R. 14842

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
SECRETARIA GENERAL

Queda registrada esta Tesis Doctoral
al folio 105 número 1 del libro
correspondiente.
Sevilla, 22 OCT. 1986
El Jefe del Negociado de Tesis,
Isabel González

T.D.
H/11

ANA MARIA HERNANDEZ DIANEZ.

Servicio de Hematología del Hospital

Universitario de Sevilla.

RECEPTORES CELULARES DE GLUCOCORTICOIDES EN LAS HEMOPATIAS MALIGNAS.

Trabajo realizado para optar al grado
de Doctor en Medicina y Cirugía
por la Facultad de Medicina de Sevilla.

FACULTAD DE MEDICINA
VNIVERSIDAD
SEVILLA

SEVILLA. 1986.

HOSPITAL UNIVERSITARIO
DE LA
FACULTAD DE MEDICINA

AVDA. DR. FEDRIANI S/N
SEVILLA

D. JOSE FAJARDO GALVEZ, PROFESOR NUMERARIO Y ENCARGADO DE CATEDRA DE PATOLOGIA Y CLINICA MEDICAS II DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE SEVILLA.

C E R T I F I C A : Que Da. ANA HERNANDEZ DIANEZ, ha realizado en el Servicio de Hematologia, bajo mi dirección y la del Dr. D. Manuel Constantino Bermejo, el presente trabajo titulado:

" Receptores celulares de glucocorticoides en las hemopatías malignas"

que presenta como TESIS DOCTORAL.

Lo que certifica para efectos oportunos.

Sevilla, 14 de Octubre de 1.986.

Prof. Fajardo Gálvez

Dr. Constantino Bermejo

A Pablo, María del Ara y

Osvaldo.

A Victoria y Marta.

Este trabajo ha sido realizado gracias a la concesión de una Beca de Formación del Personal Investigador por el Ministerio de Educación y Ciencia.

Quisiera expresar mi agradecimiento:

Al Profesor D. José Fajardo Gálvez por haber hecho posible la realización de este trabajo.

Al Dr. D. Manuel Constantino Bermejo, Jefe de Servicio de Hematología, quien lo supervisó, dirigió y corrigió. Por su estímulo y ayuda, gracias.

Al Dr. D. Blas Rodriguez de Quesada, Jefe de Servicio de Medicina Nuclear, quien me proporcionó el material radioactivo necesario para llevarlo a cabo.

A la Dra. Dª. Milagrosa Díaz Gálvez, Jefe de Sección del Servicio de Endocrinología, quien me facilitó los medios para el contaje celular, y cuya amistad es de singular importancia para mí.

Al Dr. D. Isidoro Arjona Rueda, Médico Adjunto del Servicio de Inmunología, y a D. Juan Manuel Corralejo Llanes (ATS) quienes me iniciaron en las técnicas de cultivos celulares.

A mis Amigas: Dra. Dª. Isabel Herrera Quero, Dª. María Luisa Espinosa Rodriguez (ATS), Dra. Dª. Amada Juana Reyes Rodriguez y Dra. Dª. Gertrudis Pereira, por creer en mí, ayudarme en todo momento y no abandonarme cuando más las necesité.

A la empresa Ibersoftware, S.A., que me facilitó la utilización del material informático necesario para mi tarea.

INDICE.

página

INTRODUCCION 1

I.- HORMONAS CORTICOSUPRARRENALES 4

II.- RECEPTORES HORMONALES 14

III.- CUANTIFICACION DE RECEPTORES DE GLUCOCORTICOIDES EN SUJETOS NORMALES Y PACIENTES CON LEUCEMIA Y LINFOMA 25

IV.- VALORACION DE LOS ENSAYOS DE RECEPTORES DE GLUCOCORTICOIDES EN LAS ENFERMEDADES HEMATOLOGICAS 50

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA 58

MATERIAL Y METODOS 61

RESULTADOS 80

DISCUSION 102

CONCLUSIONES 113

RESUMEN 117

BIBLIOGRAFIAS 120

ABREVIATURAS 151

INTRODUCCION.

Los Glucocorticoides ("G") constituyen una de las modalidades terapéuticas actualmente disponibles para el tratamiento de ciertos tipos de Leucemias Agudas.

Sin embargo al principio de la era de la Quimioterapia varios estudios en los que estos fármacos fueron empleados solos indicaron que algunos casos de Leucosis Linfoblástica Aguda (LLA) y el 50 % de los linfomas no Hodgkin no respondían a los esteroides (BURNINGHAM, R.A., RESTREPO, A., PUGH, R.P., BROWN, E.B., SCHLOSSMAN, S.F., KHURI, D.D., LESSNER, H.E., and HARRINGTON, W.J., 1964)(1); (EZDINLI, E.Z., STUTZMAN, L., AUNGST, C.W., and FIRAT, D., 1969)(2); (CLINE, M.J., 1973)(3); (VIETTI, T.J., SULLIVAN, M.P., BERRY, D.H., HADDY, T.B., HAGGARD, M.E., and BLATTNER, R.J., 1965)(4).

Igualmente han sido observados pacientes de LLA a quienes inicialmente se mantuvo controlada la enfermedad y a la larga recaen para finalmente no responder a este tratamiento (LEIKIN,

S.L., BRUBAKER, C.A., HARTMANN, J.R., MURPHY, M.L., WOLFF, J. A., and PERRIN, E., 1968)(5).

Incluso se ha sugerido que el empleo de los mismos en Leucosis Aguda no Linfoblástica (LANL) puede acelerar el curso de la enfermedad (KNOSPE, W.H., and CONRAD, M.E., 1966)(6).

Tales hechos han promovido investigaciones tendentes a dilucidar sus mecanismos de acción farmacológica así como la naturaleza de los cambios que conducen a la resistencia terapéutica.

Siendo conocido que la acción de estas hormonas está mediatizada por receptores celulares específicos (MUNCK, A., and LEUNG, K., 1977)(7), vamos a presentar en este capítulo un resumen de los conocimientos actuales a cerca de los mecanismos de acción de los Glucocorticoides y de la naturaleza bioquímica de sus Receptores, así como de las implicaciones que su estudio tienen en el campo de la Hematología.

I.- HORMONAS CORTICOSUPRARRENALES.

HISTORIA.

La significación fisiológica de las Suprarrenales comenzó a apreciarse a consecuencia de la descripción de ADDISON, T., en 1855 (8) del síndrome clínico resultante de la enfermedad destructora de las glándulas suprarrenales. Sus observaciones interesaron al fisiólogo BROWN-SEQUARD, C.E. (1856) (9), quien realizó los primeros experimentos sobre la adrenalectomía, llegando a la conclusión de que estas glándulas son indispensables para la vida. En la tercera década de este siglo ya se aceptaba que era la corteza, y no la médula, la parte de la glándula que mantenía la vida. Pronto la literatura estuvo llena de descripciones de las numerosas anomalías fisiológicas exhibidas por los animales adrenalectomizados. De estos estudios surgió el concepto de dos tipos de hormonas adrenocorticales: los Mineralocorticoides que regulan principalmente la homeostasia de los electrolitos, y los Glucocorticoides que son hormonas que intervienen en el metabolismo de los hidratos de carbono. Esta dicotomía "sal" y "azucar" ha sido útil y sobrevive actualmente de forma modificada (HAYNES, R.C., and MURAD, F., 1981)(10).

BIOSINTESIS DE LOS ESTERIODES ADRENALES.

Todas las hormonas corticales se producen a partir del Colesterol, que a su vez proviene del acetato activo, pasando luego a Pregnenolona que es rapidamente transformada en Progeste-

rona, para dar origen, mediante un complejo proceso, a la Corticosterona, Hidrocortisona (Cortisol) y Cortisona. En dicho proceso intervienen enzimas, especialmente la 11, 17 y 21 hidroxilasas. La Aldosterona deriva de la Corticosterona (LITTER, M., 1976)(11).

Como vemos el Colesterol es un intermediario obligado de la biosíntesis de los corticosteroides. Aunque la corteza suprarrenal lo sintetiza, la mayor parte de él (60%-70%) proviene de fuentes exógenas, tanto en reposo como tras estímulo con ACTH.

Los Adrenocorticoides sintetizados no se almacenan en la suprarrenal sino que su formación equivale a su secreción (HAYNES, R.C., y col. 1981)(10).

TRANSPORTE.

Los Glucoccorticoides naturales (cortisol, corticosterona) viajan en la sangre unidos a una alfa 1 globulina llamada Transcortina (CBG), aunque cuando su concentración se eleva por encima de 30-40 ug% se supera la capacidad de transporte de esta proteina y son llevados por la albúmina; solamente un 10% del cortisol circula libre. En cambio las hormonas sintéticas fluorinadas con actividad "G", como la dexametasona o triamcinolona, viajan libres, sin unirse a las proteinas plasmáticas (CASANDRA, R.S., and De NICOLA, A.F., 1980)(12).

La globulina tiene una alta afinidad pero poca capacidad total de unión y la albúmina tiene poca afinidad pero relativamente gran capacidad de unión. Por consiguiente en concentra-

ciones bajas o normales casi toda la hormona está unida a la CBG pero cuando la cantidad de corticoide aumente la concentración de esteroide libre y ligado a la albúmina se incrementará, con poco cambio en la concentración del ligado a la globulina. Los corticoesteroides compiten entre sí por los sitios de unión en la CBG. El cortisol tiene gran afinidad, los esteroides conjugados con glucurónicos y la aldosterona tienen poca (HAYNES, R.C., y col. 1981)(10); (LITTER, M., 1976)(11).

Durante el embarazo, y en el tratamiento con estrógenos en ambos sexos, la CBG, el cortisol plasmático total y el cortisol libre aumentan varias veces. Su significación biológica es desconocida (HAYNES, R.C., y col. 1981)(10).

RELACION ENTRE LA ESTRUCTURA Y LA FUNCION DE LOS GLUCOCORTICOIDES.

Existen definidos requerimientos estructurales para que una molécula posea actividad Glucocorticoide (CASANDRA, R.S., y col. 1980)(12). Entre ellos mencionaremos: 1) La doble ligadura entre los carbonos 4 y 5 y la cetona en el carbono 3; 2) El hidroxilo en el carbono 11, ya que su oxidación a una cetona disminuye la actividad biológica; 3) Presencia de un hidroxilo en el carbono 17, ésto aumenta la actividad "G" pero no es indispensable, ya que la corticosterona no la posee y es suficientemente activa; 4) La cadena lateral en el carbono 17, con cetona en el carbono 20 y alcohol primario en el 21. De esta manera el Cortisol constituye el Glucocorticoide típico, ya que posee todas estas funciones (11 beta, 17 alfa, 21-trihidroxi-pregn-4-ene-3, 20-

diona).

Esta familia de compuestos está integrada por sustancias naturales y sintéticas que no difieren en cuanto a su acción biológica, y cuya única diferencia es su potencia relativa (SAYER, G., and TRAVIS, R.H., 1970)(13).

La Hidrocortisona o Cortisol es la principal hormona glucocorticoide en el hombre. El nivel de Cortisol en plasma varía diariamente y oscila entre 0,04 - 0,2 gr/ml. Esto equivale a una concentración de alrededor de 10^{-7} M. Con dosis farmacológicas exógenas se obtienen concentraciones del fármaco de 10^{-5} M a 10^{-6} M (CLAMAN, H.N., 1972)(14).

ACCIONES FISIOLOGICAS DE LOS GLUCOCORTICOIDES.

Los "G" ejercen acciones periféricas que clasificaremos en anabólicas y catabólicas, y además modulan ciertas funciones del Sistema Nervioso que no se encuadran dentro de ambos conceptos.

La acción anabólica o de síntesis se ejerce fundamentalmente sobre hígado, riñón y pulmón (CASANDRA, R.S., y col. 1980)(12).

En el hígado fabrican glucosa a partir de precursores no hidrocarbonados (neoglucogénesis) principalmente aminoácidos, conducen al depósito hepático de glucógeno e inhiben la captación periférica de glucosa, a la vez que favorecen la descarga de glucosa neoformada a sangre. Esta acción antiinsulínica causa hiperglucemia y puede dar origen a una diabetes esteroidea.

En el riñón los "G" también son gluconeogenéticos, además de

activar la filtración glomerular.

En el pulmón la acción anabólica se manifiesta por la aceleración de la maduración del pulmón fetal y la biosíntesis de fosfolípidos.

En las células adiposas, linfoides, conectivas, de piel, musculares y óseas los "G" promueven la destrucción de biomoléculas proteicas y/o grasas que liberan a sangre sus constituyentes: aminoácidos, glicerol y ácidos grasos. Los dos primeros son captados por el riñón y convertidos en glucosa por el camino de la gluconeogénesis (GUYTON, A.C., 1971)(15); (TEPPERMAN, J., 1975)(16).

Entre las acciones inhibitorias merecen la pena recordarse la inhibición de la resorción tubular y la inhibición de las respuestas inmunitaria, inflamatoria y antialérgica. Estas últimas acciones son las que han generado la amplia aplicación de los "G" en la farmacología clínica y terapéutica (HAYNES, R.C., y col. 1981)(10).

Las acciones nerviosas de los "G" regulan el comportamiento y la conducta, causan cambios enzimáticos, modulan los fenómenos eléctricos nerviosos y la retroalimentación negativa, proceso por el cual los glucocorticoides circulantes frenan las estructuras responsables de la secreción de ACTH (YATES, F.E., 1968)(17).

ACCIONES FARMACOLOGICAS DE LOS GLUCOCORTICOIDES.

A) EN GENERAL.

El uso clínico efectivo de los "G" ha sido posible gracias a

su aislamiento, dilucidación de estructuras y síntesis económica. La manipulación de la estructura a dado lugar a diversos análogos sintéticos, algunos de los cuales representan significativos progresos terapéuticos en términos de potencia antiinflamatoria. Sin embargo no se han cumplido las grandes esperanzas de eliminar su toxicidad (HAYNES, R.C., y col. 1981)(10).

Dos son las acciones farmacológicas fundamentales de los "G" (LITTER, M., 1976)(11): Efectos sustitutivos en caso de insuficiencia suprarrenal y efectos producidos por hipercorticismo, es decir exceso de éstos en casos de función suprarrenal normal, especialmente acciones antiinflamatorias (COHEN, J.J., 1971)(18). Un tercer aspecto es el que corresponde a la acción permisiva, es decir su capacidad para sustentar la acción de otras hormonas que sin la presencia de aquellos no producirían sus efectos (INGLE, D.J., 1954)(19).

Si bien estos agentes tienen especial utilidad en aquellas afecciones en las que la fisiopatología se halla relacionada con trastornos de la respuesta inmune y con fenómenos inflamatorios, su acción antiinflamatoria es con mucho la de mayor inportancia farmacológica y terapéutica (BAXTER, J.D., and HARRIS, A.W., 1975)(20) hasta el punto en que, en la práctica médica habitual se les conoce como "esteroides antinflamatorios".

Entre las diversas acciones de estas hormonas vamos a centrar la atención sobre el efecto de los mismos en los órganos linfoides y sangre.

B) SOBRE LOS ORGANOS LINFOIDES Y SANGRE.

SISTEMA LINFOIDE. Entre las muy diversas acciones atribuibles a los Glucocorticoides nos interesa destacar el efecto catabólico que tales hormonas ejercen a nivel del tejido linfoide (BAXTER, J.D., and FROSHAM, P.H., 1972)(21) donde producen una marcada linfopenia y atrofia tímica como ha sido demostrado en animales de experimentación (CLAMAN, H.N., 1972)(14).

De una a tres horas tras la administración de "G" a ratas o ratones se evidencia la disolución de los linfocitos del tejido linfoide. Los núcleos se hacen picnóticos y se desintegran, o las células pueden perder su citoplasma. Los desechos celulares son fagocitados y la disolución continua durante el periodo de administración del esteroide. Luego hay un retorno a la estructura linfoide normal (STEVENS, W., COLESSIDES, C., and DOUGHERTY, T.F., 1965)(22).

El mecanismo de los llamativos efectos linfolíticos en roedores ha dado lugar a muchas investigaciones.

Los estudios de LEUNG, K., and MUNCK, A., (1975)(23) demostraron que la acción catabólica de los "G" en los linfocitos se ejerce en forma similar a los tejidos donde estas hormonas poseen acción anabólica.

Para MAKMAN, M.H., DVORKIN, B., and WHITE, A., (1971)(24) la presencia de una proteina receptora para "G" en el timo de la rata sugiere que estos efectos estén mediados por la interacción entre un complejo hormona-receptor y la cromatina del núcleo, que estimula la síntesis de una proteina inhibidora que sería la

responsable de los efectos catabólicos.

CLAMAN, H.N., (1972)(14) ha postulado que la involución in vivo del timo infantil tras la administración de cortisona podría explicarse en términos de inhibición del crecimiento, y dado que el porcentaje de división celular en niños es muy alto cualquier agente que bloquee la proliferación celular, sin necesidad de acarrear la muerte intratímica, podría causar una disminución del tamaño del timo (CAFFEY, J., and SILBEY, R., 1960)(25); (CLAMAN, H.N., MOORHEAD, J.W., and BENNER, W.H., 1971)(26).

Con respecto a la acción de los Glucocorticoides "in vivo", se ha demostrado que en sujetos normales inducen a una transitoria linfopenia. Una sola dosis de Cortisol en el hombre produce una declinación, aproximadamente del 70% en los linfocitos de sangre periférica (SP) y más del 90% de los monocitos, a las 4-6 horas de su administración (FAUCI, A.S., and DALE, D.C., 1974)(27). Aunque se ha observado que esta depleción afecta a ambas subpoblaciones linfocitarias, parece ser que son afectadas en mayor medida las células T y sus funciones (FAUCI, A.S., 1975)(28); (FAUCI, A.S., MURAKAMI, T., BRANDON, D.D., LORIAUX, D.L., and LIPSETT, M.B., 1980)(29), cosa que no puede explicarse por una diferente proporción del contenido de RG entre ellas (FAUCI, A.S., y col. 1980)(29).

Numerosos estudios avalan el hecho de que los "G" tienen efecto sobre la mayoría de las enfermedades hematológicas malignas (CLAMAN, H.N., 1972)(14); (CLINE, M.J., 1974)(30); (CLARK, A.N.G., and OSMANI, S.R., 1978)(31).

Particularmente las células de las LLC y LLA son más sensi-

bles, mientras que las de las LANL son más resistentes a los efectos líticos de estas hormonas (GALILI, U., PROKOCIMER, M., and IZAK, G., 1980)(32).

EOSINOFILOS. Los "G" actuan deplecionando el componente de eosinófilos de la circulación (THORN, G.W., 1973)(33). Este método ha sido ampliamente utilizado para indagar la actividad de la corteza adrenal (NELSON, D.H., 1953)(34). Mientras que para GORDON, A.S., (1955)(35) este fenómeno es secundario a un aumento en la destrucción de los mismos, para ANDERSEN, V., (1969)(36) es el resultado de una redistribución de las células desde la sangre a otros compartimentos.

NEUTROFILOS. El brusco descenso de los linfocitos, monocitos y eosinófilos en la sangre periférica que aparece tras la administración de cortisol se acompaña de un aumento de los leucocitos polimorfonucleares circulantes (NELSON, D.H., SANDBERG, A.A., PALMER, J.G., and TYLER, F.H., 1952)(37) procedentes de las reservas medulares (DALE, D.C., FAUCI, A.S., GLERRY, N.D., and WOLF, S.M., 1975)(38), así como un alargamiento de la vida media de los mismos (ATHENS, J.W., HAAB, D.P., RAAB, S.O., MAVER, A.M., ASHENBUCHER,H, CARTWRIGHT, G.E., and WINTROBE, M.M., 1961)(39). Estos hechos son los causantes de la granulocitosis. Si bien no existe aun una explicación precisa para estos fenómenos, se cree que la granulocitosis inducida por los esteroides es consecuencia de una mayor entrada de leucocitos polimorfonucleares en sangre desde MO y de una menor destrucción de los mismos (BISHOP, C.R., ATHENS, J.W., BOGGS, D.R., WARNER, H.R., CARTWIRGHT, G.E., and WINTROBE, M.M., 1968)(40).

HEMATIES. Hay pruebas de que los "G" retardan la eritrofagocitosis (GREENDYKE, R.M., BRADLEY, E.M., and SWISHER, S.N., 1965)(41). La estimulación de la eritropoyesis no se ha demostrado de forma convincente en el individuo sano, pero los esteroides producen una respuesta normoblástica en la MO de los pacientes afectos de anemia megaloblástica (DOIG, A., GIRDWOOD, R.H., DUTHIE, J.J.R., and KNOX, J.D.E., 1957)(42).

COAGULACION. Aún queda por dilucidar la significación de las alteraciones inducidas por los "G" en los mecanismos de la coagulación (COSGRIFF, S.W., 1951)(43): coagulación más rapida, acortamiento desproporcionado del tiempo de tromboplastina parcial, aumento del factor antihemofílico entre otras (OZSOYLN, S., STRAUSS, H.S., and DIAMOND, L.K., 1962)(44).

II.-RECEPTORES HORMONALES.

HISTORIA.

Las Hormonas para poder actuar sobre una célula deben, primeramente, unirse a ésta. El concepto de "Receptor" tiene más de un siglo y fue introducido, independientemente, por Langley (1852-1926) y Ehrlich (1854-1915). Langley, fisiólogo inglés, se interesó principalmenente por el Sistema Nervioso Autónomo y estableció el concepto de lugares de receptores de acción de drogas al estudiar los efectos de la pilocarpina y atropina sobre la secreción salival (LANGLEY, J.N., 1878)(45); (LANGLEY, J.N., 1905)(46).

EHRLICH, P. (1879)(47) médico biólogo y químico alemán, es el que creó el concepto más general de receptores basandose en sus trabajos sobre colorantes tisulares, inmunidad y quimioterapia. Sus estudios sobre tinción selectiva de diversos organismos celulares formó la base de los colorantes hematológicos para distinguir varios tipos de leucocitos, método todavía en uso actualmente.

El establecimiento formal de los mismos se debe a los farmacólogos Clark y Gaddum, quienes formularon la "teoría de la ocupación" según la cual la intensidad de los efectos farmacológicos de un fármaco es directamente proporcional al número de receptores ocupados por dicho fármaco (CLARK, A.J., 1926)(48); (GADDUM, J.H., 1926)(49).

CONCEPTO DE RECEPTOR.

Clásicamente se ha denominado "receptor" a la entidad celular de naturaleza proteica que une especificamente determinada hormona o fármaco y que, como consecuencia de tal unión, inicia una serie de procesos a nivel celular que, en última instancia, determinan la respuesta fisiológica (CASANDRA, R.S. and De NICOLA, A.F., 1980)(50); (LEVEY, G.S., 1976)(51).

Los receptores hormonales tienen por tanto la misión de reconocer a la hormona (CHAN, L., and O'MALLEY, B.W., 1978)(52), siendo específicos para los distintos tipos de estas. Esta unión se hace con una alta afinidad. Tales receptores se encuentran en las células diana tan solo en ínfimas cantidades y son saturables (HERRERA CASTILLON, E., 1986)(53).

Los receptores hormonales se localizan intracelularmente cuando las hormonas a las que se unen son liposolubles. Este es el caso de las Hormonas Tiroideas, Hormonas Esteroideas y Vitamina D. Por el contrario las hormonas de naturaleza peptídica, glucoproteica o aminoacídica tienen sus receptores localizados en la superficie de la membrana celular (LEVEY, G.S., and ROBINSON, A.G., 1982)(54).

En el primer caso -receptores intracelulares- el mensaje hormonal va a producir fundamentalmente cambios en la expresión genética (CHAN, L., y col. 1978)(52), en tanto que en el segundo caso -receptores de membrana- los cambios van a afectar a la actividad enzimática de la célula y a la permeabilidad de su membrana (POLLET, R.J., and LEVEY, G.S., 1980)(55).

MECANISMO DE ACCION HORMONAL DE LOS GLUCOCORTICOIDES.

La forma en que los Glucocorticoides ejercen su acción no es totalmente conocida, y al igual que otras hormonas esteroides actuan según se cree controlando la síntesis de proteinas (HAYNES, R.C. y col. 1981)(10). Se admite generalmente que la respuesta a los mismos está mediada por la unión de la Hormona a un Receptor específico intracitoplasmático presente en los tejidos sensibles, por el que esteroide tiene una gran afinidad (CHAN, L. and O'MALLEY, B.W., 1976)(56); (CHAN, L., y col. 1978)(52); (FELDMAN, D., 1975)(57).

