como un medio uniforme en el que el complejo estrógeno-receptor difunde libremente. Probablemente son varias las proteínas a las que sucesivamente se une la molécula de esteroide hasta que finalmente alcanza el núcleo. Actualmente, desconocemos qué porcentaje de sustancia ligadora citoplásmica es activada funcionalmente in vivo por estrógenos y translocada al núcleo celular [33].

Para hacer más patente la complejidad del problema, citemos dos publicaciones recientes en las que se utilizaron anticuerpos monoclonales contra las proteínas receptoras de estrógenos. En la primera de ellas, los anticuerpos tiñeron el citoplasma de las células efectoras [6], en tanto que en la segunda se localizaron exclusivamente en el núcleo [68].

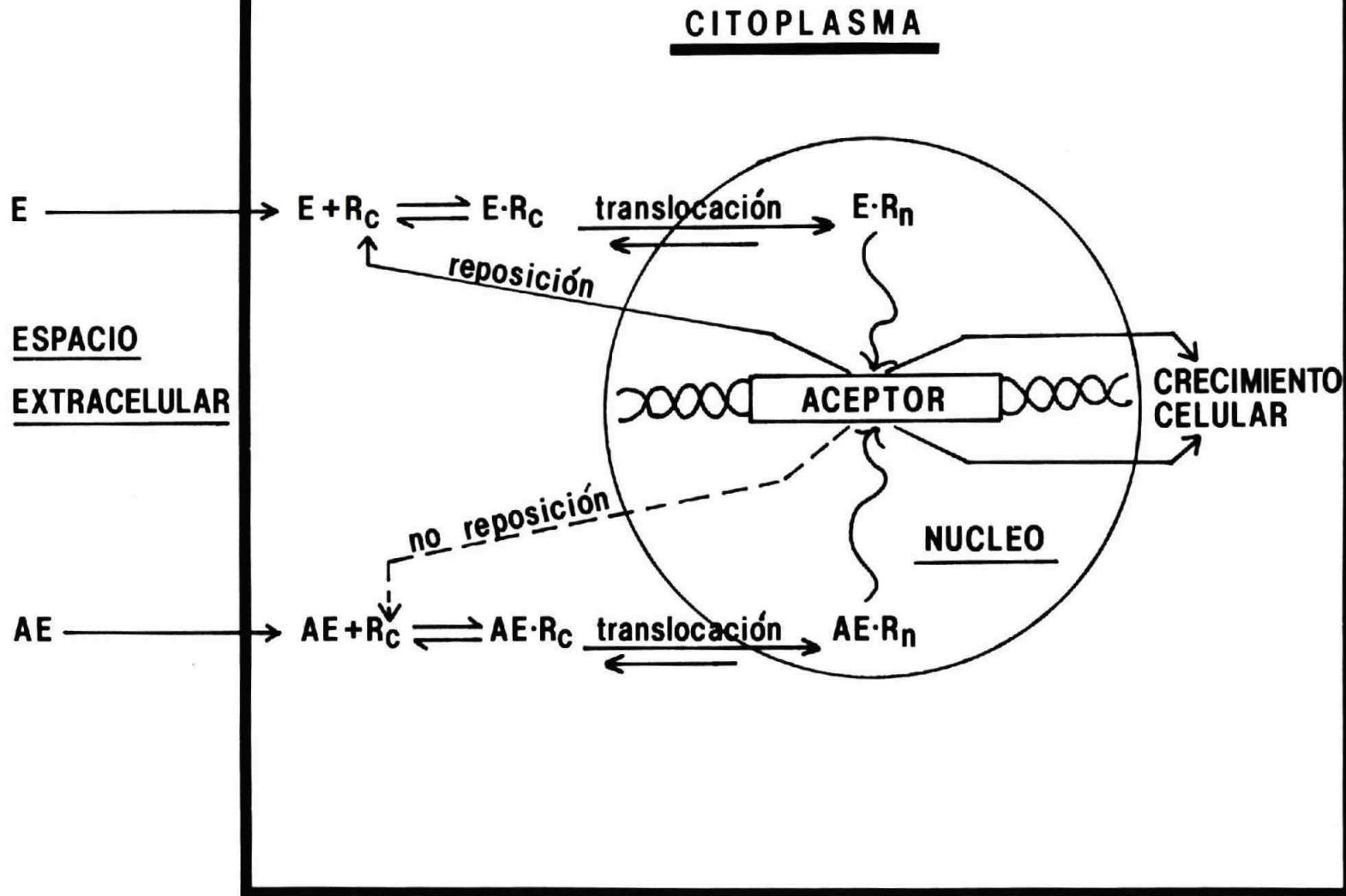


FIGURA 15: Modelo del mecanismo de la actividad estrogénica y antiestrogénica a nivel celular. Los estrógenos (E) y antiestrógenos (AE) interaccionan con los receptores citoplásmicos (R_c), formando los complejos estrógeno-receptor citoplásmico (E·R_c) y antiestrógeno-receptor citoplásmico (AE·R_c). Tras la translocación al núcleo, se forman los complejos estrógeno-receptor nuclear (E·R_n) y antiestrógeno-receptor nuclear (AE·R_n). Mediante su interacción con la porción aceptora de la cromatina, el complejo E·R_n inicia la reposición ("replenishment") de receptores citoplásmicos y el crecimiento celular, en tanto que el complejo AE·R_n estimula el crecimiento celular sin reponer los receptores citoplásmicos.

5.3. NATURALEZA DE LA SUBSTANCIA LIGADORA DE ESTROGENOS VISUALIZADA CON LA TECNICA HISTOQUIMICA

Joyce, en 1982 [38], sintetizó el conjugado de estradiol fluorescente en su laboratorio y comparó su afinidad por las proteínas receptoras de estrógenos en citosoles con la manifestada por el estradiol. Estos autores sostuvieron que el $17\beta\text{-E}_2\text{-6-CMO-BSA-FITC}$ tiene una baja afinidad relativa por los receptores de estrógenos y concluyeron que el método histoquímico es incapaz de detectar los sitios receptores de estrógenos. Sin embargo, otros investigadores [69], en experimentos de parecidas características, demostraron que la afinidad de este conjugado hacia los receptores citoplásmicos se mantiene dentro de límites apropiados.

A diferencia de los estudios en citosoles mencionados en el párrafo precedente, en los experimentos en que se emplean secciones de tejido obtenidas mediante criostato, la afinidad relativa del $17\beta\text{-E}_2\text{-6-CMO-BSA-FITC}$ con una razón molar esteroide:proteína de más de 20:1 alcanza los niveles de afinidad exhibidos por el dietilestilbestrol [49].