El modelo propuesto sería brevemente como sigue: la hormona penetra en la célula por simple difusión (MUNCK, A., y col. 1977)(7), si bien algunos autores postulan la posibilidad de un transporte activo (LEVEY, G.S., y col. 1982)(54), e interacciona en el citoplasma con su receptor. La unión hormona-receptor origina un cambio conformacional (CASANDRA, R.S., y col. 1980)(12), como lo demuestra el aumento de la constante de sedimentación, o activación con la temperatura (SCHMIDT, T.J., and LITWACK, G., 1982)(58), lo que favorece su paso hacia el núcleo (LEVEY, G.S., y col. 1982)(54).

Los procedimientos empleados para estudiar la traslocación de los complejos H-R al núcleo han sido descritos por numerosos autores (CRABTREE, G.R., SMITH, K.A., and MUNCK, A., 1978)(59); (WIRA, C.R., and MUNCK, A., 1974)(60); (MUNCK, A., and WIRA, C.R., 1975)(61). La activación ocurre muy lentamente a temperaturas muy bajas (entre 0 y 3ºC); en células normales así incubadas predominan los complejos en el citoplasma. Cuando son calentadas

se origina una rápida formación de complejos nucleares.

Una vez en el núcleo, los pasos que sigue el complejo hormona-receptor están en discusión. Para BAXTER, J.D., y col. (1972)(21) la unión del complejo se produce directamente con el ADN. Para SEKERIS, C.E., and VAN DER MEULER, N. (1974)(62) en cambio, el complejo se une a las proteinas de la cromatina. En este sentido los "G" se comportarían en forma similar a otros esteroides como la progesterona, donde el trabajo de O'MALLEY, B.W. (1971)(63) ha demostrado que la misma tiene preferencia por las proteinas acídicas de la cromatina del oviducto de pollo.

La información transportada por el esteroide, o más probablemente por la proteina receptora, dirige el aparato genético hacia la transcripción del RNA (HAYNES, R.C., y col. 1981)(10). En los últimos años ha habido demostraciones directas de que los "G" en los tejidos apropiados aumentan la cantidad de RNAm que codifica las enzimas cuya síntesis es estimulada por estas hormonas (SCHUTZ, G., KILLEWICH, L., CHEN, G., and FEIGELSON, P., 1975)(64); (IYNEDJIAN, P.B., and HANSON, R.W., 1977)(65). En esta forma estimulan la transcripción y en último término la síntesis de proteinas específicas. Aunque esto es cierto en algunos tejidos, como el hígado, en otros como las células linfoides y los fibroblastos, el efecto total de las hormonas es catabólico. Esto sugiere que el complejo esteroide-receptor puede inhibir, en lugar de estimular, la transcripción en estos casos. Sin embargo, MAKMAN, M.H., y col. en 1971 (24) presentaron pruebas que sugieren que los esteroides actuan en las células linfoides estimulando la síntesis de una proteina inhibidora que presumiblemente es la causante de los efectos catabólicos.

Este proceso puede ser, potencialmente, la forma de modulación del efecto de la hormona sobre una serie de funciones celulares, que determinarían su actividad antiinflamatoria e inmunosupresora (BAXTER, J.D., y col. 1975)(20).

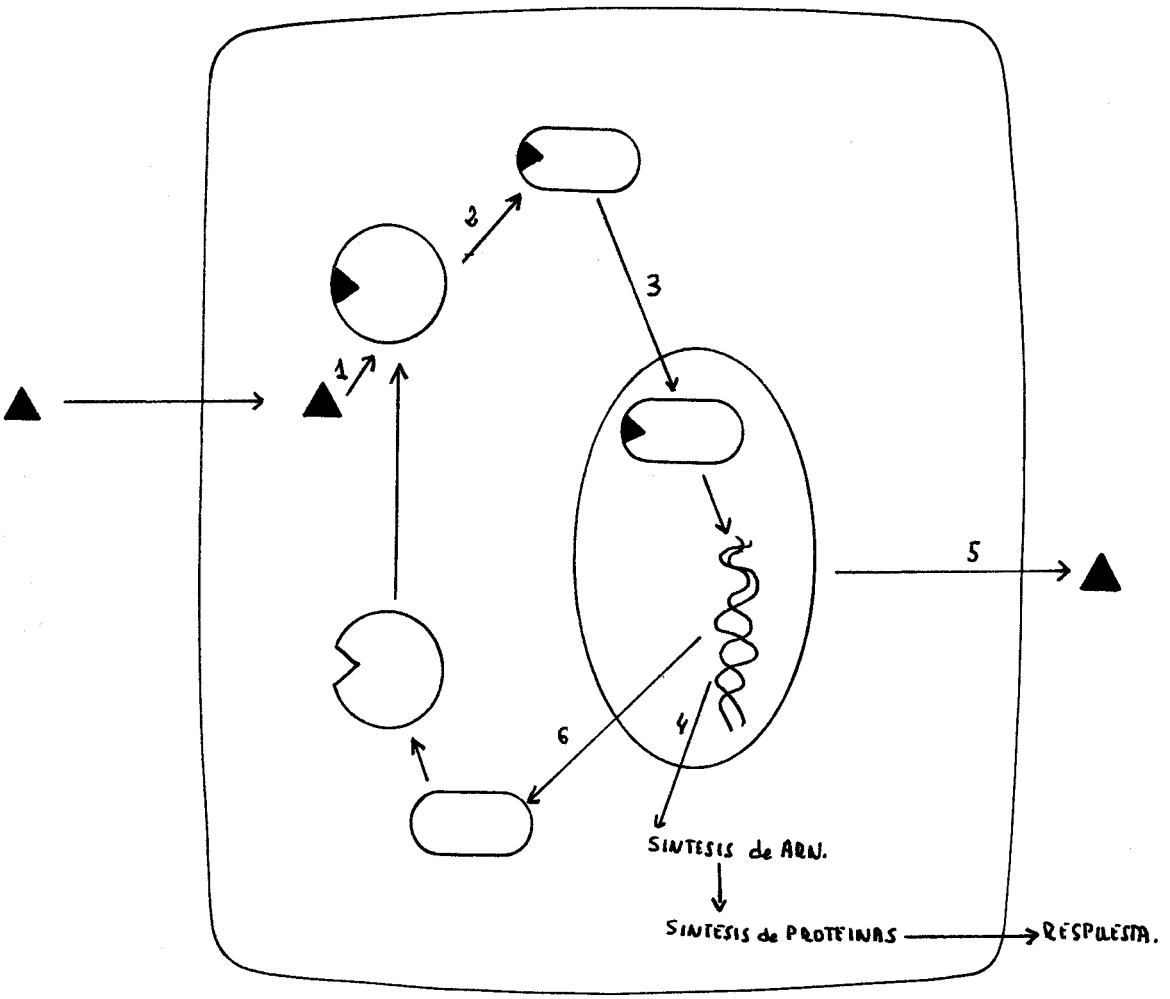
Una vez cumplida su acción el corticoide se desprende del núcleo y se elimina de la célula. El receptor en cambio vuelve del núcleo al citoplasma ("recicla"), donde sufre modificaciones estructurales para poder unirse a una nueva molécula que ingrese en la célula (CASANDRA, R.S., y col. 1980)(12).

En la figura nº 1 se describen los pasos intracelulares de la acción Glucocorticoide hasta aquí definidos.

Estos receptores se han identificado en muchos tejidos (BALLARD, P.L., BAXTER, J.D., HIGGINS, S.J., ROUSSEAU, G.C., and TOMKINS, G.M., 1974)(66) cerebro total y regiones específicas de él (hipocampo, hipotálamo), pituitaria anterior, corazón pulmón, timo, retina, tejido adiposo, hígado, riñón, estómago, testículo, bazo, músculo esquelético y liso, ...etc, pero no se han encontrado en vesícula seminal, próstata, vejiga y útero (CASANDRA, R.S., y col. 1980)(12).

FIGURA Nº 1.

RECEPTOR DE GLUCOCORTICOIDE.



Unión de la hormona a su Receptor Citoplasmático (1). Cambio conformacional o "activación" (2) necesario para entrar en el núcleo (3). Como consecuencia se sintetizan ARN y proteinas (4) que reflejan la acción hormonal. La hormona se libera (5) y el Receptor recicla al citoplasma (6).

CUANTIFICACION DE LOS RECEPTORES DE GLUCOCORTICOIDES.

Los prometedores resultados obtenidos en la terapia del Carcinoma mamario mediante la determinación de Receptores Estrogénicos (McGUIRE, W.L., 1980)(67), han servido de soporte para pensar que la cuantificación de Receptores específicos podrían ser de utilidad para predecir la respuesta a la terapia endocrina y han orientado a numerosos investigadores a buscar una analogía similar entre los Receptores de Glucocorticoides (RG) y las enfermedades hematológicas.

Determinaciones paralelas se han desarrollado para determinar la cantidad de RG en pacientes hematológicos con varias formas de Leucemia y Linfoma, habiendose empleado para ello dos diferentes métodos: uno utiliza extractos celulares de citosol (ENSAYO CITOPLASMATICO) y el otro basado en ensayos sobre la célula total (ENSAYO CELULAR TOTAL). Este último revela la saturación de los sitios de receptor por hormona marcada isotópicamente con tritio (CRABTREE, G.R., SMITH, K.A., and MUNCK, A., 1981)(68).

Antes de hablar de cada uno de ellos haremos un breve repaso de la unión hormona-receptor:

La unión de los "G" a sus receptores viene representada por esta simple ecuación: $R + H \rightleftharpoons HR$. La constante de asociación, que mide directamente la afinidad, se expresa mediante la siguiente ecuación: $Ka = (HR)/(H)\times(R)$. A mayor afinidad menor especificidad. La constante de disociación es inversa a la anterior y se define: $Kd = (H)\times(R)/(HR)$ (CASANDRA, R.S., y col. 1980)(50).

A pesar de lo complicado y poco conocido de la transformación de los receptores dentro de las células intactas (MUNCK, A., and BRINCK-JOHNSEN, T., 1968)(69) la hormona en estado estable se puede describir razonablemente mediante la ecuación arriba indicada.

Por lo descrito anteriormente se llega a la unidad de concentración, que es igual a la concentración de la hormona (H), por lo que la concentración (HR) es igual a la concentración del (R) ((HR)=(R)) cuando la mitad de los sitios estan ocupados (MUNCK, A., 1976)(70).

A) ENSAYO CITOPLASMATICO (EC).

Las primeras determinaciones de RG se efectuaron sobre extractos citoplasmáticos (BAXTER, J.D., and TOMKINS, G.M., 1971)(71), imitando así la técnica seguida para la cuantificación de Receptores estrogénicos en el Carcinoma mamario, y expresaron la cantidad de receptor en fmol/mg de proteina citoplasmática, o más raramente, en cpm/proteina citoplasmática (SIMONSSON, B., TERENIUS, L., and NILSSON, K., 1982)(72).

Mediante esta técnica LIPPMAN, M.E., HALTERMAN, R., LEVENTHAL, B.G., PERRY, S., and THOMPSON, E.B. (1973)(73) y LIPPMAN, M.E., HALTERMAN, R., PERRY, S., LEVENTHAL, B.G., and THOMPSON, E.B. (1973)(74) demostraron que las células de 22 pacientes con LLA previamente no tratados y con respuesta a la terapia tenían un alto número de Receptores de Glucocorticoides si se les comparaba con aquellos pacientes en recaida y refractarios al tratamiento.

Las células de pacientes LANL (LIPPMAN, M.E., PERRY, S., and THOMPSON, E.B., 1975)(75) y LLC (GAILANI, S., MINOWADA, J., SILVERNAIL, S., NUSSBAUM, A., KAISER, N., ROSEN, F., and SHIMAOKA, K., 1975)(76) cánceres que muestran escasa sensibilidad a la terapia con esteroides, se vió que presentaban muy raramente niveles de receptor. En suma, se encontró una perfecta correlación entre los RG y la respuesta al tratamiento, con bajos niveles o nulos, en los que no respondían.

B) ENSAYO CELULAR TOTAL (ECT).

Aunque las preparaciones de citosol han sido empleadas para estudiar una gran variedad de Receptores hormonales, incluidos los Receptores de Glucocorticoides, numerosos estudios confirman la escasa fiabilidad de este método al ser aplicados al contenido de RG en las Leucemias humanas (CRABTREE, G.R., y col. 1978)(59); (DUVAL, D., and HOMO, F., 1978)(77), dado que:

1º.- Los Ensayos Citoplasmáticos dan una estimación demasiado baja del contenido total de Receptores, al no tener en cuenta el componente nuclear.

Es sabido que en los timocitos de rata expuestos a 37ºC el mayor número de Receptores se localiza en el núcleo (aproximadamente el 80%), lo que se asocia a una mayor formación de complejos nucleares (MUNCK, A., and WIRA, C., 1971)(78). Observaciones similares han sido puestas de manifiesto recientemente en humanos (IACOBELLI, S., LONGO, P., MASTRANGELO, R., MALANDRINO, R., and RANELLETTI, F.O., 1980)(79).

2º.- Es posible que durante el proceso de homogenización se

liberen enzimas proteolíticos de los lisosomas celulares que inactiven parcialmente a los receptores citoplasmáticos (MARCHETTI, P., NATOLI, V., RANELLETTI, F.O., MANDELLI, F., De ROSSI, G., and IACOBELLI, S., 1981)(80). SLOMAN, J.C., and BELL, P., en 1979 (81) demostraron la presencia factores de inactivación de los RG en el citosol de las LMC. La presencia de estos factores, no bien identificados aunque posiblemente se trate de enzimas, ha sido igualmente propuesta por otros autores tanto para las LMC como para las LMA (CRABTREE, G.R., y col. 1978)(59).

3º.- También cabe la posibilidad de que las células sean resistentes al proceso de rotura durante la homogenización (CRABTREE, G.R., y col. 1978)(59); (MARCHETTI, P., y col. 1981)(80), lo que vendría a poner de manifiesto una escasez de sitios/célula en los Ensayos Citoplasmáticos.

Por el contrario el ECT estima el número total de Receptores existentes, cuantificados como la suma de los sitios nucleares y citoplasmáticos. Su valia ha sido confirmada por numerosos investigadores (MARCHETTI, P., y col. 1981)(80); (NANNI, P., NICOLETTI, G., PRODI, G., 1982)(82); (BLOOMFIELD, C.D., SMITH, K.A., PETERSON, B.A., and MUNCK, A., 1981)(83).

Análisis comparativos de ambos métodos han sido efectuados por IACOBELLI, S., NATOLI, V., LONGO, P., (1981)(84) en 41 pacientes hematológicos con varias formas de leucemia, segun describimos en la Tabla nº 1.

TABLA Nº 1.

CUANTIFICACION DE RG MEDIANTE ECT Y EC.
(IACOBELLI, S., y col. 1981)(84).

Pacientes	sitios/célula ECT	EC	% de no estimación
LLC (14)	8061±4491 *	1551±1201	78,7±18,4
LLA (15)	17106±13737	5434±6817	73,1±14,4
LANL(12)	14954±10083	6536±6822	57,8±22,3

* media ± desviación típica.

Los resultados muestran como el EC da una estimación demasiado baja del número total de Receptores (en %) al ser comparados a los obtenidos mediante ECT. Para estos autores la elevada unión de sitios/célula detectada en el citoplasma de las LANL podría ser reflejo de una alterada distribución entre los compartimentos de Receptor nuclear y citoplasmático. Existe constancia de este hecho por parte de otros autores (CRABTREE, G.R., y col. 1978)(59).

III.-CUANTIFICACION DE RECEPTORES DE GLUCOCORTICOIDES EN SUJETOS NORMALES Y PACIENTES CON LEUCEMIA Y LINFOMA.

NORMALES.

La existencia de RG ha sido demostrada facilmente en los linfocitos humanos (LIPPMAN, M.E., 1982)(85).

Los primitivos estudios al respecto (LIPPMAN, M.E., y col. 1973)(73) efectuados sobre voluntarios normales mostraban un bajo número de RG al ser medidos mediante Ensayo Citoplasmático. Esta cantidad fué alrededor de 1500 sitios/célula.

Una gran variedad de razones, entre las que incluiriamos una diferente sensibilidad y varios aspectos del sistema inmune a los "G", han dado lugar a que estos estudios se hiciesen sobre poblaciones y subpoblaciones linfocitarias parcialmente purificadas, y sobre la célula total (Ensayo Celular Total).

Mediante este método varios autores han cuantificado estos Receptores en MO y timocitos en niños, y en SP y nódulos linfoides en adultos. Los resultados obtenidos los exponemos en la Tabla nº 2.

TABLA Nº 2.

CUANTIFICACION DE RG MEDIANTE ECT EN SUJETOS NORMALES.

Enf.	Tipo Cel.	RG(sitios/célula)	Autor (Blg.)
9	MO(niños)	13929	Costiow y col. 1982 (95)
9	Timocitos(niños)	3100	Homo y col. 1979 (93)
11	Nod.Linfoides	2082	Bloomfiel y col.1980 (94)
7	Linfos SP	3151±726 *	Smich y col. 1977 (86)
10	Linfos SP	2700	Niefeld y col. 1977 (87)
18	Linfos SP	3875	Kontula y col. 1980 (88)
14	Linfos SP	4850±1340	Ho y col. 1981 (89)
18	Linfos SP	7069±682	Nanni y col. 1982 (82)
9	Linfos SP	6617±979	Schlechte y col.1982(90)
10	Linfos SP	3284	Crabtree y col. 1978(59)
7	Linfos SP	4668	Shipman y col. 1983 (91)
?	Linfos SP	2500	Lippman y col. 1982 (85)

* media ± desviación típica.

El número de sitios de unión en linfocitos de SP ha sido muy variable en los diferentes estudios revisados (CRABTREE, G.R., y col. 1978)(59); (NANNI, P., y col. 1982)(82); (LIPPMAN, M.E., 1982)(85); (SMITH, K.A., CRABTREE, G.R., KENNEDY, S.J., and MUNCK, A., 1977)(86); (NEIFELD, J.P., LIPPMAN, M.E., and TORMEY, D.C., 1977)(87); (KONTULA, K., ANDERSON, J.L., PAAVONEN, T., MYLLILA, G., TEERENMOVI, L., and VUOPIO, P., 1980)(88); (HO,

A.D., HUNSTEIN, W., and SCHMID, W., 1981)(89); (SCHLECHTE, J.A., GINSBERG, B.H., and SHERMAN, B.M., 1982)(90); (SHIPMAN, G.F., BLOOMFIELD, C.D., KAZIMIERA, J.G.P., MUNCK, A., and SMITH, K., 1983)(91), y oscila entre 3 y 7000 sitios/célula.

No se han encontrado diferencias significativas entre las células T y B (Vease Tabla nº 3) pero se ha sugerido que las T son heterogéneas en cuanto a la cantidad de RG (DISTELHORST, C.W., and BENUTTO, B.M., 1981)(92).

TABLA Nº 3.

CUANTIFICACION DE RG EN SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS DE SUJETOS NORMALES.

Enf.	Tipo Cel.	RG(sitios/célula)	Autor (Blg.)
4	Cell no T	2892±1068 *	Lippman y col. 1977 (96)
5	Cell T	3130±1316	"
5	T+Null	4680	Homo y col. 1979 (98)
5	B	3650	"

* media ± deviación típica.

Algunos autores han comparado la cantidad de RG en las células tímicas (HOMO, F., and DUVAL, D., 1979)(93) y en nódulos linfoides (BLOOMFIELD, C.D., SMITH, K.A., HILDEBRANDT, L., 1980)(94) con los resultados obtenidos en SP (vease Tabla nº 2). Los valores han sido equiparables. Por el contrario los niveles de RG encontrados en MO de sujetos normales (COSTIOW, M.E.,

CHING-HON PUI, and DAHL, G.V., 1982)(95) son de tres a cinco veces superiores que los encontrados en cualquiera de los otros tejidos linfoides a los que anteriormente nos hemos referido.

La depleción monocitaria previa a la determinación de RG en linfocitos de SP parece ser necesaria (DISTELHORST, C.W., y col. 1981)(92); (LIPPMAN, M.E., and BARR, R., 1977)(96) para que los resultados obtenidos sean fiables, ya que los monocitos contienen aproximadamente dos veces más receptores que los linfocitos normales.

Cuando los linfocitos son estimulados con mitógeno se produce un incremento en el número de RG que viene a ser aproximadamente el triple del que en principio se tenía (NEIFELD, J.P., y col. 1977)(87); estos resultados han sido confirmados por otros autores (NANNI, P. y col. 1982)(82).

En orden a considerar los efectos de los esteroides sobre la viabilidad celular parece que las células linfoides de humanos son extremadamente resistentes si se comparan con las de los roedores (HOMO-DELARCHE, F., 1984)(97). Los Timocitos humanos parecen ser muy sensibles a la acción inhibitoria de estas hormonas (HOMO, F., y col. 1979)(93), por el contrario los linfos de SP y de Nódulos linfoides son afectados en menor cuantía (BLOOMFIELD, C.D., y col. 1980)(94); (HOMO, F., DUVAL, D., THIERRY, C., and SERROU, B., 1979)(98). Estas diferencias observadas entre Timocitos y Linfocitos se deben probablemente al diferente estadío y proliferación celular (HOMO-DELARCHE, F., 1984)(97).

In vitro son generalmente considerados como agentes catabólicos que inducen a la inhibición del transporte de membrana y de

la síntesis de importantes macromoléculas que intervienen en el crecimiento celular lo que acarrea la lisis de las células (MUNCK, A., and YOUNG, D.A., 1975)(99). Esto complicaría las funciones inmunológicas in vitro (BACH, J.F., 1975)(100).

In vivo la administración de corticoides en adrenalectomizados se ha demostrado que induce a marcados cambios en el tamaño de los órganos linfoides, en la circulación de linfocitos y modificaciones de las reacciones inmunológicas (CLAMAN, H.N., 1972)(14), datos a los que ya nos hemos referido en el apartado correspondiente.

Aunque muchos estudios han intentado determinar la efectividad de los glucocorticoides sobre los tejidos de las leucemias humanas muy pocos en la actualidad han hecho extensiva esta idea a nivel de las células blancas de sujetos normales. SHIPMAN, G.F. y col. (1983)(91) han estudiado las modificaciones inducidas por estas hormonas sobre el número de RG y la duración de sus efectos en linfocitos de SP de 7 voluntarios normales, encontrando un descenso de los niveles basales de receptor en 6 sujetos, y un incremento sobre los valores iniciales de RG en el séptimo, por el contrario SCHLECHTE, J., and SHERMAN, B., (1981)(101) han reportado recientemente que el número de RG y el de linfocitos circulantes disminuye tras su exposición a los esteroides. La magnitud de la caida ha sido similar al encontrado por otros autores (SHIPMAN, G.F., BLOOMFIELD, C.D., SMITH, K.A., PETERSON, B.A., and MUNCK, A., 1981)(102) en las células neoplásicas de pacientes con leucemia y linfoma.

Algunos autores (SHIPMAN, G.F., y col. 1983)(91); (SCHLECHTE, J., y col. 1981)(101); (BLOOMFIELD, C.D., SMITH, K.A.,

PETERSON, B.A., 1980)(103) han postulado que los niveles de RG podrían ser de utilidad para predecir la respuesta a la cortico-terapia. Para que esta afirmación pueda ser considerada es preciso como mínimo que los pacientes no hayan recibido en las tres semanas previas a la determinación de RG terapia con esteroides (SCHLECHTE, J.A., y col. 1982)(90); (SHIPMAN, G.F., y col. 1983)(91). Ello se sugiere en orden de hacer una correcta interpretación de los valores obtenidos.

El significado fisiológico del descenso de los niveles de RG tras el tratamiento no ha sido determinado sin embargo a la luz de los estudios in vitro (BOURGEOIS, S., and NEWBY, R.H., 1977)(104).

LEUCOSIS LINFOBLASTICA AGUDA (LLA).