La causa de la diferencia en la afinidad del conjugado macromolecular de estradiol fluorescente por los sitios receptores en secciones de tejido y por los sitios receptores libres no está clara. Quizás por sus distintas características hidrófilas, eléctricas y de conformación, el radical de estradiol asociado a una molécula de proteína portadora no se une a un receptor aislado y libre en el citosol de forma tan estrecha como lo hace una molécula de estradiol libre. En cambio, en las secciones de tejido, los sitios receptores no estarían aislados, sino formando agregados en el citoplasma; la unión del conjugado macromolecular a uno de estos agregados haría a los sitios receptores presentes en él inaccesibles para el estradiol radioactivo libre, que además vería obstaculizada su penetración del tejido [52].

Varios autores [12,13] han criticado el método histoquímico de detección de receptores de estrógenos basados en la alta concentración de ligando que se emplea en la solución de tinción, que resulta ser muy superior a la utilizada en los análisis bioquímicos. De hecho, esta es una práctica corriente y aceptable en el campo de la histoquímica enzimática [65]. Un denominador común de las técnicas histoquímicas en general es que las secciones son sometidas a lavado exhaustivo en suero salino tras haber sido teñidas. Esta acción reduce la concentración de ligandos libres a niveles despreciables. Tras el lavado,

el ligando unido a la sección de tejido tiene la oportunidad de difundir libremente hacia una solución de suero salino cuya concentración de derivado de estradiol es mínima, y con ello se diferencia una situación de baja afinidad de una de alta afinidad [50].

Los mismos bioquímicos [20] han hecho uso de esa práctica en sus estudios para la diferenciación de los receptores de estrógenos tipo I y tipo II. Eriksson, en 1978 [20], describió dos clases de sitios ligadores de estradiol en el útero de la rata inmadura. Los sitios tipo I representarían los receptores de estrógenos "clásicos", que ligan estradiol con alta afinidad y baja capacidad. Tras la administración de estrógeno, los sitios receptores tipo I serían translocados del citoplasma al núcleo [31], donde el complejo estrógeno-receptor seguramente interacciona con sitios aceptores [62] antes del inicio de los fenómenos de transcripción asociados con la estimulación estrogénica del crecimiento uterino. Por el contrario, los sitios citoplásmicos tipo II ligan estradiol con una capacidad mayor y una afinidad menor que los receptores de estrógenos "clásicos" [7,20]. Así pues, los sitios tipo II permanecen en el citoplasma tras la administración de estrógeno, incluso aunque los niveles nucleares de sitios tipo II aumentan en respuesta a esta hormona. La significación biológica de los receptores tipo II, nucleares o citoplásmicos, se desconoce. El aspecto que nos interesa en esta discusión es que mediante el uso de

gradientes de sacarosa, Eriksson [20] ha demostrado que el estradiol se disocia rápidamente de los sitios receptores tipo II cuando se reduce la concentración de ligando libre en solución a un nivel despreciable.

Los problemas habidos con los experimentos de bloqueo constituyen el frente en que el método bioquímico ha sido objeto de mayor ataque. Numerosas dificultades han surgido al intentar bloquear la tinción de las células efectoras por el conjugado de estradiol fluorescente mediante un exceso de estradiol o dietilestilbestrol. A menudo ocurre que las células incubadas en una solución de estradiol macromolecular fluorescente en presencia de un competidor (estradiol o dietilestilbestrol libre) muestran una intensidad de fluorescencia más alta incluso que la revelada por células incubadas en una solución de estradiol macromolecular fluorescente sin competidores [15,45]. Los expertos en microscopía de fluorescencia [78] han descrito el denominado "fenómeno de transferencia de energía". Según esta teoría, cuando el conjugado de estradiol fluorescente y un competidor (estradiol o dietilestilbestrol libre) se dirigen al mismo grupo de sitios de unión en circunstancias en las que el bloqueo competitivo no es total, la energía de excitación electrónica absorbida por el competidor no fluorescente puede transferirse a las moléculas fluorescentes adyacentes, con lo que la intensidad de fluorescencia observada es mayor que la producida por los radicales de fluoresceína por se-

parado. Este curioso fenómeno se puede poner de manifiesto mediante incubación de células MCF-7 en una solución que contenga 17β -E₂-6-CMO-BSA-FITC y dietilestilbestrol, con subsiguiente valoración de la intensidad de fluorescencia de las células mediante citometría de flujo. Así pues, para producir un bloqueo competitivo completo, Lee [49] ha propuesto que las secciones de tejido se preincuban con competidor en alta concentración antes de añadir el conjugado macromolecular de estradiol fluorescente a la mezcla.

La conformación estructural y la concentración de los sitios receptores de estrógenos son distintas según los receptores se mantengan fijos en una sección de tejido o estén libres en el sobrenadante de un homogeneizado. La concentración de proteínas receptoras en las secciones de tejido con que trabaja la técnica histoquímica es mucho mayor que la concentración presente en citosoles. Las diferencias entre los receptores en secciones de tejido y los receptores en citosoles recuerdan las desigualdades entre los sistemas enzimáticos inmovilizados y los sistemas enzimáticos solubles: los estrógenos encuentran mayor dificultad en la unión a sus receptores cuando éstos están fijos en una preparación histoquímica y las enzimas inmovilizadas tienen menor accesibilidad a su substrato [25]. Por lo tanto, no debe sorprendernos que en la técnica histoquímica se requiera una alta concentración

de ligando para saturar sitios receptores que son poco accesibles.

Cuando se analizan los puntos conflictivos que presentan los parámetros cinéticos de los métodos histoquímico y bioquímico, muchos de ellos pueden atribuirse a la diferencia en la conformación y concentración de los receptores en los dos tipos de preparaciones. Es posible que los ensayos en citosoles sean capaces de medir tan sólo proteínas receptoras solubles, que pueden categorizarse como tipo I, tipo II, tipo III, etc, de acuerdo a su comportamiento en cuanto a la unión de ligando in vitro [13]. Los ensayos histoquímicos, por otra parte, pueden localizar los receptores celulares de estrógenos en forma relativamente soluble y alta densidad. Una célula efectora tiene que contener un elevado número de sitios receptores de alta afinidad para que puede ser visualizada histoquímicamente, tal como ocurre con las células del epitelio luminal del útero de la rata y las células epiteliales de los ductos mamarios humanos. Puede que la técnica bioquímica no reconozca tales sitios receptores.

Según el concepto tradicional, la célula es simplemente una bolsa repleta de líquido en el que flota el núcleo. Una vez que se rompe esta bolsa, el líquido y su contenido escaparían libremente; por tanto, nada quedaría del citoplasma de las células presentes en una sección de criostato. Sin em-

bargo, hallazgos recientes en el campo de la biología celular han proporcionado pruebas convincentes de que el citoplasma es un compartimiento altamente organizado. Muchas moléculas fisiológicamente activas, entre las que probablemente se encuentran las enzimas y los receptores específicos, pueden unirse al citoesqueleto citoplásmico [80,81]. Por consiguiente, es bastante probable que los métodos empleados en el ensayo bioquímico puedan detectar tan sólo una pequeña fracción de las sustancias receptoras, que sería aquélla que es fácilmente extractable en el sobrenadante del homogeneizado tisular.