Los Glucocorticoides vienen siendo utilizados en el tratamiento de las LLA, bien solos o formando parte de los protocolos de Quimioterapia desde hace dos décadas (BIRD, C.C., 1979)(105). Con su utilización, y una más correcta aplicación de los tratamientos, se ha conseguido un incremento en la tasa de las Remisiones Completas del orden del 45-65% (LIVINGSTON, R.B., and CARTER, S.K., 1970)(106), sin embargo en la Recaida la inducción a una nueva Remisión ha dado resultados en unicamente un 25% de estos enfermos (VIETTI, T.J., y col. 1965)(4); (GOLDIN, A., SANDBERG, J.S., and HENDERSON, E.S., 1971)(107)

En orden a incrementar la respuesta y la supervivencia en esta forma de Leucemia y de minimizar el riesgo que conlleva el uso de la terapia esteroidea han sido cuantificados los RG por numerosos grupos de estudio.

Los primeros ensayos efectuados al respecto por LIPPMAN, M.E., y col. en 1973 (74) mostraron unos esperanzadores resultados ya que se confirmó que aquellos pacientes que recibieron terapia esteroidea y entraron en remisión tenían altos valores de Receptor si se les comparaba con aquellos que no tuvieron respuesta y fueron refractarios al tratamiento.

Estos autores cuantificaron el número de RG mediante Ensayo Citoplasmático (EC).

En la actualidad la mayoría de los investigadores revisados cuantifican mediante ECT, al demostrarse la mayor fiabilidad de este método sobre el anterior (MARCHETTI, P., y col. 1981)(80).

Los valores obtenidos los exponemos en la Tabla nº 4.

TABLA Nº 4.

CUANTIFICACION DE RG MEDIANTE ECT EN LAS LLA.

Enf.	Tipo Cel.	RG(sitios/célula)	Autor (Blg.)
SP			
27	Null (N)	2936-21869	Konior Yabro y col.1977(109)
18	T (N)	0-5887	"
23	Null+B+T (N+A)	2560-19160	Homo y col. 1980 (112)
19	? (N)	688-20791	Iacobelli y col. 1980 (79)
12	Null (N)	19768	Naray y col. 1980 (110)
1	T (N)	4077	"
2	B (N)	2850	"
29	Null (N+A)	13579±11434	Marchetti y col. 1981 (80)
8	T+B (N+A)	4171.6±2517.3	"
10	Pre-B (N)	21000	Crist y col. 1979 (108)
14	Null (N)	14000	"
9	T (N)	2500	"
14	Null+T (A)	1348-18697	Bloomfield y col. 1981(103)
19	Comun+B+T(N+A)	1433-26858	Ho y col. 1981 (89)
8	Null+B+T (N+A)	8495±1621	Nanni y col. 1982 (82)
MO			
122	Comun (N)	2480-79364 (21329)	Costiow y col. 1982 (95)
35	T (N)	9016-37072 (9016)	"
5	B (N)	1115-8872 (5897)	"
11	Indiferen.	9265-29574 (20992)	"

(N) - Niños. (A) - Adultos. (N+A) - Niños + Adultos.

Los valores encontrados han sido similares (CRABTREE, G.R., y col. 1978)(59); (SHIPMAN, G.F., y col. 1981)(102) o superiores (IACOBELLI, S., y col. 1981)(84) a los detectados en el resto de las enfermedades hematológicas, si bien para NANNI, P., y col. (1982)(82) han sido inferiores a los detectados por ellos en LANL. Las cuantificaciones han sido efectuadas en blastos de SP.

COSTIOW, M.E., y col. (1982)(95) han cuantificado los RG en aspirados de MO de 173 niños con LLA encontrando valores muy superiores a los anteriormente reseñados, dado que el número de sitios de unión se situó entre 2248 y 79364. Estos autores sugieren que esta discrepancia entre SP y MO vendría dada por daños en las conservaciones de las células más que a diferencias entre el contenido de R entre ambas poblaciones. Sería preciso efectuar estudios comparativos que den la solución definitiva (HOMO-DELARCHE, F., 1984)(97).

Algunos grupos han intentado establecer una correlación entre el contenido de RG y los marcadores inmunológicos de las LLA. Estos estudios no han llevado a conclusiones pertinentes pues si bien las LLA "Null" de los niños parece ser que contienen más Receptores que las Leucemias de células "T" (COSTIOW, M.E., y col. 1982)(95); (CRIST, W., VOGLER, L., SARRIF, A., 1979)(108); (KONIOR YARBRO, G.S., LIPPMAN, M.E., JOHNSON, G.E., and LEVETHAL, B.G., 1977)(109); (NARAY, A., REVESZ, T., WALCZ, E., SCHULER, D., and HORVATH, I., 1980)(110), la misma correlación en adultos parece ser escasamente llamativa (BLOOMFIELD, C.D., y col. 1981)(83); (HOMO, F., y col. 1979)(98). En lo concerniente a la línea de células "B" parece ser que éstas muestran más receptores que las Null (CRIST, W., y col. 1979)(108); (NARAY, A. y col.

1980)(110), aunque MARCHETTI, P., y col. (1981)(80) discrepan de estos resultados ya que ellos han encontrado que tanto las células T como las B tienen una menor concentración de RG que las células Null.

Recientemente se han intentado determinar los efectos citolíticos del cortisol en los diferentes tipos de LLA mediante anticuerpos monoclonales y rosetas (GALILI, N., and GALILI, U., 1983)(111). Las células linfoides de 20 pacientes con LLA "Null" fueron resistentes a los efectos citolíticos del cortisol, mientras que las de diez con leucemia pre-"B" fueron lisadas. Las células de 5 pacientes con células "T" jovenes fueron más resistentes que los dos con células "T" maduras. Esto sugiere que los efectos inhibitorios de los "G" vendrían determinados en base a la diferenciación celular.

Por otra parte LIPPMAN, M.E., (1982)(85) ha comparado, en niños, los niveles de RG al diagnóstico y tras tratamiento con combinaciones quimioterápicas, encontrando que pacientes con altos niveles de RG y LLA "Null" tenían remisiones de más larga duración. En cambio pacientes con linfoblastos "T" y baja cantidad de RG tenían una duración de la remisión más corta.

En estudios con un limitado número de pacientes, no se ha encontrado correlación significativa entre el contenido de RG, la edad y el contaje leucocitario inicial (IACOBELLI, S., y col. 1980)(79); (MARCHETTI, P., y col. 1981)(80); (KONIOR YARBRO, G.S., y col. 1977)(109); (HOMO, F., DUVAL, D., HAROUSSEAU, J.L., MARIE, J.P., and ZITTOUN, R., 1980)(112). Sin embargo tras el estudio de un gran número de casos, COSTIOW, M.E., y col.

(1982)(95) encuentra bajos niveles de RG en MO en edades menores de 2 y mayores de 10 años, alto contaje de leucocitos, SNC afectado, masas mediastínicas y raza negra; todos ellos reconocidos como altos factores de riesgo en las leucemias (THIEL, E., RODT, H., HUHN, D., 1980)(113).

Igualmente se ha pretendido buscar una relación entre los niveles de RG de las LLA con todos los parámetros antes mencionados y con la sensibilidad in vitro a los esteroides, con escaso éxito (CRABTREE, G.R., SMITH, K.A., and MUNCK, A. 1979)(114); (HO, A.D. y col. 1981)(89); (HOMO, F., y col. 1980)(112); (IACOBELLI, S., y col. 1980)(79); (MASTRANGELO, R., MALANDRINO, R., RICARDI, R., LONGO, P., RANELLETTI, F.O., and IACOBELLI, S., 1980)(115). Posiblemente se puede interpretar la ausencia de correlación entre el contenideo de RG y la sensibilidad in vitro por la heterogenicidad de estas células. Por esta razón HOMO, F., y col. (1980)(112) han distribuido los pacientes en dos grupos, seleccionados en base a la presencia o ausencia de células blásticas en la fase S del ciclo celular, usando para su análisis pulsos citofotométricos. Ellos encontraron que el efecto inhibitorio de la dexametasona in vitro era más alto en aquellos pacientes cuyas células se encontraban en la fase S del ciclo celular.

La terapia antileucémica incluye usualmente, junto con los "G", dos o tres drogas antineoplásicas más, lo que dificulta el valorar la eficiencia clínica de los "G" in vivo como respuesta a los niveles de RG. En orden a evitar esta dificultad algunos investigadores han intentado correlacionar los niveles de RG con una terapia de "G" de corta duración. Los pacientes se han se-

leccionado en base a su escasa circulación de células blásticas, menor del 50%, y parece ser que el número de RG es más alto en aquellos enfermos sensibles al tratamiento (MARCHETTI, P., y col. 1981)(80); (HO, A.D., HUNSTEIN, W., GANESHAGURU, K., HOFFBRAND, A.W., BRANDEIS, W.E., and DENK, B., 1982)(116).

Para BLOOMFIELD, C.D., y col. (1981)(83) los niveles de RG no guardan correlación con la respuesta a la combinación quimioterápica, duración de la remisión o supervivencia en adultos.

Para concluir: no parece existir una clara correlación entre los niveles de Receptores de Glucocorticoides y la acción de los esteroides in vitro. Por el contrario la cantidad de RG guarda paralelismo con la sensibilidad a estos fármacos in vivo, con lo que se podrían intentar seleccionar, de acuerdo con la edad y tipo inmunológico (particularmente en niños) a aquellos pacientes que más podrían favorecerse con este tratamiento (HOMO-DELARCHE, F., 1984)(97).

LEUCOSIS LINFOIDE CRONICA (LLC).

La Leucosis Linfoide Crónica es una enfermedad de amplia variabilidad en su agresividad clínica, oscilando entre un proceso indolente, de muchos años de evolución que no requiere tratamiento, hasta un proceso de curso acelerado, que puede conducir a la muerte del paciente en menos de un año. El régimen de terapia seguido mas comunmente incluye el uso del Clorambucil, con o sin Prednisona (FERNANDEZ, L.A., MacSWEEN, J.M., and LANGLEY, G.R., 1978)(117).

Mientras que unos autores han indicado que los pacientes tratados con la combinación LEUKERAN+PRN han tenido una mortalidad más elevada, y que la muerte acontece subsiguiente a infecciones severas que ellos atribuyen a la adicción de la terapia esteroidea (GALTON, D.A.G., WILTSHAW, E., SZUR, L., and DACIE, J.V., 1961)(118); (BOGGS, D.R., SOFFERMAN, S.A., WINTROBE, M.M., and CARTWRIGHT, G.E., 1966)(119), otros (HAN, T., EZDINLI, E.Z., SHIMAOKA, K., and DESAI, D.V., 1973)(120) por el contrario han informado que la supervivencia a corto plazo ha sido superior en aquellos pacientes tratados con ambos fármacos, si bien al cabo de dos años la supervivencia alcanzada ha sido idéntica al grupo de enfermos que no recibieron esteroides.

En orden a seleccionar y mejorar los resultados terapéuticos y a alargar la vida media de estos enfermos han sido cuantificados los RG por numerosos grupos de estudio que abarcan a más de 100 pacientes con LLC (CRABTREE, G.R., y col. 1979)(114); (GAILANI, S., y col. 1975)(76); (HO, A.D., y col. 1981)(89); (HOMO, F., DUVAL, D., MEYER, P., BELAS, F., DEBRE, P., and BINET, J.L.,

1978)(121); (KONTULA, K., y col. 1980)(88); (NANNI, P., y col. 1982)(82); (SIMONSSON, B., y col. 1982)(72); (STEVENS, J., STEVENS, Y.W., and ROSENTHAL, R.L., 1979)(122); (STEVENS, J., STEVENS, Y.W., SLOAN, E., ROSENTHAL, R., and RHODES, J., 1978)(123); (TERENIUS, L., SIMONSSON, B., and NILSON, K., 1976)(124); (SLOMAN, J.C., and BELL, P.A., 1979)(125).

En aquellos estudios en los que para la determinación de los RG se ha empleado el Ensayo Citoplasmático (SIMONSSON, B., y col. 1982)(72); (GAILANI, S., y col. 1975)(76); (TERENIUS, L., y col. 1976)(124) la detección de niveles de receptor ha sido en unos pacientes si y en otros no, como exponemos en la Tabla nº 5.

TABLA Nº 5.

CUANTIFICACION DE RG MEDIANTE EC EN LAS LLC.

Enf.	RG(fmol/mg.pro.)	Autor	Blg.
8	0	Gailani y col. 1975	(76)
27	17 con RG medibles	Terenius y col.1976	(124)
52	46 con RG medibles	Simonson y col.1982	(72)

Sin embargo cuando se empleó el Ensayo Celular Total la presencia de sitios de unión para Glucocorticoides ha sido detectada en todos los estudios, con valores similares (KONTULA, K., y col. 1980)(88); (HO, A.D., y col. 1981)(89) o incluso más bajos (NANNI, P., y col. 1982)(82); (CRABTRE, G.R., y col. 1978)(59) que los detectados por otros autores en linfocitos de SP, vease

Tabla nº 6.

TABLA Nº 6.

CUANTIFICACION DE RG MEDIANTE ECT EN LAS LLC.

NºEnf.	Tipo Cel.	RG(sitios/célula)	Autor (Blg.)
21	SP	6000±4000	Homo y col. 1978 (121)
17	SP	3423±666	Sloman y col. 1979 (125)
6	SP	3850±773	Kontula y col. 1980 (88)
11	SP	4500	Ho y col. 1981 (89)
6	SP	2912±884	Nanni y col. 1982 (82)
14	SP	2032±69	Stevens y col. 1978 (123)
12	SP	2119	Crabtree y col. 1978(59)

Recientemente HO, A.D., y col. (1981)(89) han demostrado la existencia de correlación positiva entre el bajo contenido de RG y la no respuesta al tratamiento, al observar como las células de pacientes tratados durante 2-5 años con una combinación de Clorambucil+Prednisona que se hicieron resistentes a la terapia, contenian bajos niveles de receptor si se les comparaba con pacientes LLC diagnosticados de nuevo.

También se ha intentado correlacionar la cantidad de RG con la sensibilidad in vitro a los esteroides con escaso exito (HO, A.D., y col. 1981)(89); (IACOBELLI, S., y col. 1980)(79); (CRABTRE, G.R., y col. 1979)(114); (STEVENS, J., y col. 1979)(122), los aspectos metabólicos y ultraestructurales de esta lisis han

sido claramente definidos por GALILI, U., LEIZEROWITZ, R., MOREB, J., GAMLIEL, H., GURFEL, D., and POLLIACK, A. en 1982 (126), ellos observaron que concentraciones farmacológicas de cortisol provocan cambios secuenciales en el citoplasma celular, con hinchazón de las mitocondrias y descomparmentización citoplasmática, seguido de la perdida de la superficie de los micropilis que aparecen como agujeros en la membrana celular, y la subsiguiente condensación de la cromatina nuclear. Ellos postulan que la existencia de estos abultados agujeros en la membrana celular, que aparecen tras 6 horas de incubación con la hormona, pueden ser la causa de la penetración de la tinción vital dentro de las células muertas.

Parece, sin embargo, que la inhibición de la captación de la Uridina inducida por Dexametasona es más importante en las células de los pacientes con LLC que en las células lifocitarias periféricas de sujetos normales, y que este incremento de la sensibilidad in vitro a los esteroides tiene importancia significativa en esta enfermedad (HOMO, F., y col. 1978)(121). De forma similar se ha observado que los linfocitos de las LLC, en contraste con los linfos normales, son más sensibles in vitro a la acción citotóxica de los Glucocorticoides (GALILI, U., y col. 1980)(32); (SCHREK, R., 1964)(127).

LEUCOSIS AGUDA NO LINFOBLASTICA (LANL).

Numerosos grupos de estudio utilizan Glucocorticoides, junto con el tratamiento Citostático en los enfermos de LANL, y unos muestran unas remisiones más amplias con el uso de los esteroides mientras que otros señalan un agravamiento dramático de la enfermedad (KNOSPE, W.H., y col. 1966)(6); (SHANBROM, E., and MILLER, S., 1962)(128).

Con idea de mejorar los resultados terapéuticos se ha intentado correlaccionar el contenido de RG como si fuese representativo de la sensibilidad a los esteroides tanto in vivo como in vitro, y con ello utilizarlos como índices de tratamiento (CRABTREE, G.R., y col. 1979)(114).

Los primeros estudios para cuantificar los RG en las LANL fueron efectuados mediante EC. Empleando este método LIPPMAN, M.E., y col. en 1975 (75) encontraron niveles apreciables en unicamente tres pacientes de los 16 por ellos estudiados. Igualmente GAILANI, S., y col. (1975)(76) detectaron valores muy escasos y no en todos los enfermos.

La cuantificiación de los mismos mediante ECT por varios grupos de estudio, según se expone en la Tabla nº 7, arroja valores de RG en todos los pacientes, valores que son superiores a los encontrados en LLC (IACOBELLI, S., y col. 1981)(84) y Normales (NANNI, P., y col. 1982)(82); (IACOBELLI, S., y col. 1981)(84) , y similares (CRABTREE, G.R., y col. 1978)(59); (SHIPMAN, G.F., y col. 1981)(102), a los detectados en LLA.

TABLA Nº 7.

CUANTIFICACION DE RG MEDIANTE ECT EN LAS LANL.

NºEnf.	Tipo Cel.	RG(sitios/célula)	Autor (Blg.)
11	SP	10547+2626	Nanni y col. 1982 (82)
4	SP	2000-8000	Shipman y col. 1981 (102)
1	SP	12000	Homo y col. 1981 (141)
1	SP	5800	"
1	SP	9600	"
1	MO	26000	"
36	SP	4300-28400(8800)	Crabtree y col.1981 (129)
12	SP	14954+10083	Iacobelli y col.1981 (84)
15	SP	13230-1920(4811)	Crabtree y col. 1978 (59)
KG-1		10300	Koefler y col. 1980 (132)
HL-60		15600	"

Comparaciones entre ambos ensayos (ECT versus EC) aplicadas a las LANL han sido efectuadas por IACOBELLI, S., y col. (1981)(84). Estos autores encuentran grandes diferencias en las cuantificaciones de RG obtenidas por ambos métodos atribuyendolo a un posible defecto de traslocación del Receptor del citoplasma al núcleo. Por el contrario para NANNI, P., y col. (1982)(82) los valores obtenidos son facilmente equiparables.

En un estudio efectuado sobre 36 LANL por CRABTREE, G.R.,

BLOOMFIELD, C.D., SMITH, K.A., McKENNA, R.W., and PETERSON, B.A. en 1981 (129) el número de RG fue similar entre las distintas Leucosis estudiadas y clasificadas segun la FAB (BENNET, J.M., CATOVSKY, D., DANIEL, M.T., 1976)(130) siendo las M_2 las que mostraron resultados más dispares (CRABTREE, G.R., y col. 1981)(129).

El efecto de los Glucocorticoides sobre la incorporación de H_3T, H_3L y H_3U ha sido evaluado por algunos grupos y correlacionado con los valores de RG. Los estudios revisados avalan la heterogenidad de respuestas exhibidas por las LANL in vitro (CLINE, M.J., and ROSENBAUM, E., 1968)(131); (CRABTREE, G.R., y col. 1978)(59). Así efectos estimulatorios han sido encontrados por CRABTREE, G.R., y col. (1978)(59), CRABTREE, G.R., y col. (1981)(129), CLINE, M.J., y col. (1968)(131), y NANNI, P., y col. (1982)(82). Sin embargo predominan los efectos citolíticos, tal y como otros autores han visto aplicadas a las LLA (CRABTREE, G.R., y col. 1978)(59). Los efectos estimulatorios e inhibitorios observados no se ha visto que esten claramente relacionados con la clasificiación de las FAB (CRABTREE, G.R., y col. 1981)(129); (BENNET, J.M., y col. 1976)(130).

Dado que las LANL muestran niveles de RG comparables a los exhibidos por las LLA (CRABTREE, G.R., y col. 1978)(59); (SHIPMAN, G.F., y col. 1981)(102); (CRABTREE, G.R., y col. 1981)(129), y que estos Receptores son capaces de mediar respuesta fisiológica (KOEFFLER, H.P., GOLDE, D.W., and LIPPMAN, M.E., 1980)(132), es improbable que defectos basales, cualitativos o cuantitativos, sean los responsables de la relativa resistencia a la terapia esteroidea mostrada por las LANL si se las compara con las LLA

(CRABTREE, G.R., y col. 1981)(129).

IACOBELLI, S., RANELLETI, F.O., LONGO, P., RICARDI, R., and MASTRANGELO, R. ya indicaron en 1978 (133) el hecho de LMMA cuyas células contenian RG e in vitro los esteroides determinaban inhibición de la síntesis de proteinas de RNA y DNA, como, paradojicamente, en estos pacientes la terapia con Glucocorticoides llevaba a la estimulación, que no a la inhibición, de la proliferación de las células leucémicas. Estos autores lo atribuían a que los esteroides actuaban sobre un factor desconocido pero presente in vitro, lo que sugiere muy claramente que las condiciones experimentales no son un reflejo exacto de las situaciones in vivo.

In vivo es posible que estas hormonas no afecten unicamente y de forma directa a las células leucémicas, sino que probablemente también ejerzan su efecto alrededor de las células hematopoyéticas (KOEFFLER, M.P., and GOLDE, D.W., 1980)(134). Numerosos factores, que incluyen Glucocorticoides y catecolaminas, se sabe que controlan la proliferación y diferenciación de las células derivadas del stem-cell granulocito-monocito (GOLDE, D.W., and CLINE, M.J., 1978)(135); (HONMA, Y., KASUKABE, T., OKABE, J., and HOZUMI, M., 1977)(136); (HONMA, Y., KASUKABE, T., and HOZUMI, M., 1978)(137). El posible papel de las Prostaglandinas como factores que indirectamente miden el efecto de los Glucocorticoides sobre la proliferación y/o diferenciación de las células mieloides ha sido igualmente postulado (KURLAND, J.I., PELUS, L.M., RALPH, P., BOCKMAN, R.S., and MOORE, M.A., 1979)(138); (TAETLE, R., and KOESSLER, A., 1980)(139). Así HONMA, Y., KASUKABE, T., and HOZUMI, M. (1979)(140) han estudiado recientemente el papel de la

Prostaglandina GE_2 (= PGE_2) en la diferenciación de las células Leucémicas mieloides del ratón (M_1). Ellos han demostrado que la PGE_2 producida por las M_1 células puede aumentar en presencia de Dexametasona, dando como resultado la diferenciación de dichas células. Igualmente HOMO, F., DURANT, S., DUVAL, D., MARIE, J.P., ZITTOUNT, R., and HAROUSSEAU, J.L. en 1981 (**141**) han observado que la Prostaglandina E_2 intensifica grandemente los niveles de incorporación de H_3T en los pacientes con LANL por ellos estudiados.

Tal vez los Glucocorticoides actuen a varios niveles en el curso de la diferenciación celular, primero inhibiendo la proliferación de las células y segundo acelerando la diferenciación y conminando estas a la producción de Prostaglandinas (HOMO, F., y col. 1980)(**112**); (KURLAND, J.I., y col. 1979)(**138**).

Estos efectos de los Glucocorticoides sobre la producción de prostaglandinas pueden ser los responsables de los efectos estimulatorios observados in vivo e in vitro inducidos por los Glucocorticoides en algunos casos de Leucosis mieloides (HOMO, F., y col. 1981)(**141**), y las interrelaciones entre la proliferación y diferenciación durante el ciclo celular (ERNST, P., and KILLMAN, S.A., 1970)(**142**); (FRANKFURT, O.S., 1968)(**143**); (HARMON, J.M., NORMAN, M.R., FOWLKES, B.J., and THOMPSON, E.B., 1979)(**144**) pueden ser a su vez las causas de las discrepancias observadas en estos experimentos.

Por todo ello es por lo que la mayoría de los autores revisados (NANNI, P., y col. 1982)(**82**); (HOMO, F., y col. 1981)(**141**); (IACOBELLI, S., y col. 1981)(**84**); (KOEFFLER, H.P., y col.

1980)(132); (CRABTREE, G.R., y col. 1978)(59) concuerdan en afirmar que la determinación de RG en blastos de las LANL y el efecto de estos sobre la incoporación de isótopos (H_3T, H_3^U y H_3L) no son indicadores adecuados para valorar la posible eficacia clínica de los Glucocorticoides en este tipo de Leucemias, si bien CRABTREE, G.R., y col. (1981)(129) sugieren que el amplio rango de respuestas exhibidas in vitro por las células de las LANL sería un medio que serviría para identificar a aquellos pacientes que se beneficiarían de la terapia con esteroides.

LEUCOSIS MIELOIDE CRONICA EN CRISIS BLASTICA (LMC Ag).