Además de la diferencia potencial en las propiedades físicas de los receptores solubles y los receptores unidos a tejido, puede que existan diferencias químicas. En numerosos artículos se ha concluido que las proteínas receptoras de estrógenos son muy lábiles en solución. En cambio, los receptores intracelulares parecen ser relativamente estables en secciones de criostato mantenidas durante varias horas a 4°C. Este hecho indica que el proceso de desnaturalización ocurre a distinto ritmo para los dos tipos de receptores. En el pasado se han demostrado diferencias parecidas entre las enzimas solubles y las unidas a células. Por ejemplo, una solución de glutaraldehído al 1% inactiva de forma irreversible la aminotransferasa de aspartato soluble o purificada, mientras que la misma enzima, cuando aún está unida a las células del hígado de la rata, muestra una actividad resistente al mismo trata-

miento, incluso en secciones de criostato.

Por otra parte, se ha demostrado [49,50] que los receptores de estrógenos en secciones de tejido se unen a sus ligandos con gran afinidad, capacidad de unión limitada, especificidad hormonal y especificidad tisular. Estos son los criterios requeridos para categorizar una sustancia como receptora de esteroide [14]. Según Lee [49], el 17β -E₂-6-CMO-BSA-FITC se mostró como un efectivo competidor del ³H-estradiol, impidiendo la unión de este último a los sitios receptores en preparaciones de tejido. Este autor también midió los receptores de estrógenos en secciones de cáncer de mama mediante la técnica de unión de ligandos radiactivos y la expresó en fentomoles de hormona ligada por mil células cancerosas.

Además, la técnica histoquímica ha revelado que la inducción de actividad ligadora de estrógenos en el citoplasma de las células luminales del epitelio uterino de la rata coincide con el período durante el cual el contenido de proteínas receptoras citoplásmicas alcanza su máximo de acuerdo con la determinación de receptores en citosoles uterinos mediante ensayo bioquímico [50]. Recientemente, se ha demostrado que el patrón de modulación de receptores citoplásmicos bajo la influencia de estrógenos [51] y otras hormonas esteroideas no estrogénicas [52] es consistente con los datos suministra-

dos por el análisis bioquímico de citosoles uterinos.

La exploración en el presente estudio de los efectos estrogénicos y antiestrogénicos de los antiestrógenos sintéticos no esteroideos ha proporcionado hallazgos histoquímicos concordantes con los datos acumulados en la literatura sobre estas drogas, y nos ha llevado a considerar el método histoquímico como alternativa a los procedimientos poco exactos y enormemente tediosos que se aplican en la actualidad a la determinación de la actividad estrogénica o antiestrogénica sistémica.

Múltiples investigadores que han usado la técnica histoquímica para el estudio del status receptor de tejidos cancerosos han proporcionado resultados reproducibles. Cuando el análisis se llevó a cabo en condiciones óptimas y por manos experimentadas, los resultados se mostraron de acuerdo con los obtenidos por la técnica bioquímica en el 75-90% de los casos [4,21,47,50,58,64,66,77,27].

Además, estudios clínico-patológicos preliminares están mostrando una correlación positiva entre status receptor determinado histoquímicamente y respuesta a la terapia endocrina [3,67,42,83]. En las más reciente de estas publicaciones, Lampertico y Stagni [42] analizaron una serie de 356 pacientes

del norte de Italia con cáncer de mama y observaron la ausencia de signos clínicos de enfermedad en la mayoría de los casos ER-positivos que, tras tratamiento quirúrgico, fueron sometidos a manipulación endocrina. Por el contrario, tanto los casos ER-positivos no tratados con endocrinoterapia como las pacientes ER-negativas mostraron en su mayoría progresión de la enfermedad. En la actualidad, bajo el patrocinio de la Sociedad Italiana de Patólogos de Hospital, un gran número de patólogos y clínicos italianos están trabajando en la verificación a gran escala del valor clínico de este método.

Finalmente, pudiera ser que los métodos bioquímico, autorradiográfico e histoquímico estén contemplando distintas piezas de un mismo rompecabezas, y que los datos suministrados por cada uno de ellos contribuyan a la comprensión del complicado sistema receptor de los estrógenos. En última instancia, será la investigación clínica la que determine cuál de estas modalidades es la más efectiva en la selección de pacientes para terapia endocrina.

6. CONCLUSIONES

- 6.1. El método histoquímico para determinación de receptores de estrógenos detecta un aumento sostenido en la síntesis de sustancias ligadoras de estrógenos en el citoplasma de las células del epitelio luminal de la rata en respuesta a la administración repetida de compuestos estrogénicos como el estradiol y el dietilestilbestrol.
- 6.2. La administración de antiestrógenos (tamoxifeno, nafoxidina o nitromifeno) produce un aumento inicial y transitorio de la actividad ligadora de estrógenos, que luego retorna al nivel basal y permanece en él durante todo el resto del tratamiento antiestrogénico.
- 6.3. Cuando el tamoxifeno, la nafoxidina o el nitromifeno se administran previamente al estradiol o al dietilestilbestrol, no se registra ningún aumento en la actividad ligadora de estrógenos.
- 6.4. Los datos obtenidos en nuestro estudio son concordantes con las observaciones proporcionadas por la aplicación a citosoles uterinos del método bioquímico del carbón activo cubierto con dextrano; por tanto, podemos concluir que la sustancia ligadora observada por el método histoquímico está íntimamente relacionada con los receptores

de estrógenos o constituye parte del sistema receptor de los estrógenos.

- 6.5. Si, tal como hemos creído demostrar en este trabajo, el método histoquímico realmente detecta una parte al menos del sistema receptor, debemos considerarlo como una alternativa válida al actualmente imperante método bioquímico para determinación de receptores de estrógenos en el cáncer de mama humano.
- 6.6. La síntesis celular de la substancia ligadora de estrógenos no parece estar acoplada al proceso de crecimiento celular en general, puesto que tanto el estradiol como el tamoxifeno producen hipertrofia de las células del epitelio uterino que persiste cuando el tratamiento previo con tamoxifeno inhibe la síntesis de la substancia ligadora de estrógenos inducida por la administración de estradiol.
- 6.7. La técnica histoquímica para determinación de receptores de estrógenos constituye un método válido para la detección y estudio de compuestos con actividad estrogénica o antiestrogénica.
- 6.8. Demostradas las bases científicas del método histoquímico en este y otros trabajos, se necesitan estudios de corre-

lación clinicopatológica a gran escala que determinen la validez clínica de la técnica histoquímica y la comparen con la del método bioquímico.

7. R E F E R E N C I A S

B I B L I O G R A F I C A S

- [1] Allegra JC, Lippman ME, Thompson EB, Simon R, Barlock A, Green L, Huff KK, Do HMT, Aitken SC, Warren R: Relationship between the progesterone, androgen and glucocorticoid receptor and response rate to endocrine therapy in metastatic breast cancer. *Cancer Res* 39:1973-1979, 1979.
- [2] Beatson GT: On the treatment of inoperable cases of carcinoma of the mamma: suggestions for a new method of treatment, with illustrative cases. *Lancet* 2:104-107, 162-165, 1896.
- [3] Berger G, Frappart L, Depardon Y, Bremond A: Etude histochimique des récepteurs d'oestradiol et de la progestérone à l'aide des complexes de Lee dans 40 cancers mammaires. Corrélation avec la différenciation et le type histopathologique. *Int J Breast Mammary Pathol. Senologia* 1:19-23, 1982.
- [4] Böhm MP, Binder M, Czerwenka K: Evaluation of biochemical and staining properties of direct and indirect histochemical methods for detection of steroid binding proteins. *Berichte der Österreichischen Gessellschaft für kinische Chemie* 4:201-205, 1981.

- [5] Bülbring E, Burn JH: Sympathetic dilator fibers in muscles of cat and dog. *J Physiol* 85:320-333, 1935.

- [6] Ciocca DR, Adams DJ, Bjercke RJ, Sledge GW Jr, Edwards DP, Chamness GC, McGuire WL: Monoclonal antibody storage conditions and concentration effects on immunohistochemical specificity. *J Histochem Cytochem* 31:691-698, 1983.

- [7] Clark ER, Dix CJ, Jordan VC, Prestwich J, Sexton S: A comparison at the cellular and subcellular levels of the effects of tamoxifen and oestradiol benzoate on the immature rat uterus. *Br J Pharmacol* 62:442P-443P, 1978.

- [8] Clark JH, Hsueh AJW, Peck EJ Jr: Regulation of estrogen receptor replenishment by progesterone. *Ann NY Acad Sci* 286:161-169, 1977.

- [9] Clark JH, Markaverich B, Upchurch S, Eriksson H, Hardin JW, Peck EJ Jr: Heterogeneity of estrogen binding sites: relationship to estrogen receptors and estrogen responses. *Recent Progr Horm Res* 36:89-93, 1980.

- [10] Clark JH, McCormack SA: Clomid or nafoxidine administered to neonatal rats causes reproductive tract abnormalities. *Science* 197:164-165, 1977.