Los estudios sobre la cuantificación de Receptores de Glucocorticoides en las LMC Ag no son muy frecuentes en la literatura revisada.

Para NANNI, P., y col. (1982)(82) la cuantificación de RG en esta forma de Leucemia, mediante ECT, arroja valores similares a los detectados por ellos mismos en las LANL (10978 $\pm$ 2325), sin embargo la inhibición de la captación de Timidina tritiada (H_3^T) por la Dexametasona fue similar a la exhibida por las LLA, no encontrandose correlación entre el patrón de Receptor, la sensibilidad in vitro a los Glucocorticoides y la Respuesta clínica a la terapia en esta enfermedad. Es preciso hacer notar que estos autores estudian a unicamente seis enfermos.

LINFOMAS NO HODGKIN.

Los Glucocorticoides forman parte de la terapia utilizada en los Linfomas malignos no Hodgkin (BAGLEY, C.M., DeVITA, V.T.Jr., BERARD, C.W., and CANELLOS, G.P., 1972)(145); (CANELLOS, G.P., LISTER, T.A., and SKARIN, A.T., 1978)(146); (COLTMAN, C.A., LUCE, J.K., McKELVEY, E.M., JONES, S.E., and MOON, T.E., 1977)(147); (DeVITA, V.T.Jr., CANELLOS, G.P., CHABNER, B., SCHEIN, P., HUBBARD, S., and YOUNG, R.C., 1975)(148); (SCHEIN, P.S., DeVITA, V. T. Jr., HUBBARD, S., 1976)(149). Sin embargo numerosos estudios revisados sugieren que algunos pacientes pueden no ser sensibles a este tratamiento (EZDINLI, E.Z., y col. 1969)(2); (FORTUNY, I.E., THEOLOGIDES, A., and KENNEDY, B.J., 1972)(150); (JONES, S.E., ROSENBERG, S.A., KAPLAN, H.S., KADIN, M.E., and DORFMAN, R.F., 1972)(151); (LIVINGSTONE, R.B., and CARTER, S.K., 1970)(152), y algunos detectan un incremento de las manifestaciones tóxicas derivadas de su uso, particularmente en pacientes ancianos (McKLEAN, J.W., KIELY-GRANDBOIS, K., HURD, D.D., PETERSON, B.A., and BLOOMFIELD, C.D., 1983)(153).

Diversos grupos de estudio han determinado los niveles de Receptores de Glucocorticoides en estos pacientes con objeto de predecir la respuesta a la terapia esteroidea. Los resultados obtenidos, mediante el empleo del ECT, se exponen en la Tabla nº 8.

TABLA Nº 8.

CUANTIFICACION DE RG MEDIANTE ECT EN LINFOMAS NO HODGKIN.

NºEnf.	RG(sitios/célula)	Autor (Blg.)
13	5870*	Bloomfield y col.1980 (103)
15	3461**	"
5	7000-2000	Shipman y col. 1981 (102)
6	2690-477	Crabtree y col. 1978 (59)
46	12919-755(3841)	Bloomfield y col.1981 (154)
35	5681*	"
	2454**	"
47	4301*	Bloomfield y col. 1984 (155)
	4024*	"
	2049**	"

* = Respondieron al tratamiento.
** = No respondieron al tratamiento.

Los estudios revisados (CRABTREE, G.R., y col. 1978)(59); (SHIPMAN, G.F., y col. 1981)(102); (BLOOMFIELD, C.D., y col. 1980)(103); (BLOOMFIELD, C.D., SMITH, K.A., PETERSON, B.A., GAJL-PECZALSKA, K.J., and MUNCK, A.U., 1981)(154); (BLOOMFIELD, C.D., MUNCK, A.U., and SMIYH, K.A., 1984)(155), indican que todos los Linfomas presentan niveles de Receptor medibles, superiores a los detectados en los linfocitos de los nódulos linfoides no malignos (BLOOMFIELD, C.D., y col. 1981)(154), existiendo un amplio rango en el número de RG entre los distintos Linfomas estudiados, que no es posible predecir por la histología del tumor (BLOOMFIELD,

C.D., y col. 1980)(103), e incluso que estos niveles obtenidos simultaneamente del mismo sujeto y de diferentes tejidos tumorales de él, a menudo son variables (BLOOMFIELD, C.D., y col. 1981)(154).

Parece ser que existe una correlación positiva entre el número de RG y la respuesta a cursos cortos de terapia con Glucocorticoides como agente único (BLOOMFIELD, C.D., y col. 1980)(103); (BLOOMFIELD, C.D., y col. 1984)(155); de forma que aquellos pacientes con más de 3000 sitios/célula suelen responder a este tratamiento (BLOMMFIELD, C.D., y col. 1980)(103); (BLOMMFIELD, C.D., y col. 1981)(154); (BLOMMFIELD, C.D., y col. 1984)(155). De igual manera se ha observado que los niveles de RG en la recaida han sido usualmente más bajos que al diagnóstico en aquellos pacientes que recibieron terapia con esteroides y respondieron (BLOMMFIELD, C.D., y col. 1981)(154).

El efecto de la Dexametasona sobre la incorporación de isótopos radioactivos (H_3T, H_3D y H_3U) ha sido igualmente evaluada en estos enfermos (BLOMMFIELD, C.D., y col. 1980)(103); (BLOMMFIELD, C.D., y col. 1981)(154); (BLOMMFIELD, C.D., y col. 1984)(155) y se ha encontrado que la inhibición de la captación de H_3T ha sido superior en aquellos enfermos que tuvieron una favorable respuesta al tratamiento frente a los que no respondieron (BLOMMFIELD, C.D., y col. 1984)(155).

Los autores revisados han correlacionado los niveles de RG con la respuesta a la terapia esteroidea como agente único, para hacer extensivos estos resultados a los regímenes de Quimioterapia se precisarían de futuros estudios.

IV.- VALORACION DE LOS ENSAYOS DE RECEPTORES DE GLUCOCORTICOIDES (RG) EN LAS ENFERMEDADES HEMATOLOGICAS.

Tras 10 años de investigaciones sobre los RG aplicados a las Leucemias humanas existen discrepancias en los resultados obtenidos por los diferentes grupos de estudio. La valoración de los mismos resulta ya de por sí difícil debido al diferente criterio seguido para la selección de pacientes y a las distintas técnicas utilizadas para la cuantificación de dichos Receptores. De forma que estos experimentos pueden ser criticables por:

A) EL TEJIDO BLANCO SELECCIONADO.

Numerosos autores emplean leucocitos obtenidos de sangre periférica, si bien algunos reconocen (MAUER, A.M., and FISHER, O., 1962)(156) que estos no reflejan fielmente la actividad proliferativa de la médula ósea. Estudios comparativos entre ambos revelan una mayor concentración de receptores en esta última (BLOOMFIELD, C.D., y col. 1981)(83); (COSTIOW, M.E., y col. 1982)(95).

La médula ósea, al ser el foco proliferativo tumoral, resultaría más apropiada para el estudio de RG que la sangre periférica, fundamentalmente en pacientes leucopénicos (HOMO-DELARCHE, F., 1984)(97) y aquellos estudios en los que se hayan seleccionado pacientes con blastos en MO y un 80-90% en sangre circulante conjuntamente con otros parámetros (tipo inmunológico, respuesta a la combinación quimioterápica) serían los que suministrarían resultados más aceptables (BLOOMFIELD, C.D., 1984)(157).

B) CONDICIONES PARA LA DETERMINACION CUANTITATIVA DE LOS RECEPTORES DE GLUCOCORTICOIDES.

Muchas de las discrepancias encontradas en los resultados son atribuibles a los diferentes procedimientos seguidos para hacer una valoración cuantitativa de los RG :

1) POR EL ENSAYO EMPLEADO:

Es un hecho conocido que EC y ECT se usan indiferentemente, a ello nos hemos referido previamente en su correspondiente apartado. Unicamente recordar aquí que el empleo del ECT, al ser el único capaz de estimar el número total de RG, es el idóneo a utilizar en determinaciones de Receptores hormonales en las células leucémicas (NANNI, P., y col. 1982)(82); (IACOBELLI, S., y col. 1981)(84); (HOMO-DELARCHE, F., 1984)(97); (BLOOMFIELD, C.D., 1984)(157).

2) POR EL MEDIO DE INCUBACION UTILIZADO:

Dado que existen numerosos factores que son capaces de modificar la interacción con el ligando, tales como: Glicerol; Cationes; Sacarosa; EDTA; ph; Detergentes iónicos; Esteroides y Enzimas. (KAINE, J.L., NIELSEN, C.J., and PRATT, W.B., 1975)(158); (KRIEGER, N.S., MIDDLEBROOK, J.L., and ARANOW, L., 1976)(159); (RAFESTIN-OBLIN, M.E., MICHAUD, A., CLAIRE, M., and CORVOL, P., 1977)(160); (SCHULTE, H.F., NIELSEN, C.J., SANDRO, J.J., and PRATT, W.B., 1976)(161); (SUTHERS, H.B., PRESSLEY, L.A., and FUNDER, J.W., 1976)(162). La unión esteroide-receptor se inhibe a altas temperaturas, e igualmente son sensibles a los

agentes bloqueantes de los grupos sulfidrilos (CASANDRA, R.S., y col. 1976)(12); (DUVAL, D., y col. 1978)(77).

Es igualmente imprescindible que las células a estudiar no sean tratadas con agentes que produzcan alteraciones en la membrana (neuraminidasa, fosfolipasa) o modifiquen sus propiedades (concavalina A) porque ellos inducen a la disminución del número de receptores (CRABTREE, G.R., y col. 1981)(68).

3) POR LA NATURALEZA DEL TRAZADOR:

El uso de esteroides sintéticos (Dexametasona por CRABTREE, G.R., y col. (1981)(68) y NANNI, P., y col. (1982)(82)); (Triancinolone acetonide por MARCHETTI, P., y col. (1981)(80)) disminuye la posibilidad de disociación del esteroide unido al receptor durante el procesamiento de las células. El esteroide endógeno (Cortisol) y las sustancias Transcortina-símil que ligan esteroide (WERTHAMER, S., SAMUELS, A.J., and AMARAL, L., 1973)(163) compiten con el trazador usado por los sitios de unión de la hormona. Si previamente no se ha hecho una correcta disociación de los mismos, los sitios de receptor quedarían enmascarados, falseando así los resultados (HOMO-DELARCHE, F., 1984)(97).

Los animales que normalmente se usan para la expermentación suelen estar adrenalectomizados para evitar la competición entre la hormona endógena y el trazador utilizado en el estudio. Sin embargo en humanos la presencia del esteroide endógeno obstruye en parte el número de sitios de receptor que pueden ser ocupados (DUVAL, D., y col. 1978)(77).

C) DETERMINACION DE LA SENSIBILIDAD O NO A LOS ESTEROIDES.

1) IN VIVO:

La evaluación y la respuesta in vivo a la corticoterapia es muy compleja y viene representa por la combinación de diferentes mecanismos, entre ellos la inhibición de la proliferación y lisis celular inducida por estas hormonas (HOMO-DELARCHE, F., 1984)(97) y la dificultad de determinar la eficacia de las mismas entre los otros agentes que se incluyen en los protocolos de quimioterapia (DUVAL, D., y col. 1978)(77).

Por otra parte es obvio que las perturbaciones in vivo causadas por los esteroides repercuten en el balance general hormonal, y por ende en el número de RG, en la función vascular, y en las reacciones inmunológicas que a su vez tienen una importancia considerable en la evolución de la leucemia (BLOOMFIELD, C.D., y col. 1981)(154). En la Tabla nº 9 resumimos las circunstancias que pueden modular el contenido de RG de forma fisiológica.

TABLA Nº 9.

MODULACION DEL CONTENIDO CELULAR DE RG.

Parámetro	Condiciones	Blg.
Nivel de esteroide en circulación.	Inyección de esteroide.	(164)
	Adrenalectomia.	(165)(166)(167)
	Stress.	?
	Ritmo circardiano.	?
	Terapia hormonal.	?
Naturaleza de la subpoblación celular	De origen inmunológico.	(168)(169)(109)(96)(170)
	Cambios del estado hormonal.	(171)(172)(173)
Diferenciación celular.	Ontogénesis.	(166)(174)(175)(176)(177)
	Ciclo celular.	(178)
	Transformación blastica.	(87)(86)
Condiciones metabólicas.		(69)(179)(180)
Otros.	Fosfolípidos.	(161)
	Esteroides.	(162)
	Moduladores desconocidos.	(181)(182)(183)(184)

Igualmente numerosos aspectos del papel de los esteroides no han sido suficientemente explorados. Estudios fidedignos recientes han encontrado altos niveles de la TRANSCORTINA en pacientes con leucemia linfoide y linfomas no Hodgkin (De MOOR, P., and LOUWAGIE, A., 1980)(185). Esta anormalidad se asocia con antíge-

nos HLA en los loci B o C. Estos resultados sugieren que los RG y la respuesta a la terapia esteroidea pueden tener influencia genética (BECKER, B., SHIN, D.H., PALMBERG, P.F., and WALTMAN, S.R., 1976)(186); (BUTLEY, M.S., ERICKSON, R.P., and PRATT, W.B., 1978)(187); (GUPTA, C., and GOLDMAN, A., 1982)(188) y que los niveles altos de transcortina ejerzan un papel en la modulación de los RG y la sensibilidad a los esteroides.

De la misma forma numerosos autores han descrito un incremento del metabolismo del cortisol en las células malignas linfoides (FORKER, A.D., BOLLINGER, R.E., MORRIS, J.H., and LARSON, W.E., 1963)(189); (JEMKINS, J.S., and KEMP, N.H., 1969)(190). Otros han mostrado un relativo metabolismo alto del cortisol tanto por las células B como por las células T y sugieren que esto provoca una resistencia importante al cortisol por las células B (KLEIN, A., BESSLER, H., HOOGERVORST-SPALTER, H., KAUFMANN, H., DJALDETTI, M., and JOSHUA, H., 1980)(191).

A pesar de esta dificultad algunos autores presentan la evidecia de que la sensibilidad a los esteroides guarda correlación con los niveles de RG en pacientes con LLA (NANNI, P., y col. 1982)(82); (HOMO-DELARCHE, F., 1984)(97) y linfomas (BLOOMFIELD, C.D., 1984)(157).

2) IN VITRO

Estudios efectuados sobre las líneas celulares del linfoma del ratón muestran que existe correlación entre los niveles de RG y la acción in vitro de los esteroides (KIRKPATRICK, A.F., MILHOLLAND, R.J., and ROSEN, F., 1971)(192); (ROSENAU, W., BAXTER,

J.D., ROUSSEAU, G.M., and TOMKINS, G.M., 1972)(193). Similares investigaciones efectuadas por BLOOMFIELD, C.D., y col. (1980)(103); BLOOMFIELD, C.D., y col. (1981)(154); BLOMMFIELD, C.D., (1984)(157) en humanos muestran idénticos resultados, no así las llevadas a cabo en clonas de LANL humanas (KOEFFLER, H.P., y col. 1980)(132). Tampoco el incremento de los niveles de RG resultante de la estimulación con Mitógenos se asocia con una significativa alteración del efecto de los esteroides in vitro (SMITH, K.A., y col. 1977)(86).

Se ha hecho notar que la acción inhibitoria de los Glucocorticoides in vitro es más marcada en aquellas poblaciones caracterizadas por unos niveles más altos de su actividad proliferativa (HOMO, F., y col. 1979)(93); (HOMO, F., y col. 1980)(112); (HOMO, F., y col. 1978)(121). GILLIS, S., CRABTREE, G.R., and SMITH, K.A., en 1979 (194) han postulado que la inhibición de la proliferación celular de los esteroides en las células estimuladas con Mitógeno es una acción indirecta (por supresión del factor de crecimiento de las células T), mientras que la acción directa sería sobre el nivel de la actividad linfocítica. Sin embargo la sensibilidad in vitro de los blastos leucémicos no se refleja con la respuesta in vivo a la combinación quimioterápica (BLOOMFIELD, C.D., 1984)(157).

Más recientemente se ha demostrado que los niveles de RG se asocian normalmente con la actividad de la Transferasa Terminal en células linfoides y en las de la LANL (NAKAO, Y., TSUBOI, S., FUJITA, T., MASAKOA, T., MORIKAWA, S., and WATANABE, S., 1981)(195); (SKOOG, L., NORDENSKJOID, B., OST, A., 1981)(196). Sin embargo estos resultados deben ir acompañados de estudios más

extensos que correlacionen ambos parámetros con marcadores inmunológicos y con la diferenciación celular (HOMO-DELARCHE, F., 1984)(97).

HOMO-DELARCHE, F. (1984)(97) y BLOOMFIELD, C.D. (1984)(157) afirman que las cuantificaciones de receptores de Glucocorticoides son un medio, que no el único, para valorar la posible eficacia a los esteroides aplicados en el tratamiento de las enfermedades hematológicas, siendo preciso determinar el papel que los factores antes expuestos desempeñan en la expresión de dichos Receptores y/o en el control de la respuesta celular.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Este trabajo está enfocado a la investigación de los Receptores de Glucocorticoides (RG) en pacientes con enfermedades hematológicas y en individuos normales.

Los fines perseguidos han sido los siguientes:

1º.- Estudio del nivel de Receptores, mediante un Ensayo Celular Total (ECT), en enfermos hematológicos al ser examinados por primera vez, antes del tratamiento (Grupo A).

2º.- Comparación de los niveles de RG en los distintos procesos hematológicos malignos estudiados: Leucosis Linfoblástica Aguda (LLA), Leucosis Aguda No Linfoblástica (LANL), Leucosis Linfoide Crónica (LLC) y Leucosis Mieloide Crónica en crisis blástica (LMC Ag).

3º.- Estudio de las modificaciones inducidas por el tratamiento en los niveles de RG.

4º.- Comparación de los niveles de Receptores con otros parámetros clínicos y de laboratorio simultaneamente recogidos en estos pacientes.

5º.- Comparación entre los niveles de RG y factores pronóstico tales como: consecución o no de la Remisión Completa (RC), tiempo transcurrido hasta la RC, duración de la primera Remisión y de la Supervivencia.

6º.- Estudios sobre la sensibilidad "in vitro" a la dexametasona en comparación con los niveles de RG.

7º.- Estudios de los mecanismos inductores que influyen sobre el aumento o disminución de los RG.

Para este estudio hemos utilizado un Ensayo Celular Total de Receptores de Glucocorticoides aplicados a 60 pacientes afectados por procesos hematológicos malignos, seguidos en el Servicio de Hematología del Hospital Universitario de Sevilla desde 1983 a 1986, y a 24 individuos normales investigados simultaneamente.

MATERIAL Y METODOS.

MATERIAL.

Han sido estudiados 60 pacientes hematológicos y 24 individuos normales -cuyas caracteristicas clínicas son expuestas a continuación- clasificados en uno de estos tres grupos:

Grupo A - Pacientes al diagnóstico, no tratados.

Grupo B - Pacientes previamente diagnoticados y tratados.

Grupo C - Normales.

El diagnóstico se estableció mediante técnicas habituales en Hematología: Frotis de sangre periférica; Médula ósea; Citoquímica; Estudios inmunológicos; etc.

En todos ellos han sido cuantificados los Receptores de Glucocorticoides (RG) mediante un Ensayo Celular Total (ECT), segun describimos posteriormente en Método. Los resultados obtenidos han sido evaluados en función del:

a) Grupo al que pertenecen (A, B o C).

b) Grupo y sexo.

c) Grupo y Estadío Clínico de RAI (para pacientes LLC) o Grupo y Clasificación FAB (para pacientes LANL y LLA).

d) Grupo y Respuesta al tratamiento, entendiendose como tal: Remisión Completa (desaparición de manifestaciones clínicas de la enfermedad, normalización de los parámetros hematológicos y presencia en MO de menos del 5% de células blásticas); Remisión Parcial (idem a RC pero presencia de células blásticas en MO, entre el 5% y el 40%) y Fallo (ausencia de respuesta al tratamiento y progresión de la enfermedad) para pacientes con LLA, LANL y LMC Ag. Enfermedad progresiva (enfermos que empeoran

clinicamente con un cambio de Estadío en el último año) o enfermedad no progresiva (pacientes cuya enfermedad no ha cambiado de Estadío en los últimos doce meses) para pacientes con LLC.

e) Grupo y supervivencia.

f) Comparación de los niveles de RG entre los procesos hematológicos estudiados y sujetos normales.

g) En un reducido número de pacientes LLC del Grupo A (los señalados con * en la Tabla nº 10) se ha estudiado además la sensibilidad in vitro a la dexametasona, segun técnica que se describe posteriormente en Método.

h) En tres sujetos normales (señalados con ADR en la Tabla nº 14) se evaluó la influencia de la adrenalina sobre el número de RG, al igual que en un paciente LLC, segun describimos posteriormente en Método.

A continuación hacemos una breve exposición de las caracteristicas clínicas de los pacientes y voluntarios normales estudiados.

I.- PACIENTES.

A) LEUCOSIS LINFOIDE CRONICA (LLC).

Han sido estudiados un total de 30 enfermos de ambos sexos (16 varones y 14 mujeres), con edades comprendidas entre los 43 y 82 años (Edad media 66,70 años), 17 pertenecientes al Grupo A y 13 al Grupo B. El tipo inmunológico se determinó mediante bolas de poliestileno marcadas con anticuerpos monoclonales (Quantigen T y B de Cultek) en 20 pacientes (células B en 18 enfermos;

células T en 2). Se siguió la clasificación clínica propuesta por RAI, K.A., SAWITSKY, A., CRONKITE, E.B., CHANANA, A.D., LEVY, R.N., and PASTERNACK, B.S. (1975)(197) y se estableció el Estadío clínico en todos ellos, siendo los Estadíos II (8 pacientes), III (7 pacientes) y I (7 pacientes) los que aglutinaron el mayor número de enfermos.

En la Tabla nº 10 se hace una exposición detallada de estos pacientes.

B) LEUCOSIS AGUDA NO LINFOBLASTICA (LANL).

Han sido estudiados un total de 19 pacientes de ambos sexos (12 varones y 7 mujeres), con edades comprendidas entre los 18 y 77 años (Edad media 46,74 años), 18 pertenecientes al Grupo A y uno al Grupo B. La distinción entre las distintas formas de Leucosis Mieloide se hizo en base a la Clasificación FAB (BENNETT, J.M., y col. 1976)(130), siendo las M_4 (8 enfermos), M_5 (5 enfermos) y M_1 (4 enfermos) las de más frecuente presentación, y las M_2 y M_3 (con un enfermo cada una) las más raras.

En la Tabla nº 11 se resumen sus características referentes a edad, sexo, FAB y grupo al que pertenecen.

TABLA Nº 10.

CARACTERISTICAS CLINICAS DE LOS PACIENTES LLC.

	Enf.	Sexo	Edad	Tipo celular	RAI	Grupo
	1º	H	72	-	II	A
	2º	V	80	B	II	A
(*)	3º	V	67	B	I	A
	4º	H	75	B	IV	A
(*)	5º	V	74	B	I	A
(*)	6º	V	68	B	II	A
(*)	7º	H	76	B	0	A
	8º	H	69	B	III	A
	9º	H	79	-	III	A
(*)	10º	V	50	B	I	A
	11º	V	58	-	I	A
(*)	12º	V	61	B	I	A
(*)	13º	V	43	B	II	A
	14º	H	74	-	I	A
(*)	15º	H	63	-	0	A
(*)	16º	V	64	-	0	A
	17º	V	50	T	III	A
	18º	V	65	B	IV	B
	19º	V	69	-	III	B
	20º	H	73	T	IV	B
	21º	H	58	B	II	B
	22º	H	57	B	0	B
	23º	H	70	-	IV	B
	24º	V	50	B	III	B
	25º	V	82	B	I	B
	26º	H	61	B	II	B
	27º	H	74	B	III	B
	28º	H	78	B	III	B
	29º	V	75	-	II	B
	30º	V	66	-	II	B

V = 16	X = 66,70	B = 20	0 = 4	Grupo A = 17
H = 14		T = 2	I = 7	Grupo B = 13
			II = 8	
			III = 7	
			IV = 4	

TABLA Nº 11.

CARACTERISTICAS CLINICAS DE LOS PACIENTES LANL.