- [11] Clark JH, Peck EJ Jr, Anderson JN: Oestrogen receptors and antagonism of steroid hormone action. *Nature* 251:446-448, 1974.
- [12] Chamness GC, McGuire WL: Questions about histochemical methods for estrogen receptors. *Arch Pathol Lab Med* 106:53-54, 1982.
- [13] Chamness GC, Mercer WD, McGuire WL: Are histochemical methods for estrogen receptors valid? *J Histochem Cytochem* 28:792-793, 1980.
- [14] Chan L, O'Malley BW: Steroid hormone action: recent advances. *Ann Int Med* 89:694-700, 1978.
- [15] Dandliker WB, Levison SA, Brawn RJ: Hormone binding by cells and cell fragments as visualized by fluorescent microscopy. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 14:103-110, 1976.
- [16] Dix CJ, Jordan VC: Subcellular effects of monohydroxytamoxifen in the rat uterus: steroid receptors and mitoses. *J Endocrinology* 85:393-404, 1980.
- [17] Emmens CW: Early work on antioestrogens, pp 17-30 en: Sutherland RL, Jordan VC, ed. *Non-Steroidial Antioestrogens*. Sydney, Academic Press, 1981.

- [18] Emmens CW: Compounds exhibiting prolonged antiestrogenic and anti-infertility activity in mice and cats. *J Reprod Fert* 26:175-182, 1971.
- [19] Eriksson HA, Hardin JW, Markaverich B, Upchurch S, Clark JH: Estrogen binding in the rat uterus: heterogeneity of sites and relation to uterotrophic response. *J Steroid Biochem* 12:121-125, 1980.
- [20] Eriksson H, Upchurch S, Hardin JW, Peck EJ Jr, Clark JH: Heterogeneity of estrogen receptors in the cytosol and nuclear fractions of the rat uterus. *Biochem Biophys Res Commun* 81:1-7, 1978.
- [21] Eusebi V, Ceraoli PT, Guidelli-Guidi S, Grilli S, Bussolati G, Azzopardi JG: A two-stage immunocytochemical method for oestrogen receptor analysis: correlation with morphological parameters of breast carcinomas. *Tumori* 67:315-323, 1981.
- [22] Ferguson ER, Katzenellenbogen BS: A comparative study of antiestrogen action: temporal patterns of antagonism of estrogen-estimated uterine growth and effects on estrogen receptor levels. *Endocrinology* 100:1242-1251, 1977.
- [23] Folca PJ, Glascock RF, Irvine WT: Studies with lithium-labeled hexoestrol in advanced breast cancer. *Lancet* 2:796-798, 1961.

- [24] Gambacorta M: Interpretazione dei risultati e formulazione della risposta. *Istocitopatologia* 6, 1984 (en prensa).
- [25] Goldstein L: Kinetic behavior of immobilized enzyme systems. *Methods in Enzymology* 44:397-402, 1976.
- [26] Hanna WM, Mobbs BG: Estrogen binding sites in human breast cancer - correlation of the histochemical and biochemical technique. *J Steroid Biochem* 19:358, 1983.
- [27] Hanna WM, Ryder DE, Mobbs BG: Cellular localization of estrogen binding sites in human breast cancer. *Am J Clin Pathol* 77:391-395, 1982.
- [28] Harris HS, Spratt JS: Bilateral adrenalectomy in metastatic mammary cancer: an analysis of sixty-four cases. *Cancer* 23:145-151, 1969.
- [29] Heuson JC, Longeval E, Mattheiem WH, Deboel MC, Sylvester RJ, Leclercq G: Significance of quantitative assessment of estrogen receptors for endocrine therapy in advanced breast cancer. *Cancer* 39:1971-1977, 1977.
- [30] Horwitz KW, McGuire WL: Specific progesterone receptors in human breast cancer. *Steroids* 25:497-505, 1975.
- [31] Jensen EV: Some newer endocrine aspects of breast cancer. *N Eng J Med* 291:1252-1253, 1974.

- [32] Jensen EV, Block GE, Smith S, Kyser K, DeSombre ER: Estrogen receptors and breast cancer response to adrenalectomy. Natl Cancer Inst Monogr 34:55-70, 1971.
- [33] Jensen EV, DeSombre ER: Estrogen-receptor interaction. Science 182:126-134, 1973.
- [34] Jetha N, Godolphin W: Unable to obtain good correlation. Am J Clin Pathol 77:771-775, 1982.
- [35] Johansson H, Terenius L, Thorén L: The binding of 17β - estradiol to human breast cancers and other tissues in vitro. Cancer Res 30:692-698, 1970.
- [36] Jordan VC: Prolonged antiestrogenic activity of ICI 46,474 in the ovariectomized mouse. J Reprod Fert 42:251-258, 1975.
- [37] Jordan VC: Antiestrogenic and antitumor properties of tamoxifen in laboratory animals. Cancer Treat Rep 60:1409-1419, 1976.
- [38] Joyce BC, Nicholson RI, Morton MS, Griffiths K: Studies with steroid-fluorescein conjugates on oestrogen target tissues. Eur J Cancer Clin Oncol 18:1147-1151, 1982.
- [39] Katzenellenbogen BS, Bhakoo HS, Ferguson ER, Lan NC, Tatee T, Tsai TL, Katzenellenbogen JA: Estrogen and antiestrogen action in reproductive tissue and tumors. Recent Progr Horm Res 35:259-300, 1979.

- [40] King RJB, Barnes DM, Hawkins RA, Leake RE, Maynard PV, Millis RM, Roberts MM: Measurement of oestrogen receptors by five institutions on common tissue samples, pp 7-15 en King RJB, ed: Steroid Receptor Assays in Human Breast Tumors: Methodological and Clinical Aspects, Cardiff, Alpha Omega Publishing, 1979.
- [41] Lampertico P: Determinazione dei recettori ormonali in 13 laboratori. Istiocitopatologia 6, 1984 (en prensa).
- [42] Lampertico S, Stagni F: Clinicopathological correlation in primary, recurrent and metastatic tumors with histochemically-determined hormone receptors, en Pertschuk LP, Lee SH, ed: Morphologic Localization of Putative Steroid Receptors. Techniques and Applications, Boca Ratón, CRC Press, 1984 (en prensa).
- [43] Lauson HD, Heller OG, Golden JB, Sevringhaus EL: Immature rat in assay of estrogenic substances, and comparison of estradiol, estrone and estriol. Endocrinology 24:35-44, 1939.
- [44] Leclercq G, Heuson JC: Perspectives in cancer research: therapeutic significance of sex steroid receptors in the treatment pf breast cancer. Eur J Cancer 13:1205-1215, 1977.

- [45] Lee SH: Cytochemical study of estrogen receptors in human mammary cancer. *Am J Clin Path* 70:197-203, 1978.
- [46] Lee SH: Cancer cell estrogen receptors of human mammary carcinoma. *Cancer* 44:1-12, 1979.
- [47] Lee SH: Cellular estrogen and progesterone receptors in mammary carcinoma. *Am J Clin Path* 73:323-329, 1980.
- [48] Lee SH: Estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *Conn Med* 44:622-629, 1980.
- [49] Lee SH: The histochemistry of estrogen receptors. *Histochem* 71:491-500, 1981.
- [50] Lee SH: Uterine epithelial and eosinophil estrogen receptors in rats during the estrous cycle. *Histochem* 74:443-448, 1982.
- [51] Lee SH: Estrogen-primed immature rat uterus - a tissue control for histochemical estrogen receptor assay. *Am J Clin Path* 79:484-486, 1983.
- [52] Lee SH: Validity of a histochemical estrogen receptor assay-supported by visualization of cellular response to steroid manipulation. *J Histochem Cytochem*, 1984 (en prensa).

- [53] Lippman ME, Allegra JC: Estrogen receptors and endocrine therapy of breast cancer. *N Eng J Med* 299:930-933, 1978.
- [54] Lunetta Q: Presupposti per una corretta interpretazione dei risultati. *Istocitopatologia* 6, 1984 (en prensa).
- [55] Martin L, Middleton E: Prolonged oestrogenic and mitogenic activity of tamoxifen in ovariectomized mice. *J Endocrinol* 78:125-129, 1978.
- [56] McCarty KS Jr, Woodward BH, Nichols DE, Wilkinson W, McCarty KS Sr: Comparison of biochemical and histochemical techniques for oestrogen receptor analyses in mammary carcinoma. *Cancer* 46:2842-2845, 1980.
- [57] McGuire WL, Horwitz KB, Pearson OH, Segaloff A: Current status of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *Cancer* 39:2934-2947, 1977.
- [58] Meijer CJLM, van Marle J, Persijn JP, van Niewenhuizen W, Baak JPA, Boon ME, Lindeman J: Estrogen receptors in human breast cancer. II. Correlation between the histochemical method and biochemical assay. *Virchows Arch (Cell Pathol)* 40:17-25, 1982.
- [59] Mester J, Baulieu EE: Dynamics of oestrogen receptor distribution between the cytosol and nuclear fractions of immature rat uterus after oestradiol administration. *Biochem J* 146:617-623, 1975.