Enf.	Sexo	Edad	FAB	Grupo
31º	V	18	M_4	A
32º	V	77	M_1	A
33º	V	22	M_1	A
34º	H	29	M_2	A
35º	V	40	M_1	A
36º	V	47	M_5	A
37º	V	70	M_4	A
38º	H	70	M_4	A
39º	V	44	M_4	A
40º	V	59	M_4	A
41º	H	61	M_5	A
42º	H	24	M_5	A
43º	V	40	M_5	A
44º	H	27	M_4	A
45º	V	32	M_1	A
46º	V	52	M_5	A
47º	H	69	M_4	A
48º	V	64	M_3	A
49º	H	74	M_{4r}	B

V = 12 X = 46,74 M_1 = 4 Grupo A = 18
H = 7 M_2 = 1 Grupo B = 1
M_3 = 1
M_4 = 8
M_5 = 5

C) LEUCOSIS LINFOBLASTICA AGUDA (LLA).

Han sido estudiados un total de 9 pacientes de ambos sexos (4 varones y 5 mujeres), con edades comprendidas entre los 16 y los 82 años (Edad media 42,13 años), 7 pertenecientes al Grupo A y 2 al Grupo B. Se efectuó la tipificación de células blásticas en siete de los nueve casos. Segun la Clasificación FAB (BENNETT, J.M., y col. 1976)(130) fueron las L_2 las de mayor frecuencia de presentación (8 enfermos), teniendo en cuenta que nuestro grupo de pacientes está integrado por aquellos con edades superiores a los 10 años.

En la Tabla nº 12 se resumen sus características referentes a edad, sexo, FAB, tipo celular y grupo al que pertenecen.

TABLA Nº 12.

CARACTERISTICAS CLINICAS DE LOS PACIENTES LLA.

Enf.	Sexo	Edad	Tipo celular	FAB	Grupo
50º	V	33	-	L_2	A
51º	V	16	Null	L_1	A
52º	H	82	Null	L_2	A
53º	H	73	Null	L_2	A
54º	H	48	Null	L_2	A
55º	V	24	Null	L_2	A
56º	H	46	Null	L_{2r}	B
57º	H	15	Comun	L_2	A
58º	V	43	-	L_{2r}	B

V = 4 X = 42,13
H = 5

L_1 = 1 Grupo A = 7
L_2 = 8 Grupo B = 2

D) LEUCOSIS MIELOIDE CRONICA EN CRISIS BLASTICA (LMC Ag).

Han sido estudiados unicamente dos pacientes, ambos mujeres, de 35 y 37 años de edad. Se consideró la existencia de crisis blástica cuando el contaje de SP arrojaba más del 10% de dichas células y habia infiltración en MO superior al 40%.

En la Tabla nº 13 se resumen sus características.

TABLA Nº 13.

CARACTERISTICAS CLINICAS DE LOS PACIENTES LMC Ag.

Enf.	Sexo	Edad	Tipo celular	Grupo
59º	H	35	Mieloide	B
60º	H	37	Mieloide	B

II.- NORMALES.

Han sido estudiados un total 24 sujetos sanos escogidos al azar entre voluntarios normales, de ambos sexos (14 varones y 10 mujeres), con edades comprendidas entre los 17 y 51 años (Edad media 28,13 años), todos ellos clasificados como Grupo C y cuyas características son a expuestas a continuación en la Tabla nº 14.

TABLA Nº 14.

SUJETOS NORMALES.

Normales	Sexo	Edad	
61º	V	27	
62º	V	20	
63º	H	23	
64º	V	19	
65º	H	25	
66º	V	18	
67º	V	36	
68º	H	27	
69º	H	19	
70º	H	50	
71º	V	41	
72º	H	42	
73º	V	19	
74º	H	51	
75º	H	28	
76º	V	30	
77º	H	33	
78º	V	20	
79º	V	28	
80º	V	22	
81º	V	29	
82º	V	31	ADR
83º	H	20	ADR
84º	V	17	ADR

V = 14 X = 28,13
H = 10

METODO.

1.- ENSAYO DE LOS RECEPTORES DE GLUCOCORTICOIDES (CRABTREE, G.R., y col. 1981)(68).

A) PRINCIPIOS DEL TEST:

Para la medida de los Receptores de Glucocorticoides (RG) empleamos el Ensayo Celular Total (simplificado) propuesto por CRABTREE, G.R., y col. (1981)(68) que resumimos a continuación:

Incubamos una suspensión leucocitaria, obtenida de sangre venosa heparinizada tras su paso por gradiente de Ficoll, con una concentración de Dexametasona marcada con Tritio (Dexamet-H_3). La molécula de Dexamet-H_3 unida a los Receptores nucleares y citoplasmáticos, tras la sustracción de la hormona unida inespecificamente, se usa para calcular el número de sitios de receptor por célula.

La medida de los esteroides unidos a los Receptores nucleares se consigue obteniendo núcleos celulares tras una lisis hipotónica con Cl_2Mg 1,5 mmol/ls.

La fracción citoplasmática, que contiene los complejos Glucocorticoide-Receptor, se obtiene del sobrenadante de la suspensión celular tras la lisis usando Cl_2Mg con Dextrano-Carbón activado.

Estos valores son sumados a fin de conseguir el número total de Receptores.

B) MATERIAL Y EQUIPAMIENTO:

1.- (1,2,4-^{3}H) Dexamethasone. Actividad específica 40-45 Ci/mmol. (Amersham International plc).

2.- Dexametasona, de Sigma (Chemical Company).

3.- RPMI 1640 con 20 mM Hepes buffer, de Flow laboratorios.

4.- Tubos de polipropileno cónicos con tapón de 1,5 ml, de Cultek.

5.- Lymphopred (Sodium metrizoate/Ficoll solution) Nyegaard and Co. A/S, Oslo, Norway.

6.- Dextrano, de Sigma (Chemical Company).

7.- Carbón activado, de Merck.

8.- Cl_2Mg, de Riedel-de Haen AG. Seelze-Hannover.

9.- Scintran. (Fluoran-HV) de BDH Chemicals Ltd. Poole, England.

10.- Viales de centelleo de plástico con tapón de 10 ml, de Beckman.

11.- Centrífuga CRU-5000 de Hucoa-Erloss, DAMON/IEC DIVISION.

12.- Centrífuga JANETZKI K-26.

13.- Coulter Counter model DN, de Coulter Electronics. LTD. Harpenden Herts. England.

14.- Baño a 37º C.

15.- Nevera a 3º C.

16.- LKB 1210. Ultrobeta, con eficiencia del contaje del 60%.

C) REACTIVOS Y SOLUCIONES:

1.- Solución stock de H_3D (0,5 umol/l): La solución de origen es diluida en etanol hasta 2 umol. De esta solución se evaporan 20 ul en un recipiente de cristal, redisolviéndose el esteroide en 80 ul de RPMI 1640 con 20 mmol/l de Hepes buffer calentando 30 minutos a 37º C. La solución debe permanecer a 3º C y se desecha despues de 7 dias o si se vuelve turbia.

2.- Solución stock de Dexametasona (20 umol/l): Se prepara una solución 0,2 mmol/l en etanol. La Dexametasona requiere estar en solución varias horas a 37º C. Esta solución stock puede permanecer 2 meses a 3º C.

Para los ensayos se evaporan 20 ul en un recipiente de cristal, y se resuspenden en 200 ul de RPMI 1640 con 20 mmol/l de Hepes buffer. Esta solución debe mantenerse a 3º C y desecharse tras una semana o si se vuelve turbia.

3.- Cl_2Mg en agua destilada (1,5 mmol/l).

4.- Dextrano-coated charcoal en Cl_2Mg 1,5 mmol/l: La suspensión se prepara añadiendo 0,1 gr de charcoal y 0,01 gr de dextrano y completando con 10 ml de Cl_2Mg 1,5 mmol/l y agitando. Tras permanecer 24 horas a 3º C han sedimentado las partículas de carbón, se aspira el sobrenadante y se restituye un volumen similar con Cl_2Mg 1,5 mmol/l. La solución debe ser agitada antes de su uso. Puede permanecer a 3º C durante un mes.

D) **TECNICA:**

PREPARACION DE LA SUSPENSION CELULAR: Las células se obtienen de sangre periférica anticoagulada con heparina (10 units/ml). El volumen de sangre requerida depende del recuento leucocitario.

Las células blancas son separadas de los hematíes y plaquetas usando el gradiente de Ficoll. La sangre heparinizada es diluida 1:3 en salino a temperatura ambiente y dos partes se depositan cuidadosamente sobre una de Ficoll, sin perturbar la interfase, en tubos de centrifuga de 15 ml.

Los tubos se centrifugan a 400 g durante 30 minutos a temperatura ambiente, se extraen las células de la interfase, que son lavadas dos veces con buffer salino fosfato (ph = 7,4), entre lavados se centrifuga a 200 g durante 10 minutos.

Para remover el esteroide endógeno se incuban las células en RPMI 1640 con 20 mmol/l Hepes buffer a 37º C durante 30 minutos a una concentración aproximada de 10^6 células/ml.

Posteriormente la suspensión celular es centrifugada para conseguir un botón y resuspendida en RPMI 1640 con 20 mmol/l de Hepes buffer a una concentración de $1x10^8$ células/ml. La suspensión debe ser inmediatamente utilizada, desechandose aquellas cuya mortalidad celular exceda el 10%.

INCUBACION DE LAS CELULAS CON DEXAMETASONA: La incubación se efectua en tubos de polipropileno cónicos, con tapón, de 1,5 ml.

Alícuotas de 80 ul de la suspensión celular se añaden a dos tubos (1 y 2) que contienen respectivamente: Tubo nº 1- 10ul de Dexametasona H_3 + 10 ul de RPMI 1640 con 20 mmol/l de Hepes buffer; Tubo nº 2- 10ul de Dexametasona marcada con tritio (H_3D), +10 ul de dexametasona que previamente han sido bien mezclados. El tubo nº 1 servirá para calcular la unión nuclear y el nº 2 la citoplasmática.

Estos tubos se colocan en un baño con oscilaciones suaves (aproximadamente 60 por minuto) durante 30 minutos. Posteriormente se sacan y se enfrían a 3º C durante 45 minutos.

OBTENCION DE LA UNION NUCLEAR Y CITOPLASMATICA: Se preparan alícuotas dobles, de ambos tubos, de 20 ul (para medir la radioactividad nuclear y citoplasmática). Por la adicción de 1,2 ml de Cl_2Mg 1,5 mmol/l y 100 ul Cl_2Mg con dextrano-charcoal respectivamente, se consigue la rotura de las células, el contenido es vigorosamente mezclado y se coloca 30 minutos a 3º C para completar la lisis. Los tubos se centrifugan a 12000 g durante 4 minutos. Se aspira y desecha el sobrenadante del primer grupo de tubos y el tapón celular que queda se emplea para medir los Receptores nucleares. Del segundo grupo de tubos se toman 100 ul del sobrenadante que seran utilizados para medir los Receptores citoplasmáticos, previo paso por el fluido de centelleo al igual que en el caso anterior.

OBTENCION DE LA CONCENTRACION DE HORMONA LIBRE: La suspensión celular primitiva (de los tubos 1 y 2) se deja en los tubos, se centrifugan estos a 12000 g durante 3 minutos y con pipetas de

vidrio calibradas se preparan alícuotas dobles de 5 ul del sobrenadante, y se colocan en el fluido de centelleo para el contaje.

E) INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS:

MEDIDA DE LA CONCENTRACION DE HORMONA LIBRE (H): Las cuentas por minuto de los 5 ul (h) son convertidas en la concentración de hormona libre (H) en mol/l segun la siguiente fórmula:

$$(H) = (h)(2\times10^{5})(1/E)(1/2,22\times10^{12})(1/S) =$$
$$= (9\times10^{-8})(h)/(E)(S).$$

Siendo (h) las cpm de los 5 ul.

(2×10^{5}) Convierte a (h) de cpm de los 5 ul. a cpm por litro.

(E) Es la eficiencia del contaje, expresada en cpm/dpm.

(S) Es la actividad específica en Ci/mol.

CALCULO DE R_o, O NUMERO DE SITIOS DE RECEPTOR/CELULA: Se calcula segun la siguiente fórmula:

$$R_o = (HR)(5/4)(50/E)(1/C)(1/2,22\times10^{12})(6,023\times10^{23}/S)$$
$$(1+10^{-8}/(H)) = 1,7\times10^{13}(HR)(1+10^{-8}/(H))/(E)(C)(S).$$

Las cpm de Dexasametasona marcada con tritio unida al citoplasma se multiplican por 1,2 para convertirlo en cpm de dexametasona citoplasmática de 20 ul de suspensión (las cpm nucleares no requieren conversión).

Los valores de alfa se usan para determinar la unión inespecífica (HR) de los ensayos nucleares y citoplasmáticos. Viene definida como la fracción de hormona libre unida inespecificamen-

te en la mezcla de la incubación.

5/4 Es la corrección empleada para los 20 ul de la suspensión celular.

(H) Es la concentración de hormona libre en mol/l.

$(1+10^{-8}/(H))$ Extrapola la concentración de hormona (H) hacia una concentración infinita de hormona saturada. Ello se reproduce por la siguiente ecuación:

$(HR) = K_aR_o(H)/(1+K_a(H)) = R_o(H)/(K_d+(H))$.

que da como resultado la concentración hormona-receptor (HR) en función de la concentración de la hormona, segun explicamos previamente.

(HR) Es la dexametasona unida especificamente a receptores.

(HN) Es la dexametasona unida inespecificamente a receptores.

(T) Es la dexametasona unida total, que viene expresada como:

(T) = (HR) + (HN).

(E) Es la eficiencia del contaje (cpm/dpm).

(C) Es la concentración de células por ml de la que se parte en la suspensión original.

$2,22x10^{12}$ Es el número de dpm por Ci.

$6,023x10^{23}$ Es el número de Avogadro's (moléculas/mol).

(S) Es la actividad específica en Ci/mol.

CALCULO DEL NUMERO TOTAL DE RECEPTORES EN SITIOS/CELULAS: El número total de receptores se obtiene como suma de los sitios nucleares + citoplasmáticos.

2.- ENSAYO DE LA SENSIBILIDAD IN VITRO A LA DEXAMETASONA (BLOOMFIELD, C.D., y col. 1980)(103).

A) PRINCIPIOS DEL TEST:

La sensibilidad in vitro a los Glucocorticoides se ha determinado, segun la técnica descrita por BLOOMFIELD, C.D., y col. en 1980 (103), midiendo los efectos de la Dexametasona in vitro sobre la incorporación de Timidina radioactiva (H_3^T).

B) MATERIAL Y EQUIPAMIENTO:

1.- Todos los materiales empleados se encontraban en condiciones de esterilidad y la manipulación de los mismos se efectuó igualmente en zona estéril en camara de flujo laminar Telstar. (Tarrasa).

2.- Como medio de cultivo se empleó RPMI 1640 con 20 mmol/l Hepes buffer, de Flow laboratorios, suplementado con L-Glutamina, de Flow laboratorios.

3.- Dexametasona, de Sigma (Chemical Company).

4.- (6-^{3}H) Thymidine. Actividad específica 5 Ci/mmol, (Amersham International plc).

5.- Placas de cultivo COLSTAR de 96 pocillos, de COLSTAR Division of Data Packaging Corporation.

6.- Estufa HOTPACK, a 37º C con atmósfera saturada de humedad.

7.- Titertek^{TM} Cell Harvester. SKATRONAS. Lierbyen. Norway.

8.- LKB 1210. Ultrobeta con eficiencia del contaje del 60%.

C) **TECNICA:**

OBTENCION DE LA SUSPENSION CELULAR: Los linfocitos para el cultivo se obtuvieron de sangre periférica de enfermos con LLC pertenecientes al Grupo A y de voluntarios sanos, siguiendo para ello una técnica similar a la descrita anteriormente para los Receptores de Glucocorticoides (RG). Una vez conseguido el tapón celular se resuspendió este en el medio de cultivo enriquecido con Glutamina y se ajustaron las células a una concentración de $1x10^6$ células/ml. La viabilidad celular se determinó mediante el test de exclusión del Tripan Bleu.

SIEMBRA: Una vez ajustadas las células a la concentración deseada se dispusieron en una microplaca de 96 pocillos. Se muestrearon por cuadruplicado 190 ul de suspensión celular + 10 ul de medio de cultivo (Pocillos control) y a la misma cantidad de suspensión de células se les añadió 10 ul de Dexametasona (Pocillos Glucocorticoide). Las microplacas fueron incubadas en estufa a 37º C durante 24 horas. Cuatro horas antes del harvester se añaden a cada pocillo 50 ul de H_3T. Tras este periodo las células fueron recogidas por Harvester sobre papel y, tras su lavado y secado, fueron dispuestas en los viales de centelleo para su contaje. Los resultados de cada punto se obtuvieron como media de los cuadruplicados.

D) INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS:

Los resultados vienen expresados por el % de cambio de los valores obtenidos en las células incubadas sin dexametasona, segun la siguiente formula (NANNI, P., y col. 1982)(82):

$$\% = (1 - Mc/Ms) \times 100.$$

Mc = Media de las cpm con esteroide.
Ms = Media de las cpm sin esteroide.

3.- INFLUENCIA DE LA ADRENALINA EN LOS NIVELES DE RECEPTORES DE GLUCOCORTICOIDES.

Se hizo de modo idéntico a los RG. Se comparó en presencia de 1 umol de Adrenalina utilizandoe para ello Adrenalina Llorente al 1:1000, que fue diluida a la concentracion antes dicha en RPMI 1640 con 20 mM Hepes buffer.

El tiempo de exposición a la Adrenalina fue de 30 minutos, y los resultados fueron comparados con el ensayo similar sin Adrenalina.

4.- ANALISIS ESTADISTICO.

Para la evaluación de los datos obtenidos hemos utilizado el test de análisis de la varianza de un factor, y en el caso de obtener diferencias significativas globales hemos aplicado el test de Scheffe para comparaciones múltiples.

Cuando existían unicamente dos grupos a comparar se les aplicó el test de la t de Student.

RESULTADOS.

RESULTADOS.

1.- CUANTIFICACION DE RECEPTORES DE GLUCOCORTICOIDES EN PACIENTES HEMATOLOGICOS E INDIVIDUOS NORMALES.

A.- NORMALES:

Hemos efectuado la cuantificación de RG en 24 individuos Normales escogidos al azar entre voluntarios sanos de ambos sexos (14 varones y 10 mujeres) con una edad media de 28,13 años (17-51 años).

El número de RG encontrado ha sido de 3427 sitios/célula (221-9628). No observamos diferencias significativas por sexos -Varones, RG = 3826 (326-9628); Hembras, RG = 2870 (221-6948)-, pero sí por edad ($p < 0,05$) dado que en 13 sujetos con menos de 28 años -RG = 4531 (221-9628)- se detecta un número de RG superior al de aquellos once con más de 28 años -RG = 2123 (326-6080)-.

Estos resultados estan recogidos en la Tabla nº 15.

B.- LEUCOSIS LINFOIDE CRONICA (LLC):

Han sido estudiados 30 pacientes con LLC de ambos sexos (16 varones y 14 mujeres) con una edad media de 66,70 años (43-82 años), distribuidos en dos Grupos (Grupo A = 17 pacientes; Grupo B = 13 pacientes).

TABLA Nº 15.

CUANTIFICACION de RG en NORMALES, por EDAD y SEXO

nº de pacientes	caracter.	sitios/célula	valor estadistico
24	NORM	3427 (221-9628)	-
13	< 28	4531 (221-9628)	p < 0,05
11	≥ 28	2123 (326-6080)	
14	V	3826 (326-9628)	N.S.
10	H	2870 (221-6948)	

La cifra de RG encontrada (vease Tabla nº 16) ha sido de 4773 sitios/célula (1118-9718). Si bién el número de RG en los 16 varones estudiados - 5374 (1118-9718) - ha sido ligeramente superior al detectado en las 14 mujeres - 4085 (2195-7141) - estos resultados no son estadisticamente significativos. Tampoco lo son los referidos a la edad de los pacientes, distribuidos en dos intervalos según la media de la muestra ($<$ 66 años, RG = 5141; $\geq$ 66 años, RG = 4527), ni entre Grupos A o B (4871 y 4645 sitos/célula respectivamente).

No hemos encontrado que el número de RG guarde correlación con el Estadío Clínico (RAI, K.A. y col. 1975)(197) según recogemos en la Tabla nº 17, incluso distribuyendo a los enfermos con Estadíos más avanzados (III y IV, RG = 4786) y comparandolos con aquellos de Estadío menos avanzado (0, I y II, RG = 4766) no hemos encontrado diferencias notables (vease Tabla nº 18).

No influye en la cuantificación de RG el caracter evolutivo de la enfermedad (Tabla nº 19) ya que no encontramos diferencias entre los pacientes con mejor respuesta (enfermedad no progresiva, RG = 5023) con aquellos que empeoran (enfermedad progresiva, RG = 4604).

De los 30 pacientes estudiados viven un total de 17 (RG = 5223) y su supervivencia hasta la actualidad es de 2,41 años. Diez pacientes han fallecido (RG = 4264), su media de supervivencia ha sido de 1,76 años. No hemos encontrado una relación entre el contenido de Receptores y el grado de Supervivencia de nuestros enfermos.

TABLA Nº 16.

CUANTIFICACION de RG en LLC, por GRUPOS, EDAD y SEXO

nº de pacientes	caracter.	sitios/célula	valor estadistico
30	LLC	4773 (1118-9718)	-
17	Grupo A	4871 (2195-7981)	N.S.
13	Grupo B	4645 (1118-9718)	
12	< 66 años	5141 (1594-7344)	N.S.
18	≥ 66 años	4527 (1118-9718)	
16	V	5374 (1118-9718)	N.S.
14	H	4085 (2195-7141)	

TABLA Nº 17.

CUANTIFICACION de RG en LLC, por ESTADIO CLINICO (RAI, K.A., y col. 1975)(197).

nº de pacientes	RAI	sitios/célula	valor estadistico
4	0	4615 (1594-6974)	
7	I	4935 (2997-7981)	
8	II	4692 (1118-7141)	N.S.
7	III	4683 (2227-9718)	
4	IV	4964 (3013-7276)	

TABLA Nº 18.

CUANTIFICACION de RG en LLC, agrupados por ESTADIO CLINICO (RAI, K.A., y col. 1975)(197).

nº de pacientes	RAI	sitios/célula	valor estadistico
19	0 - I - II	4766 (1118-7981)	N.S.
11	III - IV	4786 (2227-9718)	

TABLA Nº 19.

CUANTIFICACION de RG en LLC y RESPUESTA AL TRATAMIENTO

nº de pacientes	EVOLUCION	sitios/célula	valor estadistico
17	no progresiva	5023 (1594-7981)	
10	progresiva	4604 (1118-9718)	N.S.
3	desconocido	3913 (3262-4801)	

C.- LEUCOSIS AGUDA NO LINFOBLASTICA (LANL):

Han sido cuantificados los RG en 19 pacientes LANL, 18 de ellos al diagnóstico - Grupo A, RG = 7650 (808-32461) - y un único paciente perteneciente al Grupo B - RG = 3634 -. El número de RG encontrado ha sido de 7438 sitios/célula (808-32461), no existiendo diferencias por sexos - 12 varones, RG = 7663 (808-32461); 7 mujeres, RG = 7053 (2715-13809) - ni por edad, distribuidos los enfermos en dos intervalos según la media de la muestra - $<$ 46 años, RG = 7213 (1466-13809); $\geq$ 46, RG = 7643 (808-32461) -. Estos resultados estan recogidos en la Tabla nº 20.

No hemos encontrado diferencias significativas en las cuantificaciones de RG entre las distintas leucosis estudiadas y clasificadas según la FAB (BENNETT, J.M. y col. 1976)(130). Los valores obtenidos estan recogidos en la Tabla nº 21.

En respuesta a la combinación quimioterápica un total de 8 pacientes entran en Remisión Completa - RG = 8151 (5883-13809) -, 3 tienen una Respuesta Parcial - RG = 6409 (1466-9652) - y los 8 restantes, uno de ellos una M_4 en recidiva, no responden - RG = 7609 (808-32461) -. En la Tabla nº 22 estan recogidos estos resultados. Los pacientes que entran en Remisión tienen mayor número de RG que los que no la alcanzan, pero no existen diferencias significativas entre ellos.

De los 19 pacientes LANL estudiados viven cinco en RC - RG = 6852 (5883-8049) - y su supervivencia hasta la actualidad es de 1,79 años; 14 enfermos han fallecido - RG = 7648 (1466-32461) -, alcanzaron una supervivencia media de 160 dias. No encontramos

TABLA Nº 20.