- [60] Nenci I: Estrogen receptor cytochemistry in human breast cancer: status and prospects. *Cancer* 48:2674-2686, 1982.
- [61] O'Connell MD, Said YW: Estrogen receptors in carcinoma of the breast. A comparison of the dextran-coated charcoal, immunofluorescent and immunoperoxidase technics. *Am J Clin Path* 80:1-6, 1983.
- [62] O'Malley BW, Means AR: Female steroid hormones and target cell nuclei. *Science* 183:610-620, 1974.
- [63] Panko WB, Mattioli CA, Wheeler TM: Lack of correlation of a histochemical method for estrogen receptor analysis with the biochemical assay results. *Cancer* 49:2148-2152, 1982.
- [64] Paulsen SM, Johanssen P, Rasmussen KS, Mygind H: Histochemical demonstration of oestrogen receptors in cancer of the breast. *Ugeskrift for Laeger (Dinamarca)* 143:3119-3123, 1981.
- [65] Pearse AGE, ed: *Histochemistry, Theoretical and Applied*, pp 1303-1378, Londres, Livingstone, 1972.
- [66] Pertschuk LP, Gaetjens E, Carter AC, Brigati DJ, Kim DS, Fealey TE: An improved histochemical method for detection of estrogen receptors in mammary cancer. *Am J Clin Path* 71:504-508, 1979.

- [67] Pertschuk LP, Eisenberg KB, Leo VC, Carter AC, Gaetjens E: Correlation of estrogen binding by cytochemistry in breast cancer with clinical response to hormonal therapy. *Lab Invest* 46:1 65A, 1982.
- [68] Press MF, King W, Greene G: Immunocytochemical localization of estrogen receptors in the human endometrium using a monoclonal antibody against human estrogen receptors. *Fed Proc* 42:1178-1184, 1983.
- [69] Rao BR, Patrick TB, Sweet F: Steroid-albumin conjugate interaction with steroid-binding proteins. *Endocrinol* 106: 356-373, 1980.
- [70] Rao BR, Wiest WG, Allen WM: Progesterone "receptor" in rabbit uterus. I. Characterization and estradiol 17 β -augmentation. *Endocrinology* 92:1229-1240, 1973.
- [71] Ruh TS, Baudendistel LJ: Different nuclear binding sites for antiestrogen and estrogen receptor complexes. *Endocrinology* 100:420-426, 1977.
- [72] Sarff M, Gorski J: Control of estrogen binding protein concentration under basal conditions and after estrogen administration. *Biochemistry* 10:2557-2563, 1971.
- [73] Stagni F, de Bernardi MA, Lampertico P: *Metodica di base. Istocitopatologia* 6, 1984 (en prensa).

- [74] Stumpf WE: The histochemistry of steroid hormone "receptors". *J Histochem Cytochem* 31:113-119, 1983.
- [75] Therapeutic Trials Committee, American Medical Association: Androgens and estrogens in the treatment of disseminated mammary carcinoma. *JAMA* 172:1271-1283, 1960.
- [76] Thomas T, Leung BS, Yu WCY, Kiang DT: Diverse mechanisms of estrogen receptor activation. *Fed Proc* 42:1877, 1983.
- [77] Tominaga T, Kimatura M, Saito T, Itoh I, Takikawa H: Comparative histochemical and biochemical assays of estrogen receptors in breast cancer patients. *Gan* 72:60-65, 1981.
- [78] Udenfriend S, ed: *Fluorescence Assay in Biology and Medicine*, pp 192-197, Nueva York, Academic Press, 1962.
- [79] Underwood JCE, Sher E, Reed M, Eisman JA, Martin TJ: Biochemical assessment of histochemical methods for oestrogen receptor localization. *J Clin Pathol* 35:401-406, 1982.
- [80] Walsh TP, Winzor DJ, Clarke FM, Masters CJ, Morton DJ: Binding of aldolase to actin-containing filaments, evidence of interaction with the regulatory proteins of skeletal muscle. *Biochem J* 186:89-94, 1980.

- [81] Weber K, Osborn M: Cytoskeleton: definition, structure and gene regulation. *Pathol Res Pract* 175:128-132, 1982.
- [82] Wiehle RD, Wittliff JL: Multiple forms of estrogen receptors during differentiation of the mammary gland of the rat. *Fed Proc* 42;1877, 1983.
- [83] Yao X, Meng X, Chen P, Mei Z: Histochemical estrogen receptor assay for selecting stage III breast cancers for combined chemohormonal therapy. *Lab Invest* 48:95-100, 1983.