CUANTIFICACION de RG en LANL, por GRUPOS, SEXO y EDAD

nº de pacientes	caracter.	sitios/célula	valor estadistico
19	LANL	7438 (808-32461)	-
18	Grupo A	7650 (808-32461)	-
1	Grupo B	3634	
12	V	7663 (808-32461)	N.S.
7	H	7053 (2715-13809)	
9	< 46	7213 (1466-13809)	N.S.
10	≥ 46	7643 (808-32461)	

TABLA Nº 21.

CUANTIFICACION de RG en LANL según CLASIFICACION FAB (BENNETT, J.M., y col. 1976)(130).

nº de pacientes	FAB	sitios/célula	valor estadistico
4	M_1	12930 (5883-32461)	
1	M_2	6535	
1	M_3	808	N.S.
8	M_4	5393 (2304-8109)	
5	M_5	8212 (1466-13809)	

TABLA Nº 22.

CUANTIFICACION de RG en LANL y RESPUESTA al TRATAMIENTO

nº de pacientes	Respuesta	sitios/célula	valor estadistico
8	RC	8151 (5883-13809)	
3	RP	6409 (1466-9652)	N.S.
8	F	7609 (808-32461)	

que el número de RG y la supervivencia en nuestro estudio tengan significación estadística.

D.- LEUCOSIS LINFOBLASTICA AGUDA (LLA):

Hemos cuantificado los RG en 9 pacientes con LLA, siete pertenecientes al Grupo A - RG = 13407 (2183-38038) - y dos al Grupo B - RG = 5465 (1609 y 9322) -. El número de RG encontrado ha sido de 11642 sitios/célula, no encontrandose diferencias significativas por Grupos, ni por sexos - Varones, RG = 4748 (1609-12442); Mujeres, RG = 17159 (2746-38038) -, ni por edad, distribuidos los pacientes en dos intervalos según la media de la muestra - $<$ 42 años, RG = 7839 (2183-13972); $\geq$ 42 años, RG = 14686 (1609-38038) - tal y como exponemos en la Tabla nº 23.

En la Tabla nº 24 estan recogidas las cuantificaciones de RG según la clasificación FAB (BENNETT, J.M. y col. 1976)(130). Dado que nuestros pacientes pertenecen al grupo de edades superiores a los 10 años es por lo que las L_2 (RG = 11548) revisten la mayor frecuencia de presentación y por lo que en este caso no nos es posible establecer el grado de correlación entre esta clasificación y el contenido de Receptores.

De los 9 pacientes estudiados tres responden a la combinación quimioterápica y alcanzan la RC - RG = 14326 (2183-38038) - y en los 6 restantes el Tratamiento falla - RG = 10311 (1609-21715) -, no encontrandose correlación entre el número de Receptores y la respuesta al tratamiento.

Viven cuatro pacientes, tres de ellos en RC, con un valor

TABLA Nº 23.

CUANTIFICACION de RG en LLA, por GRUPOS,SEXO y EDAD

nº de pacientes	caracter.	sitios/célula	valor estadistico
9	LLA	11642 (1609-38038)	-
7	Grupo A	13407 (2183-38038)	N.S.
2	Grupo B	5465 (1609 y 9322)	
4	V	4748 (1609-12442)	N.S.
5	H	17159 (2746-38038)	
4	< 42	7839 (2183-13972)	N.S.
5	$\geqslant 42$	14686 (1609-38038)	

TABLA Nº 24.

CUANTIFICACION de RG en LLA según CLASIFICACION FAB (BENNETT, J.M., y col. 1976)(130).

nº de pacientes	FAB	sitios/célula	valor estadistico
1	L_1	12442	-
8	L_2	11548 (1609-38038)	

TABLA Nº 25.

CUANTIFICACION de RG en LLA y RESPUESTA al TRATAMIENTO

nº de pacientes	Respuesta	sitios/célula	valor estadistico
3	RC	14326 (2183-38038)	N.S.
6	F	10311 (1609-21715)	

medio de RG de 14237 sitios/célula (2183-38038) y su supervivencia hasta la actualidad es de 1,23 años, dos de ellos estan transplantados. Cinco han fallecido - RG = 9567 (1609-21715) - siendo su supervivencia media de 195 dias. No encontramos significación estadística en el contenido de Receptor en pacientes que sobreviven al ser comparados con los que han fallecido.

E.- LEUCOSIS MIELOIDE CRONICA EN CRISIS BLASTICA (LMC Ag):

Unicamente han sido vistas dos enfermas en Agudización hacia formas Mieloides, de sus LMC. El número de RG encontrado ha sido muy similar, 4264 y 3427 sitios/célula respectivamente, y ninguna de ellas respondió al tratamiento. Dado su escaso número no es posible valorar su significación (Tabla nº 26).

TABLA Nº 26.

CUANTIFICACION de RG en LMC Ag y RESPUESTA al TRATAMIENTO

nº de pacientes	DIAGNOSTICO	sitios/célula	Respuesta
1	LMC Ag	4264	F
1	LMC Ag	3427	F

2.- COMPARACION ENTRE LOS NIVELES DE RG ENCONTRADOS EN LOS 84 SUJETOS ESTUDIADOS.

En la Tabla nº 27 estan recogidos los niveles de RG de los 84 sujetos sometidos a estudio y clasificados por Diagnósticos. Como se observa los pacientes con LLA son los que presentan las cuantificaciones medias de RG más elevadas (11642 sitios/célula), significativamente superiores a las detectadas en Normales ($p < 0,005$) y pacientes con LLC ($p < 0,01$), pero sin diferencias significativas con los enfermos LANL (7438 sitios/célula). Estos muestran valores de RG estadisticamente superiores a los pacientes LLC ($p < 0,05$) y Normales ($p < 0,02$).

En la Tabla nº 28 estan recogidos los valores de RG por Diagnósticos y Grupos. No hemos encontrado diferencias significativas entre pacientes LLC al diagnóstico (Grupo A, RG = 4871) o previamente tratados (Grupo B, RG = 4645), pero sí existen ($p < 0,05$) entre los RG exhibidos por cualquiera de estos dos Grupos con los observados en pacientes LLA del Grupo A (RG = 13407).

Los pacientes LANL del Grupo A (RG = 7650) no tienen, significativamente, más RG que los enfermos con LLC del mismo Grupo (RG = 4871) o que los LLC del Grupo B (RG = 4645). Los pacientes LLA del Grupo A tampoco muestran, estadisticamente, mayor contenido de RG que los pacientes LANL, aun cuando la media de Receptor es en ellos superior.

Los pacientes del Grupo A con Leucosis Agudas (Linfoides o Mieloides) tienen significativamente ($p < 0,005$ para las LLA y

TABLA Nº 27.

CUANTIFICACIONES de RG en 60 PACIENTES HEMATOLOGICOS y 24 INDIVIDUOS NORMALES

nº de pacientes	DIAGNOSTICO	sitios/célula
30	LLC	4773 (1118-9718)
19	LANL	7438 (808-32461)
9	LLA	11642 (1609-38038)
2	LMC Ag	3845 (4264 y 3427)
24	NORM	3427 (221-9628)

- LLA versus LANL: N.S.
- LLA versus LLC: $p < 0,01$
- LANL versus LLC: $p < 0,05$
- LLA versus NORM: $p < 0,005$
- LANL versus NORM: $p < 0,02$
- LLC versus NORM: $p < 0,05$

TABLA Nº 28.

CUANTIFICACIONES de RG en PACIENTES HEMATOLOGICOS e INDIVIDUOS NORMALES según GRUPO

Grupo	nº de pacientes	DIAGNOSTICO	sitios/célula
A	17	LLC	4871 (2195-7981)
	18	LANL	7650 (808-32461)
	7	LLA	13407 (2183-38038)
B	13	LLC	4645 (1118-9718)
	1	LANL	3634
	2	LLA	5465 (1609 y 9322)
	2	LMC Ag	3845 (4264 y 3427)
C	24	NORM	3427 (221-9628)

- LLA Grupo A versus LLC Grupo A y/o B: $p < 0,05$
- LLA Grupo A versus LANL Grupo A: N.S.
- LANL Grupo A versus LLC Grupo A y/o B: N.S.
- LLC Grupo A versus LLC Grupo B: N.S.
- LLA Grupo A versus Grupo C: $p < 0,005$
- LANL Grupo A versus Grupo C: $p < 0,02$

$p < 0,02$ para las LANL) mayor cantidad de RG que los del Grupo C (Normales, 3427 sitios/célula).

No hemos encontrado diferencias significativas (vease Tabla nº 29) en la cuantía de RG entre los sujetos varones, ya sean normales (RG = 3826) o patológicos (LLC, RG = 5374; LANL, RG = 7663; LLA, RG = 4748). Tampoco entre la mujeres Normales (RG = 2870) y pacientes con LLC (RG = 4085) o LANL (RG = 7053).

Por el contrario las pacientes con LLA (RG = 17159) muestran significativamente mayores cuantificaciones de RG que las de su mismo sexo con LLC ($p < 0,01$), LANL ($p < 0,05$) o sin enfermedad ($p < 0,005$).

De los 60 pacientes hematológicos estudiados viven un total de de 26, 31 han fallecido y de tres enfermos con LLC se desconoce su evolución. Hemos observado que los pacientes con LLA vivos tienen significativamente mas RG que los supervivientes con LLC ($p < 0,01$) y LANL ($p < 0,05$).

Los que han fallecido con cualquiera de los diagnósticos revisados, o los vivos con LLC y LANL no muestran diferentes cuantías de Receptor.

La supervivencia media, hasta la actualidad, de nuestros pacientes es de 2,41 años para los enfermos con LLC, 1,79 para los LANL y 1,23 para los enfermos con LLA.

TABLA Nº 29.

CUANTIFICACION de RG por SEXO de los 84 SUJETOS ESTUDIADOS

nº de pacientes	DIAGNOS.	Sexo	sitios/célula	valor estadistico
16	LLC	V	5374 (1118-9781)	N.S.
12	LANL	V	7663 (808-32461)	
4	LLA	V	4748 (1609-12442)	
14	NORM	V	3826 (326-9628)	
14	LLC	H	4085 (2195-7141) *	
7	LANL	H	7053 (2715-13809) **	
5	LLA	H	17159 (2746-38038)	
10	NORM	H	2870 (221-6948) ***	

* LLA versus LLC: $p < 0,01$

** LLA versus LANL: $p < 0,05$

*** LLA versus NORM: $p < 0,005$

3.- INFLUENCIA DEL TRATAMIENTO CON PREDNISONA FORMANDO PARTE DEL CICLO DE INDUCCION SOBRE EL NUMERO DE RECEPTORES.

Hemos evaluado la posible influencia de la Prednisona, dentro del ciclo de Inducción, a las 24 horas de su ingesta en nueve pacientes LANL y ocho enfermos con LLA.

Se observa una disminución en el número de RG tras el tratamiento en siete de los nueve pacientes con LANL, que llega a alcanzar incluso un valor de 0 en cuatro de ellos. En los dos restantes se observa un moderado incremento. La relación RG antes - RG postratamiento es estadisticamente significativa ($p < 0,05$).

En siete pacientes con LLA se detecta un descenso en la cantidad de RG postratamiento, haciendose 0 en cuatro de ellos. En un solo paciente, de los ocho estudiados, se detecta un incremento en la cuantía de RG; se trata de una enferma que inmunologicamente ha sido diagnosticada de LLA tipo común, pero los estudios citoquímicos y el tipo inmunológico celular revisten características mixtas entre LLA y LANL. En estos enfermos no encontramos correlación entre la disminución de Receptores con el tratamiento y el número inicial de ellos.

Consideradas ambas Leucosis Agudas en conjunto si existe significación estadística ($p < 0,01$). Todos estos resultados pueden verse recogidos en la Tabla nº 30.

TABLA Nº 30.

CUANTIFICACION de RG PRE y POSTRATAMIENTO en LANL y LLA

nº de pacientes	DIAGNOS.	RG antes	RG post	valor estadistico
9	LANL	6899 (1466-8109)	1364 (0-2534)	$p < 0,05$
8	LLA	12825 (1609-38038)	4434 (0-17064)	N.S.
17	LANL+LLA	9688 (1466-38038)	2808 (0-17064)	$p < 0,01$

4.- MEDIDA DE LA SENSIBILIDAD IN VITRO A LA DEXAMETASONA.

Hemos determinado la sensibilidad in vitro a la Dexametasona estudiando los efectos del esteroide sobre la incorporación de Timidina radioactiva (H_3T) en las células de 9 pacientes LLC y 9 sujetos normales.

La inhibición de la captación de la Timidina por el fármaco en los pacientes LLC (41,11%) no difiere significativamente de la de los donantes normales (35,22%) tal y como queda recogido en la Tabla nº 31.

TABLA Nº 31.

INHIBICION de la CAPTACION de H_3T por DEXAMETASONA

nº de pacientes	DIAGNOS.	Inhibición de la captación de H_3T	valor estadistico
9	LLC	41,11% (14%-71%)	N.S.
9	NORM	35,22% (12%-69%)	

5.- EFECTO DE LA ADRENALINA SOBRE EL NUMERO DE RG.

Hemos evaluado la posible influencia de la Adrenalina in vitro sobre el número de RG estudiandose hasta la fecha -el trabajo está en sus comienzos- a tres sujetos normales y una enferma LLC. Hemos observado (vease Tabla nº 32) que el número de RG aumenta tras exposición a Adrenalina en donantes normales y disminuye en la paciente con LLC. Se requiere un estudio más amplio para confirmar estos resultados.

TABLA Nº 32.

INFLUENCIA de la ADRENALINA en el NUMERO DE RG

nº de pacientes	DIAGNOS.	Pre ADRENALINA	Post
1	NORM	326	3865
1	"	221	3883
1	"	8733	9578
1	LLC	6540	1139

DISCUSION.

DISCUSION.

A pesar de que los Glucocorticoides son medicaciones incluidas en los protocolos de tratamiento antileucémico y antilinfomatosos (de un modo empírico) desde hace varios años, su mecanismo de acción no es bién conocido. Se sabe de la existencia de Receptores específicos que los transportan desde el citoplasma celular hasta el núcleo, donde al parecer ejercen su acción, sin embargo no está del todo claro si el efecto terapéutico es directo sobre las células neoplásicas o bién indirecto, a traves de modificaciones en el funcionamiento de indeterminadas glándulas que secundariamente inhiben el desarrollo tumoral. Resulta pues interesante determinar si existe una correspondencia entre el nivel de Receptores celulares y la magnitud de su acción terapéutica.

Por consiguiente hemos analizado en este estudio los RG en diversos procesos hematológicos malignos comparandolos entre sí y con individuos normales, tratando de correlacionar su número con el grado de respuesta al tratamiento.

Los linfocitos de los 24 sujetos normales por nosotros estudiados contienen, como se indicó en la Tabla nº 15 de Resultados, alrededor de 3427 sitios/célula, valores similares a los encontrados por KONTULA, K., y col. (1980)(88) y CRABTREE, G.R., y col. (1978)(59), pero muy inferiores a los valors medios detectados por NANNI, P., y col. (1982)(82) y SCHLECHTE, J.A., y col. (1982)(90).

Es de destacar en estos estudios la discrepancia que existe en cuanto a las cifras de RG, incluso entre aquellos que recogen

idéntico número de sujetos, tal es el caso de KONTULA, K., y col. (1980)(88) y NANNI, P., y col. (1982)(82) o CRABTREE, G.R., y col. (1978)(59) y SCHLECHTE, J.A., y col. (1982)(90).

Nosotros no hemos encontrado diferencias en la cuantificación de Receptores entre varones y mujeres, en cambio si hemos observado que con la edad el número de RG se modifica, de forma que aquellos individuos con menos de 28 años tienen significativamente ($p < 0,05$) unos niveles de RG más elevados que los normales con una edad superior o igual a ésta. En la literatura revisada no hemos encontrado estudios comparativos al respecto. Cabe la posibilidad que la menor cuantía de RG encontrada en sujetos de más edad pudiera ser responsables de una disminución de la respuesta fisiológica de los tejidos a estas hormonas.

En los pacientes con LLC el nivel de RG por nosotros encontrado ha sido similar al aportado por HO, A.D., y col. (1981)(89) pero más elevado que los detectados en sus estudios por otros autores revisados (CRABTREE, G.R., y col. 1978)(59); (NANNI, P., y col. 1982)(82); (KONTULA, K., y col. 1980)(88); (STEVENS, J., y col. 1978)(123); (SLOMAN, J.C., y col. 1979)(125); (BLOOMFIELD, C.D, HOLBROOK,N.J., and MUNCK,A.U.)(198), unicamente IACOBELLI, S., y col. (1981)(84) encuentran valores superiores a los nuestros y a los anteriormente citados, 8061 sitios/célula.

También hemos observado que los pacientes LLC tienen significativamente ($p < 0,05$) mayor número de RG que los linfocitos de sujetos normales, por el contrario para KONTULA, K., y col. (1980)(88) estos valores han sido similares e inferiores para NANNI, P., y col. (1982)(82) y CRABTREE, G.R., y col. (1978)(59).

Posiblemente estas discrepancias con la literatura se deban al mayor número de enfermos por nosotros estudiados, además cabe la posibilidad de que el tipo de linfocito que prolifere en esta enfermedad tenga unas características biológicas diferentes al linfocito maduro normal y una de ellas sea su distinto contenido de RG, lo que sería, probablemente, responsable de una diferente respuesta a la terapéutica.

El número de RG en las LLC ha sido inferior al de las Leucemias Agudas (tanto linfoblásticas como mieloblásticas) al igual que han reportado NANNI, P., y col. (1982)(82); IACOBELLI, S., y col. (1981)(84); CRABTREE, G.R., y col. (1978)(59); SHIPMAN, G.F., y col. (1981)(102).

No se ha encontrado en este estudio correlación entre el contenido de RG y el Estadío Clínico de la Enfermedad (RAI, K.A., y col. 1975)(197), ni incluso -como se expuso en la Tabla nº 18 de Resultados- agrupando a los pacientes por estadíos más avanzados (III y IV) y comparandolos con aquellos menos avanzados (O, I y II), esta correlación tampoco ha sido encontrada por HOMO, F., y col. (1978)(121) o SIMONSSON, B., y col. (1982)(72) en sus estudios, si bien estos últimos emplean Ensayo Citoplasmático y nosotros Ensayo Celular Total.

El contenido de RG en nuestros pacientes con LLC no guarda correlación con el caracter evolutivo de la enfermedad, hecho también reseñado por SIMONSSON, B., y col. (1982)(72) y SIMONSSON, B., NILSSON, K., TERENIUS, L., and GLIMELIUS, B., (1978)(199), ni es diferente entre pacientes estudiados al diagnóstico (Grupo A) comparados con los ya previamente tratados con

Clorambucil (Grupo B) por el contrario HO, A.D., y col. (1981)(89) han demostrado la existencia de correlación positiva entre el bajo contenido de RG y la no respuesta al tratamiento al observar que las células de pacientes tratados durante 2 - 5 años con una combinación Clorambucil+PRN y que se hicieron resistentes a la terapia tenían bajos niveles de RG si eran comparados con pacientes LLC diagnosticados de nuevo, nuestros enfermos no reciben prednisona. Aún cuando la correlación entre la respuesta in vivo a los esteroides con el número de RG na ha sido suficientemente estudiada (BLOOMFIELD, C.D., 1984)(157), SIMONSSON, B., y col. (1982)(72) han aportado que no está en correlación con la respuesta clínica a la PRN como tratamiento único, y SHIPMAN, G.F., y col. (1981)(102) observan una disminución en el número de RG tras el tratamiento, similar a la detectada por ellos en normales y otras formas de leucemia y linfoma.

En nuestro estudio no hemos encontrado correlación entre el contenido de RG con la supervivencia de nuestros pacientes, tal comparación no ha sido efectuada por los autores revisados.

Parece que la inhibición de la captación de la H_3U inducida por la dexametasona es más importante en las células de LLC que en linfocitos de sangre periférica de donantes normales y que este incremento de la sensibilidad in vitro a los esteroides tiene importancia significativa en esta enfermedad (HOMO, F., y col. 1978)(121). Nosotros, si bien hemos encontrado un más alto contenido de RG en pacientes LLC que en normales ($p < 0,05$) no hemos observado diferencias significativas en cuanto a la acción in vitro de los esteroides sobre la inhibición de la captación de H_3T, por el contrario GALILI, U., y col. (1980)(32) y SCHREK, R.

(1964)(127) han reportado que las células de las LLC son más sensibles que las normales a la acción citotóxica de estas hormonas, resultados que se contradicen con los obtenidos por NANNI, P., y col. (1982)(82).

Nuestros pacientes con LANL muestran un contenido de Receptor de 7438 sitios/célula como valor medio, similar a los encontrados por CRABTREE, G.R., y col. (1981)(129), y más elevados que los reportados por CRABTREE, G.R., y col. (1978)(59) y SHIPMAN, G.F., y col. (1981)(102), pero inferiores a los detectados por NANNI, P., y col. (1982)(82) y IACOBELLI, S., y col. (1981)(84).

Estos valores son estadisticamente superiores a los detectados en linfocitos de sujetos normales ($p < 0,02$) y de pacientes con LLC ($p < 0,05$), hecho también recogido en la literatura por NANNI, P., y col. (1982)(82); CRABTREE, G.R., y col. (1978)(59) y IACOBELLI, S., y col. (1981)(84).

No hemos encontrado que el contenido de RG guarde correlación con la edad o el sexo en nuestros enfermos, ni en la literatura revisada existen estudios al respecto.

Tampoco la cuantía de RG está influida por el aspecto morfológico y el comportamiento citoquímico de las células blásticas según la clasificación FAB (BENNETT, J.M., y col. 1976)(130), comparaciones similares han sido efectuadas por CRABTREE, G.R., y col. (1981)(129) con idénticos resultados, aunque para ellos el número de RG ha sido muy similar entre las distintas leucosis estudiadas y nosotros hemos obtenido cifras más heterogéneas que cubren un amplio rango (808-32461 sitios/célula).

No encontramos un paralelismo entre el contenido de RG y la respuesta a la combinación quimioterápica, aunque si hemos observado una disminución significativa (p 0,05) de su cuantía -vease Tabla nº 29 de Resultados- tras tratamiento con PRN formando parte del ciclo de Inducción. El descenso en el número de Receptores ha alcanzado un valor 0 en 4 pacientes, en 2 se detectó un incremento. Estas modificaciones han sido igualmente señaladas por SHIPMAN, G.F., y col. (1981)(102) empleando PRN como agente único, sin embargo, como indica BLOMMFIELD, C.D., (1984)(157), y al igual que sucede en las LLC, la respuesta in vivo a la terapia esteroidea formando parte de los tratamientos aplicados en esta forma de leucemia no ha sido suficientemente estudiada.

Ya que es conocido que los RG detectados en los blastos de las LANL son identicos a los encontrados en normales y otras formas de leucemias (BAXTER, J.D., and FUNDER, J.W. 1979)(200); (MUNCK, A., y col. 1977)(7), con igual especificidad (SMITH, K.A., y col. 1977)(86); (MUNCK, A., y col. 1977)(7) y que estos RG son capaces de mediar respuesta (CRABTREE, G.R., y col. 1981)(129) resulta difícil dilucidar el por qué estas células son menos suceptibles a la terapia esteroidea. CRABTREE, G.R., y col. (1981)(129), CRABTREE, G.R., y col. (1978)(59), KOEFFLER, H.P., y col. (1980)(132) y NANNI, P., y col. (1982)(82) indican que un número elevado de RG no se relaciona necesariamente con una mayor sensibilidad a los esteroides, y que la variable efectividad de los mismos observada en esta Leucemia no guarda correlación con su presencia o ausencia.

En nuestra serie el contenido de RG y la supervivencia no

están claramente relacionados, aunque se ha sugerido que en niños (PUI, C-H, COSTIOW, M.E., and KALWINSKY, D.K., 1983)(201) ésto se cumple, tal paralelismo no se ha efectuado convenientemente en adultos (BLOOMFIELD, C.D., 1984)(157).

En nuestros pacientes con LLA hemos encontrado los mayores valores de RG, similares a los reportados por MARCHETTI, P., y col. (1981)(80) y HO, A.D., y col. (1981)(89) y superiores a los señalados en sus estudios por NANNI, P., y col. (1982)(82), aunque inferiores a los obtenidos en las Leucosis Linfoblástica Aguda infantiles por CRIST, W., y col. (1979)(108) y NARAY, A., y col. (1980)(110).

Aún cuando el valor medio de RG ha sido más elevado que en las LANL no existen diferencias estadísticas entre ambas formas de Leucemia, lo que puede ser cierto, como igualmente señalan CRABTREE, G.R., y col. (1978)(59), SHIPMAN, G.F., y col. (1981)(102) y CRABTREE, G.R., y col. (1981)(129), o tal vez en un estudio con mayor número de casos se aprecien discrepancias tal y como algunos autores han indicado, así para NANNI, P., y col. (1982)(82) son las LANL las que muestran una mayor cuantía de RG, en cambio para IACOBELLI, S., y col. (1981)(84) son las LLA.

Al igual que para CRABTREE, G.R., y col. (1978)(59), NANNI, P., y col. (1982)(82) y IACOBELLI, S., y col. (1981)(84) el número de RG ha sido estadisticamente superior al detectado en pacientes con LLC ($p < 0,01$) e individuos normales ($p < 0,005$).

No se ha encontrado correlación entre el contenido de RG y el sexo en nuestros enfermos, aunque hemos observado que las pacientes con LLA presentan significativamente mayor número de RG

que las hembras con LLC o LANL y que mujeres normales, no existiendo en la literatura estudios previos al respecto.

No hemos observado que el número de RG esté relacionado con la edad de nuestros enfermos distribuidos en dos intervalos según la media muestral, tampoco IACOBELLI, S., y col. (1980)(79), MARCHETTI, P., y col. (1981)(80), KONIOR YABRO, G.S., y col. (1977)(109) y HOMO, F., y col. (1980)(112) encuentran correlación, sin embargo tras el estudio de un elevado número de casos COSTIOW, M.E., y col. (1982)(95) detectan bajos niveles de RG en Médula ósea de niños con edades inferiores a los dos años y superiores a diez.

No hemos podido establecer comparación entre el contenido de RG y la clasificación FAB (BENNETT, J.M., y col. 1976)(130) ni se han encontrado referencias al respecto en la literatura revisada.

Aún cuando el contenido de RG en nuestros enfermos con LLA es elevado no hemos observado que ello se correlacione con un mayor porcentaje de RC, al igual que para BLOOMFIELD, C.D., y col. (1981)(83) y CRABTREE, G.R., y col. (1978)(59), sin embargo MARCHETTI, P., y col. (1981)(80) y LIPPMAN, M.E. (1982)(85) si encuentran un paralelismo entre el número de RG y la respuesta a la combinación quimiterápica en los pacientes por ellos estudiados.

Empleando PRN como agente único se ha visto que la respuesta a estas hormonas se produce en aquellos pacientes con LLA y linfoma que muestran más altos valores de RG (BLOOMFIELD, C.D., 1984)(157); (MARCHETTI, P., y col. 1981)(80); (HO, A.D., y col. 1982)(116); (BLOOMFIELD, C.D., y col. 1984)(155) y (MASTRANGELO,

R. y col., 1980)(115) y que su número se modifica tras el tratamiento (CRIST, W., y col. 1979)(108). Nosotros hemos constatado en nuestros enfermos un descenso no significativo a las 24 horas de administrada la quimioterapia, que incluía prednisona los valores disminuyeron en 7 pacientes llegando a alcanzar un valor 0 en cuatro de ellos, una sola enferma mostró un incremento sobre el nivel basal pretratamiento, se trataba de una LLA tipo común, en la que los estudios citoquímicos y el tipo inmunológico celular revestían características mixtas entre LLA y LANL. No hemos encontrado referencias similares en la literatura revisada.

En nuestros pacientes adultos con LLA no hemos observado significación entre el contenido de RG y la supervivencia alcanzada, similares resultados han sido reportados por BLOOMFIELD, C.D., y col. (1981)(83) y CRABTREE, G.R., y col. (1978)(59), en cambio MASTRANGELO, R., y col. (1980)(115) y COSTIOW, M.E., y col. (1982)(95) han sugerido que ello si se cumple en niños.

Han sido vistas dos enfermas, en agudización hacia formas mieloides, con LMC. El número de RG encontrado ha sido muy similar y ninguna de ellas respondió a la terapia. No hemos podido valorar si estos resultados tienen o no significación estadística.

En tres individuos normales hemos estudiado las modificaciones en el número de RG inducidas por Adrenalina in vitro evidenciandose un incremento de los mismos. En un solo paciente con LLC la Adrenalina indujo un descenso de su número basal de RG. Estos datos requieren ser confirmados con estudios que incluyan un mayor número de casos.

Resumiendo los hallazgos de este estudio parece evidente que la transformación neoplásica no produce por sí misma una disminución en el número de RG. También parece obvio que, especialmente en las Leucemias Agudas, no se aprecia una correlación entre la cuantía de RG y la magnitud de la respuesta terapéutica. Si tal paralelismo existiese las LANL tendrían una respuesta similar al tratamiento esteroide que las LLA, cosa que no es cierto. Puede por tanto deducirse que la acción de los Glucocorticoides se lleva a cabo, al menos en parte, por mecanismos indirectos, si se admite que una vez transportada la medicación hasta el núcleo las modificaciones ejercidas sobre indeterminados procesos bioquímicos celulares fuesen las mismas.

Queda pues una puerta abierta al estudio de futuras investigaciones sobre el papel que desempeñan los RG de las células blásticas en la acción terapéutica de estos fármacos.

CONCLUSIONES.

CONCLUSIONES.

1º.- Han sido cuantificados los Receptores de Glucocorticoides (RG) en 60 pacientes afectados por neoplasias hematológicas y 24 individuos normales encontrando que, tanto en los blastos leucémicos como en los linfocitos normales, son detectados tales Receptores al ser estudiados mediante Ensayo Celular Total (ECT).

2º.- Los sujetos normales con edad inferior a los 28 años tienen significativamente una mayor cuantía de RG que aquellos con edad igual o superior. Correlaciones paralelas en enfermos no han sido significativas.

3º.- No hemos encontrado diferencias en el contenido de RG, según el sexo, en individuos normales. Entre los pacientes unicamente las mujeres con Leucosis Linfoblástica Aguda (LLA) muestran mayor número de Receptores que aquellas con otra forma de Leucemia y que hembras normales.

4º.- Las células de pacientes con Leucosis Linfoide Crónica (LLC) tienen mayor número de RG que el detectado en linfocitos de sujetos normales ($p < 0,05$).

5º.- No existen diferencias entre el contenido de Receptores de pacientes con LLC estudiados al diagnóstico (Grupo A) y los previamente tratados con Clorambucil (Grupo B).

6º.- En enfermos con LLC el número de Receptores no guarda correlación con el Estadío Clínico, segun la Clasificación propuesta por RAI y col. Es decir, los pacientes de los Grupos 0, I y II no tienen significativamente un mayor número de RG al compararlos con aquellos de los Grupos III y IV.

7º.- El caracter evolutivo de la enfermedad (progresiva o no progresiva) en pacientes con LLC y el contenido de RG no estan correlacionados: los enfermos rapidamente progresivos no se diferencian en este parámetro de aquellos con evolución clínica lenta.

8º.- El contenido de RG de las células blásticas de pacientes con Leucosis Aguda no Linfoblástica (LANL) y Leucosis Linfoblástica Aguda (LLA) es significativamente superior al detectado en células linfoides de individuos normales y enfermos con LLC.

9º.- Los blastos de pacientes con LANL no muestran, estadisticamente, diferente contenido de RG que los de las LLA.

10º.- No hemos obsevado que el número de Receptores sea diferente según el aspecto morfológico y el comportamiento citoquímico de las células blásticas de pacientes con LANL según la Clasificación propuesta por BENNETT y col. (FAB). Tal comparación no hemos podido efectuarla en las LLA.

11º.- La respuesta a la combinación quimioterápica, evaluada por número de Remisiones Completas alcanzadas, y los RG no guardan un paralelismo en los pacientes con LANL y LLA.

12º.- A las 24 horas de la administración de Prednisona, formando parte del ciclo de inducción, el número de Receptores disminuye en las Leucemias Agudas, tal descenso es significativo ($p < 0,05$) en las formas Mieloides, no en las modalidades Linfoides.

13º.- La supervivencia de nuestros pacientes hematológicos y el número de RG en ellos encontrado no estan significativamente correlacionados, es decir los enfermos con una supervivencia más larga no tienen un número de Receptores diferente a aquellos que han fallecido prontamente.

14º.- La sensibilidad in vitro a los esteroides es similar en las células de pacientes con LLC e individuos normales, en ensayos efectuados en cultivos sin estimulación con mitógenos.

15º.- El número de RG se incrementa tras exposición a una concentración de Adrenalina 1uM en sujetos normales y disminuye en una paciente con LLC.

16º.- El hecho de que las LANL tengan igual número de RG que las LLA y una respuesta terapéutica diferente, implica que el mecanismo de acción de estos medicamentos no esta mediado, exclusivamente por Receptores celulares específicos.

RESUMEN.

RESUMEN.

El caracter empírico del tratamiento esteroide aplicado en las enfermedades hematológicas malignas ha inducido la realización de la presente investigación, con objeto de correlacionar el contenido de Receptores de Glucocorticoides (RG) con la respuesta clínica a estos medicamentos, conjuntamente con otros parámetros recogidos simultaneamente. En primer lugar se ha hecho una revisión de la literatura a cerca de los mecanismos de acción de los esteroides y sobre Receptores celulares, en general, y especialmente sobre los Receptores de Glucocorticoides.

Hemos cuantificado los RG en blastos de 60 pacientes con neoplasias hematológicas y en linfocitos de 24 sujetos normales, los enfermos estan distribuidos según los siguientes diagnósticos: 30 con LLC; 19 con LANL; 9 con LLA y 2 con LMC en crisis blástica.

En los individuos normales se observa una disminución significativa del número de RG con la edad.

Los pacientes con Leucosis Linfoide Crónica (LLC) muestran un contenido de Receptor más elevado que los sujetos normales, pero su cuantía no se correlaciona con la edad, el sexo, el Grupo (A al diagnóstico; B previamente tratados), la Clasificación Clinica (RAI y col.), el caracter evolutivo de la enfermedad o la supervivencia alcanzada. Tras exposición a dexametasona in vitro no existen diferencias en el comportamiento de los linfocitos de las LLC con los de individuos normales en cuanto a la capacidad de inhibición de la replicación del DNA, medida por la captación

de Timidina radioactiva (H_3^T).

En los pacientes con Leucemias Agudas (LANL y LLA) el contenido de RG ha sido estadisticamente superior al encontrado en enfermos con LLC e individuos normales, pero sin diferencias entre sí. Tampoco encontramos correlación en estas leucosis entre el número de RG y la edad, sexo, Clasificación FAB (BENNETT y col.), respuesta a la combinación quimioterápica y supervivencia, sin embargo en los pacientes con Leucosis Aguda no Linfoblástica (LANL) el número de Receptores disminuye significativamente tras la administración del ciclo de inducción, que incluye Prednisona.

A diferencia de lo observado en tres individuos normales, un paciente de LLC mostró un descenso en el contenido de RG cuando los linfocitos eran expuestos a Adrenalina in vitro.

BIBLIOGRAFIAS.

BIBLIOGRAFIAS.

1.- BURNINGHAM, R.A., RESTREPO, A., PUGH, R.P., BROWN, E.B., SCHLOSSMAN, S.F., KHURI, D.D., LESSNER, H.E., and HARRINGTON, W.J. "Weekly high dosage glucocorticoid treatment of lymphocytic leukemias and lymphomas". New. Engl. J. Med., 270: 1160-1166, 1964.

2.- EZDINLI, E.Z., STUTZMAN, L., AUNGST, C.W., and FIRAT, D. "Corticosteroid therapy for lymphoma and chronic lymphocitic leukemia". Cancer, 23: 900-909, 1969.

3.- CLINE, M.J. "Adrenal steroids in the treatment of malignant hematologic disease". In: Azarnoff, D. L., (ed) Med. Clin. North Am., 57 (5): 1203-1209, 1973.

4.- VIETTI, T.J., SULLIVAN, M.P., BERRY, D.H., HADDY, T.B., HAGGARD, M.E., and BLATTNER, R.J. "The response of acute childhood leukemia to an initial and a second course of prednisone". J. Pediatr., 66: 18-26, 1965.

5.- LEIKIN, S.L., BRUBAKER, C.A., HARTMANN, J.R., MURPHY, M. L., WOLFF, J.A., and PERRIN, E. "Varying prednisone dosage in remission induction of previously untreated childhood leukemia". Cancer, 21: 346-351, 1968.

6.- KNOSPE, W.H., and CONRAD, M.E. "The danger of corticosteroids in acute granulocytic leukemia". Med. Clin. North Am., 50: 1653-1668, 1966.

7.- MUNCK, A., and LEUNG, K. "Glucocorticoid receptors and

mechanisms of action". In: Pascualini, J. R., (ed) Receptors and mechanism of action of steroid hormones: part II. New York: Marcel Dekker, Inc: 311-397, 1977.

8.- ADDISON,T. "On the constitutional and local effects of disease of the suprarenal capsules". Samuel Highley, London. 1855.

9.- BROWN-SEQUARD, C.E. "Recherches experimentales sur la physiologie et la pathologie des capsules surrenales". C. R. Acad. Sci. (Paris), 43: 422-425, 1856.

10.- HAYNES,R.C., and MURAD,F. "Hormona adenocorticotrofica, esteroides adrenales (corticosuprarrenales) y sus análogos; sintéticos inhibidores de la bisíntesis de los esteroides corticosuprarrenales". En: "Las bases farmacológicas de la terapéutica (Goodman y Gilman ed)" cap. 63: 1430-1458, 1981.

11.- LITTER, M. "Farmacología de las suprarrenales y de la hipófisis anterior". Compendio de farmacología 38: 417-439. Editorial "El Ateneo", S.A., 1976.

12.- CASANDRA, R.S., and De NICOLA, A.F. "Efectos moleculares de los Glucocorticoides". Endocrinología Molecular, 11: 157-172. Editorial "El Ateneo", S.A., 1980.

13.- SAYER, G., and TRAVIS, R.H. "Adrenocorticotrophic hormone: Adrenocortical steroids and their synthetic analogs the pharmacological basis of therapeutics". Fourth edition. 1604-1642. Ed. by L. S. Goodman, and A. Gliman.

The Macmillan Company. New York, 1970.

14.- CLAMAN, H.N. "Corticosteroids and lymphoid cell". New. Engl. J. Med., 24: 388-397, 1972.

15.- GUYTON, A.C. "Hormonas corticosuprarrenales". Tratado de fisiología médica., 76: 936-950. Editora Importécnica, S.A., 1971.

16.- TEPPERMAN, J. "Corteza suprarrenal". Fisiología metabólica y endocrina., 8: 126-156. Editorial Interamericana, 1975.

17.- YATES, F.E. "The regulation of cortisol secretion". Proc. Int. Union of Physiol. Sciences, 6: 247-256, 1968.

18.- COHEN, J.J. "The effects of hydrocortisone on the immune response". Ann. Allergy, 29: 358-361, 1971.

19.- INGLE, D.J. "Permissive action of hormones". J. Clin. Endocrinol. Metab., 14: 1272-1274, 1954.

20.- BAXTER, J.D., and HARRIS, A.W. "Mechanism of glucocorticoid action: General features, with reference to steroid-mediated immunosppression". Transplant. Proc., 7: 55-61, 1975.

21.- BAXTER, J.D., and FORSHAM, P.H. "Tissue effects of glucocorticoids". Am. J. Med., 53: 573-589, 1972.

22.- STEVENS, W., COLESSIDES, C., and DOUGHERTY, T.F. "Effects of cortisol on the incorporation of thymidine-$Z^{11}C$ into nucleic acids of lymphatic tissue from adrenalecto-

mized CBA-mice". Endocrinology, 76: 1100-1107, 1965.

23.- LEUNG, K., and MUNCK, A. "Peripheral actions of glucocorticoids". Ann. Rev. Physiol., 37: 245-251, 1975.

24.- MAKMAN, M.H., DVORKIN, B., and WHITE, A. "Evidence for induction by cortisol in vitro of a protein inhibitor of transport and phosphorylation in rat thymocytes". Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 68: 1269-1273, 1971.

25.- CAFFEY, J., and SILBEY, R. "Regrowth and overgrowth of the thymus after atrophy induced by the oral administration of adrenocorticosteroids to human infants". Pediatrics., 26: 762-770, 1960.

26.- CLAMAN, H.N., MOORHEAD, J.W., and BENNER, W.H. "Corticosteroids and lymphoid cells in vitro. I. Hydrocortisone lysis of human, guinea pig, and mouse thymus cells". J. Lab. Clin. Med., 78: 499-507, 1971.

27.- FAUCI, A.S., and DALE, D.C. "The effects of in vivo hydrocortisone on subpopulations of human lymphocytes". J. Clin. Invest., 53: 240-246, 1974.

28.- FAUCI, A.S. "Mechanisms of corticosteroid action on lymphocyte subpopulations. I. Redistribution of circulating T and B lymphocytes to the bone marrow". Immunology, 28: 669-680, 1975.

29.- FAUCI, A.S., MURAKAMI, T., BRANDON, D.D., LORIAUX, D.L., and LIPSETT, M.B. "Mechanisms of corticosteroid action on lymphocytic subpopulations. VI. Lack of correlation

between glucocorticoid receptors and the differential effects of glucocorticosteroids on T-cell subpopulations". Cell. Immunol., 49: 43-50, 1980.

30.- CLINE, M.J. "Adrenal steroids in leukemia and lymphoma". Cancer Chemother. Rep. Part I, 58: 521-525, 1974.

31.- CLARK, A.N.G., and OSMANI, S.R. "Steroid-responsive leukaemia". Br. Med. J., 2: 999-1000, 1978.

32.- GALILI, U., PROKOCIMER, M., and IZAK, G. "The in vitro sensitivity of leukemic and normal leukocytes to hydrocortisone induced cytolysis". Blood, 56: 1077-1081, 1980.

33.- THORN, G.W. "The adrenal cortex: reflexions, progress, and speculations". Trans. Assoc. Amer. Phys., 86: 65-72, 1973.

34.- NELSON, D.H. "Eosinophiles, lymphocytes and 17-Hydroxy-corticosteroids as indices of adrenocortical activity". In Bioassay of Anterior Pituitary and Adrenocortical Hormones (Ciba Foundation Colloquia on Endocrinology). Boston: Little, Brown, 1953.

35.- GORDON, A.S. "Some aspects of hormonal influences upon the leucocytes". Ann. N. I. Acad. Sci., 59: 907-913, 1955.

36.- ANDERSEN, V. "Autoradiografhic studies of eosinophil kinetics: effect of cortisol". Cell Tissue Kinet., 2: 139-143, 1969.

37.- NELSON, D.H., SANDBERG, A.A., PALMER, J.G., and TYLER, F.H. "Blood levels opf 17-hydroxycorticoids folloving the administration of adrenal steroids and their relation to circulating leukocytes". J. Clin. Invest., 31: 843-857, 1952.

38.- DALE, D. C., FAUCI, A.S., GLERRY, N.D., and WOLF, S. M. "Comparison of agents producing a neutrophilic leukocytosis in man. Hydrocortisona, prednisone, endotoxin and etiocholanalone". J. Clin. Invest., 56: 808-814, 1975.

39.- ATHENS, J.W., HAAB, D.P., RAAB, S.O., MAVER, A.M., ASHENBUCHER, H., CARTWRIGHT, G.E., and WINTROBE, M.M. "Leukokinetics studies IV. The total blood circulating and marginal granulocyte pools and the granulocyte turnover rate in normal subjects". J. Clin. Invest., 40: 989-1005, 1961.

40.- BISHOP, C.R., ATHENS, J.W., BOGGS, D.R., WARNER, H.R., CARTWRIGHT, G.E., and WINTROBE, M.M. "Leukokinetics studies XIII. A non-steady-state kinetic evaluation of the mechanism of cortisone-induced granulocytosis". J. Clin. Invest., 47: 249-260, 1968.

41.- GREENDYKE, R.M., BRADLEY, E.M., and SWISHER, S.N. "Studies on the effects of administration of ACTH and adrenal corticosteroids on erythrophagocytosis". J. Clin. Invest., 44: 746-753, 1965.

42.- DOIG, A., GIRDWOOD, R.H., DUTHIE, J.J.R., and KNOX, J.D.E. "Response of megaloblastic anaemia to prednisolone". Lancet, 2: 966-972, 1957.

43.- COSGRIFF, S.W. "Thromboembolic complications associated with ACTH and cortisone therapy". J. A. M. A., 147: 924-931, 1951.

44.- OZSOYLN, S., STRAUSS, H.S., and DIAMOND, L.K. "Effects of corticosteroids on coagulation of the blood". Nature, 195: 1214-1221, 1962.

45.- LANGLEY, J.N. "On teh physiology of the salicary secretion". J. Physiol (London), 1: 340-369, 1878.

46.- LANGLEY, J.N. "On the reaction of cell and nerve-ending to certains poisons, chiefly as regards the reaction of striated musde to nicotine and curare". J. Physiol (London), 33: 374-413, 1905.

47.- EHRLICH, P. "Beitrage zur Kenntnis der granulierten Bindegewebzellen und der eosinophilen leucocyten". Arch. Anat. Physiol, 3: 166-170, 1879.

48.- CLARK, A. J. "The antagonism of acetylcholine by atropine". J. Physiol (London), 61: 547-556, 1926.

49.- GADDUM, J.H. "The action of adrenalin and ergotamine on the uterus of the rabbit". J. Physiol (London), 61: 141-150, 1926.

50.- CASANDRA, R.S. and De NICOLA, A.F. "Hormona y Receptores". Endocrinología molecular, 2: 7-22 Editorial "El Ateneo", S.A., 1980.

51.- LEVEY, G.S. "Hormone receptor interaction: Molecular aspects". New York, Marcel Dekker, Inc., 1976.

52.- CHAN, L., and O'MALLEY, B.W. "Steroid hormone action: Recent advances". Ann. Intern. Med., 89: 694-701, 1978.

53.- HERERA CASTILLON, E. "Bioquímica de las hormonas. Características Generales" y "Hormonas hipotálamo-hipofisarias, hormonas tiroideas, hormonas de las cápsulas suprarrenales y control hormonal del metabolismo del Calcio y Fósforo". Bioquímica cap. 41 42: 907-976. Editorial Interamericana, 1986.

54.- LEVEY, G.S., and ROBINSON, A.G. "Introduction to the general principles of hormone-receptor interactions". Metabolism, 31: 639-645, 1982.

55.- POLLET, R.J., and LEVEY, G.S. "Principles of membrane receptor physioloy and their application to clinical medicine". Ann. Intern. Med., 92: 663-680, 1980.

56.- CHAN, L., and O'MALLEY, B.W. "Mechanism of action of the sex steroid hormones". New. Engl. J. Med., 294: 1322-1440, 1976.

57.- FELDMAN, D. "The role of hormone receptors in the action of adrenal steroids". Annu. Rev. Med., 26: 83-90, 1975.

58.- SCHMIDT, T.J., and LITWACK, G. "Activation of glucocorticoid-receptor complex". Physiol. Rev., 62: 1131-1189, 1982.

59.- CRABTREE, G.R., SMITH, K.A., and MUNCK, A. "Glucocorticoid receptors and sensitivy of isolated human leukemia and lymphoma cells". Cancer Res., 38: 4268-4272, 1978.

60.- WIRA, C.R., and MUNCK, A. "Glucocorticoid receptor complexes in rat thymus cells". J. Biol. Chem., 249: 5328-5336, 1974.

61.- MUNCK, A., and WIRA, C.R. "Methods for assessing hormone-receptor kinetics with cells in suspension: receptor-bound and nonspecifically bound hormone; cytoplasmic-nuclear translocation". In: O'Malley, F.W., Hardman, j.g. (eds) Methods in Enzymology, Vol 30 A. Academic Press, New York, pp. 255-264, 1975.

62.- SEKERIS, C.E., and VAN DER MEULEN, N. "Glucocorticoid binding proteins and their biological significance". Acta Endocr. suppl., 191: 173-179, 1974.

63.- O'MALLEY, B.W. "Mechanisms of actions of steroid hormones". New. Engl. J. Med., 284: 370-378. 1971.

64.- SCHUTZ, G., KILLEWICH, L., CHEN, G., and FEIGELSON, P. "Control of the mRNA for hepatic tryptophan oxygenease during hormonal and substrate induction". Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 72: 1017-1020, 1975.

65.- IYNEDJIAN, P.B., and HANSON, R.W. "Messenger RNA for renal phosphoenolpyruvate carboxykinase and its regulation by glucocorticoids and by changes in acid base balance". J. Biol. Chem., 252: 8398-8403, 1977.

66.- BALLARD, P.L., BAXTER, J.D., HIGGINS, S.J., ROUSSEAU, G.C., and TOMKINS, G.M. "General presence of glucocorticoid receptors in mammalian tissues". Endocrinology, 94: 998-1002, 1974.

67.- McGUIRE, W.L. "An update on estrogen and progesterone receptors in prognosis for primary and advanced breast cancer". In: Hormones and Cancer, p. 337. New York. Raven Press, 1980.

68.- CRABTREE, G.R., SMITH, K.A., and MUNCK, A. "Glucocorticoid receptors". In. Methods in Hematology "The leukemia cell", 9: 252-269. Edited by D. Catavsky, Churchill Livingstone, 1981.

69.- MUNCK, A., and BRINCK-JOHNSEN, T. "Specific and nonspecific physiochemical interaction of glucocorticoids and related steroids in rat thymus cells in vitro". J. Biol. Chem., 243: 5556-5565, 1968.

70.- MUNCK, A. "General aspects of steroid hormone-receptor interactions". In: Pasqualini, j.r. (ed) Receptors and Mechanism of Action of Steroid Hormone Part. I. Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 1-40, 1976.

71.- BAXTER, J.D., and TOMKINS, G.M. "Specific cytoplasmic glucocorticoid hormone receptors in hepatoma tissue culture cells". Proc. Natt. Acad. Sci., 68: 932-937, 1971.

72.- SIMONSSON, B., TERENIUS, L., and NILSSON, K. "Glucocorticoid receptors, clinical characteristics, and implications for prognosis in chronic lymphocytic leukemia". Cancer, 49: 2493-2496, 1982.

73.- LIPPMAN, M.E., HALTERMAN, R., LEVENTHAL, B.G., PERRY, S., and THOMPSON, E.B. "Glucocorticoid binding proteins

in human acute lymphoblastic leukemia blast cells". J. Clin. Invest., 52: 1715-1725, 1973.

74.- LIPPMAN, M.E., HALTERMAN, R., PERRY, S., LEVENTHAL, B.G., and THOMPSON, E.B. "Glucocorticoid binding proteins in human leukaemia lymphoblasts". Nat. New Biol., 242: 157-158. 1973.

75.- LIPPMAN, M.E., PERRY, S., and THOMPSON, E.B. "Glucocorticoid binding proteins in myeloblasts of acute myelogenous leukemia". Am. J. Med., 59: 224-227, 1975.

76.- GAILANI, S., MINOWADA, J., SILVERNAIL, S., NUSSBAUM, A., KAISER, N., ROSEN, F., and SHIMAOKA, K. "Specific glucocorticoid binding in human hematopoetic cell lines and neoplastic tissue". Cancer Res., 33: 2653-2657, 1975.

77.- DUVAL, D., and HOMO, F. "Prognostic value of steroid receptor determination in leukemia". Cancer Res., 38: 4263-4267, 1978.

78.- MUNCK, A., and WIRA, C. "Glucocorticoids receptors in rat thymus cell". In: G.L. Raspe (ed), Advances in the Biosciences, p. 301. Elmsford, N. Y. Pergamon Press, Inc., 1971.

79.- IACOBELLI, S., LONGO, P., MASTRANGELO, R., MALANDRINO, R. and RANELLETTI, F.O. "Glucocorticoid receptors and steroid sensitivy of acute lymphoblastic leukemia and thimoma". In: S. Iacobelli, R.J.B. King, H.R. Lindner, and M.E. Lippman (eds.), Hormones and Cancer, p. 671. New York: Raven Press, 1980.

80.- MARCHETTI, P., NATOLI, V., RANELLETTI, F.O., MANDELLI, F., De ROSSI, G., and IACOBELLI, S. "Glucocorticoid receptor studies in human leukemia". J. Steroid Biochem., 15: 261-268, 1981.

81.- SLOMAN, J.C., and BELL, P. "Glucocorticoids and myeloid leukemia". In: Glucocorticoid action and leukemia, p. 161, Cardiff, Wales: Alpha Omega Alpha Publishing Ltd., 1979.

82.- NANNI, P., NICOLETTI, G., PRODI, G., GALLI, M.C., De GIOVANNI, C., GRILLI, S., LOLLINI, P.L., GOBBI, M., CAVO, M., and TURA, S. "Glucocorticoid receptor and in vitro sensitivy to steroid hormones in human lymphoproliferative diseases and myeloid leukemia". Cancer, 49: 623-632, 1982.

83.- BLOOMFIELD, C.D., SMITH, K.A., PETERSON, B.A., and MUNCK, A. "Glucocorticoid receptors in adult acute lymphoblastic leukemia". Cancer Res. 41: 4857-4860, 1981.

84.- IACOBELLI, S., NATOLI, V., LONGO, P., RANELLETTI, F.O., De ROSSI, G., PASQUALETTI, D., MANDELLI, F., and MASTRANGELO, R. "Glucocorticoid receptor determinations in leukemia patients using cytosol and whole-cell assays". Cancer Res., 41: 3979-3984, 1981.

85.- LIPPMAN, M.E. "Clinical implications of glucocorticoid receptors in human leukemia". Am. J. Physiol., 243: (Endocrinol. Metab., 6): E103-E108, 1982.

86.- SMITH, K.A., CRABTREE, G.R., KENNEDY, S.J., and MUNCK,

A. "Glucocorticoid receptors and glucocorticoid sensitivy of mitogen stimulated and unstimulated human lymphocytes". Nature (Lond.), 267: 523-526, 1977.

87.- NEIFELD, J.P., LIPPMAN, M.E., and TORMEY, D.C. "Steroid hormone receptors in normal human lymphocytes. Induction of glucocorticoid receptor activity by phytohemagglutinin stimulation". J. Biol. Chem., 254: 2972-2977, 1977.

88.- KONTULA, K., ANDERSON, J.L., PAAVONEN, T., MYLLYLA, G., TEERENMOVI, L., and VUOPIO, P. "Glucocorticoid receptors and glucocorticoid sensitivity of human leukemia cells". Int. J. Cancer, 26: 177-183, 1980.

89.- HO, A.D., HUNSTEIN, W., and SCHMID, W. "Glucocorticoid receptors and sensitivity in leukemias". Blut., 42: 183-190, 1981.

90.- SCHLECHTE, J.A., GINSBERG, B.H., and SHERMAN, B.M. "Regulations of the glucocorticoid receptor in human lymphocytes". J. Steroid Biochem., 16: 69-74, 1982.

91.- SHIPMAN, G.F., BLOOMFIELD, C.D., KAZIMIERA, J.G.P., MUNCK, A., and SMITH, K. "Glucocorticoid and lymphocytes. III. Effects of glucocorticoid administration on lymphocyte glucocorticoid receptors". Blood, 61: 1086-1090, 1983.

92.- DISTELHORST, C.W., and BENUTTO, B.M. "Glucocorticoid receptor of T lymphocytes: evidence for heterogeneity". J. Immunol., 126: 1630-1634, 1981.

93.- HOMO, F., and DUVAL, D. "Human thymus cells: efects of glucocorticoids in vitro". J. Clin. Lab. Immunol., 2: 329-332, 1979.

94.- BLOOMFIELD, C.D., SMITH, K.A., HILDEBRANDT, L., ZALESKAS, J., GAJL-PECZALSKA, K.J., FRIZZERA, G., PETERSON, B.A., KERSEY, J.H., CRABTREE, G.R., and MUNCK, A. "The therapeutic utility of glucocorticoid receptor studies in non-Hodgkin's malignant lymphoma". In: S. Iacobelli, R.J.B. King, H.R. Lindner and M.E. Lippman (eds.), Hormones and Cancer, p. 345. New York: Raven Press, 1980.

95.- COSTIOW, M.E., CHING-HON PUI, and DAHL, G.V. "Glucocorticoid receptors in childhood acute lymphocytic leukemia". Cancer Res., 42: 4801-4806, 1982.

96.- LIPPMAN, M.E., and BARR, R. "Glucocorticoid receptors in purified subpopulations of human peripheral blood lymphocytes". J. Immunol., 118: 1977-1981, 1977.

97.- HOMO-DELARCHE, F. "Glucocorticoid receptors and steroid sensitivity in normal and neoplastia human lymphoid tissues: A review". Cancer Res., 44: 431-437, 1984.

98.- HOMO, F., DUVAL, D., THIERRY, C., and SERROU, B. "Human lymphocyte subpopulations: effects of glucocorticoids in vitro". J. Steroid Biochem., 10: 609-613, 1979.

99.- MUNCK, A., and YOUNG, D.A. "Corticosteroids and lymphoid tissue". In: D.F. Steiner and N. Freinkel (eds.), Handbook of Physiology, Section 7, Vol. 6, p. 231. Washington, D.C.: American Physiological Society, 1975.

100.- BACH, J.F. "Corticosteroids". Front. Biol., 41: 21-27, 1975.

101.- SCHLECHTE, J., and SHERMAN, B. "The glucocorticoid receptor-Regulation by hormone administration". Endocrine Society, 63rd Annual Meeting, June 17-19, p. 256 (abstr), 1981.

102.- SHIPMAN, G.F., BLOOMFIELD, C.D., SMITH, K.A., PETERSON, B.A., and MUNCK, A. "The effects of glucocorticoid therapy on glucocorticoid receptors in leukemia and lymphoma". Blood., 58: 1198-1202, 1981.

103.- BLOOMFIELD, C.D., SMITH, K.A., PETERSON, B.A., HILDEBRANDT, L., ZALESKAS, J., GAJL-PECZALSKA, K.J., FRIZZERA, G., and MUNCK, A. "In-vitro glucocorticoid studies for predicting response to glucocorticoid therapy in adults with malignant lymphoma". Lancet, 1: 952-956, 1980.

104.- BOURGEOIS, S., and NEWBY, R.H. "Diploid and haploid states of the glucocorticoid receptor gene of mouse lymphoid cell lines". Cell, 11: 423-430, 1977.

105.- BIRD, C.C. "Clinical classification of leukemia and lymphoma in relation to glucocorticoid therapy". In: Glucocorticoid Action and Leukemia. 7th Tenovus Workshop, p. 123. Cardiff, Wales: Alpha Omega Publishing, Ltd., 1979.

106.- LIVINGSTON, R.B., and CARTER, S.K. (Editors): Single Agents in Cancer Chemoterapy. Plenum Press, New York, 1970.

107.- GOLDIN, A., SANDBERG, J.S., and HENDERSON, E.S. "The chemotherapy of human and animal acute leukemia". Cancer Chemother Rep., 55: 309-507, 1971.

108.- CRIST, W., VOGLER, L., SARRIF, A., PULLEN, J., BARTOLUCCI, A., FALLETA, J., HUMPHREY, B., BAN EYS, J., and COPPER, M. "Clinical and laboratory characterization of a pre-B cell leukemia in children". Blood, 54 (Suppl.): 183a, 1979.

109.- KONIOR YARBRO, G.S., LIPPMAN, M.E., JOHNSON, G.E., and LEVENTHAL, B.G. "Glucocorticoid receptors in subpopulations of childhood acute lymphocytic leukemia". Cancer Res., 37: 2688-2695, 1977.

110.- NARAY, A., REVESZ, T., WALCZ, E., SCHULER, D., and HORVATH, I. "Glucocorticoid receptors in acute leukemia of childhood". Orv. Hetil., 121: 3175-3176, 1980.

111.- GALILI, N., and GALILI, U. "Glucocorticoid induced lysis of various subsets of acute lymphoblastic leukemia". In: Moderm Trends in Human Leukemia V, Hematology and Blood Transfusion, Vol. 28, in press, 1983.

112.- HOMO, F., DUVAL, D., HAROUSSEAU, J.L., MARIE, J.P., and ZITTOUN, R. "Heterogeneity of the in vitro response to glucocorticoid in acute leukemia". Cancer Res., 40: 2601-2608, 1980.

113.- THIEL, E., RODT, H., HUHN, D., NETZEL, B., GROSSE-WILDE, H., GENESHAGURU, K., and THIERFELDER, S. "Multimarker-

classification of acute lymphoblastic leukemia: Evidence for further T subgroups and avaluation of their clinical significance". Blood, 56: 759-772, 1980.

114.- CRABTREE, G.R., SMITH, K.A., and MUNCK, A. "Glucocorticoid receptors and in vitro sensitivity of cells from patiens with leukemia and lymphoma: a reassessment". In: Glucocorticoid Action and Leukemia. 7th Tenovus Workshop, p. 191. Cardiff, Wales: Alpha Omega Publishing, Ltd., 1979.

115.- MASTRANGELO, R., MALANDRINO, R., RICARDI, R., LONGO, P., RANELLETTI, F.O., and IACOBELLI, S. "Clinical implications of glucocorticoid receptor studies in childhood lymphoblastic leukemia". Blood., 56: 1036-1040, 1980.

116.- HO, A.D., HUNSTEIN, W., GANESHAGURU, K., HOFFBRAND, A.W., BRANDEIS, W.E., and DENK, B. "Therapeutic and prognostic implications of glucocorticoid receptors and terminal deoxynucleotidyl transferase in acute leukemia". Leuk. Res., 6: 1-8, 1982.

117.- FERNANDEZ, L.A., MacSWEEN, J.M., and LANGLEY, G.R. "Effect of treatment on T-cell function in chronic lymphocytic leukemia". Br. J. Haematol., 38: 171-178, 1978.

118.- GALTON, D.A.G., WILTSHAW, E., SZUR, L., and DACIE, J.V. "The use of chlorambucil and steroids in the treatment of chronic lymphocytic leukemia". Br. J. Haematol., 7: 73-82, 1961.

119.- BOGGS, D.R., SOFFERMAN, S.A., WINTROBE, M.M., and CAR-

TWRIGHT, G.E. "Factors influencing the duration of survival of patiens with chronic limphocytic leukemia". Am. J. Med., 40: 243-250, 1966.

120.- HAN, T., EZDINLI, E.Z., SHIMAOKA, K., and DESAI, D.V. "Cholorambucil vs. combined chlorambucil-cortocosteroid therapy in chronic lymphocytic leukemia". Cancer, 31: 502-510, 1973.

121.- HOMO, F., DUVAL, D., MEYER, P., BELAS, F., DEBRE, P., and BINET, J.L. "Chronic lymphatic leukemia: cellular effects of glucocorticoids in vitro". Br. J. Haematol., 38: 491-499, 1978.

122.- STEVENS, J., STEVENS, Y.W., and ROSENTHAL, R.L. "Characterization of cytosolic and nuclear glucocorticoid binding components in human lymphocytes". Cancer Res., 39: 4939-4948, 1979.

123.- STEVENS, J., STEVENS, Y.W., SLOAN, E., ROSENTHAL, R., and RHODES, J. "Nuclear glucocorticoid binding in chronic lymphatic leukemia lymphocytes". Endocr. Res. Commun., 5: 91-108, 1978.

124.- TERENIUS, L., SIMONSSON, B., and NILSON, K. "Glucocorticoid receptors, DNA synthesis, membrane antigens and their relation to disease activity in chronic lymphatic leukemia". J. Steroid Biochem., 7: 905-909, 1976.

125.- SLOMAN, J.C., and BELL, P.A. "Glucocorticoids and myeloid leukemia". In: Glucocorticoid Action and Leukemia, 7th Tenovus Workshop, p. 161. Cardiff, Wales: Alpha

Omega Publishing, Ltd., 1979.

126.- GALILI, U., LEIZEROWITZ, R., MOREB, J., GAMLIEL, H., GURFEL, D., and POLLIACK, A. "Metabolic and ultrastructural aspects of the in vitro lysis of chronic lymphocytic leukemia cells by glucocorticoids". Cancer Res., 42: 1433-1440, 1982.

127.- SCHREK, R. "Prednisolone sensitive and cytology of viable lymphocytes as tests for chronic lymphocytic leukemia". J. Natl. Cancer. Inst., 33: 837-847, 1964.

128.- SHANBROM, E., and MILLER, S. "Critical evaluation of massive steroid therapy of acute leukemia". New. Engl. J. Med., 266: 1354-1358, 1962.

129.- CRABTREE, G.R., BLOOMFIELD, C.D., SMITH, K.A., McKENNA, R.W., and PETERSON, B.A. "Glucocorticoid receptors and in vitro responses to glucocorticoid in acute nonlymphocytic leukemia". Cancer Res., 41: 4853-4856, 1981.

130.- BENNETT, J.M., CATOVSKY, D., DANIEL, M.T., FLANDRIN, G., GALTON, D.A.G., GRALNICK, H.R., and SULTAN, C. "Proposals for the classification of the acute leukaemias". French-American-British (FAB) Co-operative Group. Br. J. Haematol., 33: 451-458, 1976.

131.- CLINE, M.J., and ROSENBAUM, E. "Prediction of in vivo cytotoxicity of chemotherapeutic agents by their in vitro effect on leukocytes from patiens with acute leukemia". Cancer Res., 28: 2516-2521, 1968.

132.- KOEFFLER, H.P., GOLDE, D.W., and LIPPMAN, M.E. "Glucocorticoid sensitivity and receptors in cells of human myelogenous leukemia lines". Cancer Res., 40: 563-566, 1980.

133.- IACOBELLI, S., RANELLETI, F.O., LONGO, P., RICARDI, R., and MASTRANGELO, R. "Discrepancies between in vivo and in vitro effects of glucocorticoids in myelomonocytic leukemic cells with steroid receptors". Cancer Res., 38: 4257-4262, 1978.

134.- KOEFFLER, M.P., and GOLDE, D.W. "Humoral modulation of human acute myelogenous leukemia cell growth in vitro". Cancer Res., 40: 1858-1862, 1980.

135.- GOLDE, D.W., and CLINE, M.J. "Hormonal interactions with hematopoietic cells in vitro". Transpl. Proc., 10: 95-97, 1978.

136.- HONMA, Y., KASUKABE, T., OKABE, J., and HOZUMI, M. "Glucocorticoid induced differentiation of cultured mouse myeloid leukemia cells". Gann, 68: 241-246, 1977.

137.- HONMA, Y., KASUKABE, T., and HOZUMI, M. "Production of differentiation stimulating factor in cultured mouse myeloid leukemia cells treated by glucocorticoids". Exp. Cell. Res., 111: 261-267, 1978.

138.- KURLAND, J.I., PELUS, L.M., RALPH, P., BOCKMAN, R.S., and MOORE, M.A. "Induction of prostaglandin E synthesis in normal and neoplastic macrophages: role for colony-stimulating factor(s) distinct from effects on myeloid progenitor cells proliferation". Proc. natn. Acad. Sci.

U.S.A., 76: 2326-2329, 1979.

139.- TAETLE, R., and KOESSLER, A. "Effects of cyclic nucleotides and prostaglandins on normal and abnormal human myeloid progenitor proliferation". Cancer Res., 40: 1223-1229, 1980.

140.- HONMA, Y., KASUKABE, T., and HOZUMI, M. "Inhibition of differentiation of cultured mouse myeloid leukemia cells by non steroidal antiinflammatory agents and counteraction of the by prostaglandin E". Cancer Res., 39: 2190-2194, 1979.

141.- HOMO, F., DURANT, S., DUVAL, D., MARIE, J.P., ZITTOUNT, R., and HAROUSSEAU, J.L. "Glucocorticoid receptors and hormonal responsiveness of human blood and bone-marrow cells in non-lymphocytic leukemia". J. Steroid, Biochem., 15: 479-485, 1981.

142.- ERNST, P., and KILLMAN, S.A. "Perturbation of generation cycle of human leukemic blast cells by cytostatic therapy in vivo: effect of corticosteroids". Blood, 36: 689-696, 1970.

143.- FRANKFURT, O.S. "Effect of hydrocortisone adrenalin and actinomycin D on transition of cells to the DNA synthesis phase". Exp. Cell Res., 52: 222-232, 1968.

144.- HARMON, J.M., NORMAN, M.R., FOWLKES, B.J., and THOMPSON, E.B. "Dexamethasone induces irreversible G1 arrest and death of a human lymphoid cell line". J. Cell. Physiol., 98: 267-278, 1979.

145.- BAGLEY, C.M., DeVITA, V.T. Jr, BERARD, C.W., and CANELLOS, G.P. "Advanced lymphosarcoma: Intensive cyclical combination chemotherapy with cyclophosphamide, vincristine, and prednisone". Ann. Intern. Med., 76: 227-234, 1972.

146.- CANELLOS, G.P., LISTER, T.A., and SKARIN, A.T. "Chemotherapy of the non-Hodgkin's lymphomas". Cancer, 42: 932-940, 1978.

147.- COLTMAN, C.A., LUCE, J.K., McKELVEY, E.M., JONES, S.E., and MOON, T.E. "Chemotherapy of non-Hodgkin's lymphoma: 10 years experience in the Southwest Oncology Group". Cancer Treat. Rep., 61: 1067-1078, 1977.

148.- DeVITA, V.T. Jr, CANELLOS, G.P., CHABNER, B., SCHEIN, P., HUBBARD, S., and YOUNG, R.C. "Advanced diffuse histiocytic lymphoma, a potentially curable disease". Lancet, 1: 248-250, 1975.

149.- SCHEIN, P.S., DeVITA, V.T. Jr, HUBBARD, S., CHABNER, B.A., CANELLOS, G.P., BERARD, C., and YOUNG, R.C. "Bleomycin, adriamycin, cyclophosphamide, vincristine and prednisone (BACOP) combination chemotherapy in the treatment of advanced diffuse histiocytic lymphoma". Ann. Intern. Med., 85: 417-422, 1976.

150.- FORTUNY, I.E., THEOLOGIDES, A., and KENNEDY, B.J. "Single, combined and sequential use of uracil mustard and prednisone in the treatment of lymphoreticular tumors". Minn. Med., 55: 715-716, 1972.

151.- JONES, S.E., ROSENBERG, S.A., KAPLAN, H.S., KADIN, M.E., and DORFMAN, R.F. "Non-Hodgkin's lymphomas. II. Single agent chemotherapy". Cancer, 30: 31-38, 1972.

152.- LIVINGSTONE, R.B., and CARTER, S.K. "Prednisone and prednisolone". In: Single Agents in Cancer Chemotherapy. IFI/Plenum, New York, pp. 337-358, 1970.

153.- McCLEAN, J.W., KIELY-GRANDBOIS, K., HURD, D.D., PETERSON, B.A., and BLOOMFIELD, C.D. "Glucocorticoid toxicity in patiens treated for non-Hodgkin's lymphoma". Proc. Am. Soc. Clin. Oncol., 2: 217, 1983.

154.- BLOOMFIELD, C.D., SMITH, K.A., PETERSON, B.A., GAJL-PECZALSKA, K.J., and MUNCK, A.U. "In vitro glucocorticoid studies in human lymphoma: Clinical and biologic significance". J. Steroid Biochem., 15: 275-284, 1981.

155.- BLOOMFIELD, C.D., MUNCK, A.U., and SMITH, K.A. "Glucocorticoid receptor levels predict response to treatment in human lymphoma". Prog. Clin. Biol. Res., 142: 223-233, 1984.

156.- MAUER, A.M., and FISHER, O. "Comparison of the proliferative capacity of acute leukemia cells in bone marrow and blood". Nature (Lond.), 193: 1085-1086, 1962.

157.- BLOOMFIELD, C.D. "Glucocorticoid receptors in leukemia and lymphoma". J. Clinical Oncol., 2: 323-328, 1984.

158.- KAINE, J.L., NIELSEN, C.J., and PRATT, W.B. "The kinetics of specific glucocorticoid binding in rat thymus

cortisol: evidence for the existence of multiple binding states". Mol. Pharmacol., 11: 578-587, 1975.

159.- KRIEGER, N.S., MIDDLEBROOK, J.L., and ARANOW, L. "Effect of salt on reversibility of glucocorticoid receptor binding". J. Steroid Biochem., 7: 395-399, 1976.

160.- RAFESTIN-OBLIN, M.E., MICHAUD, A., CLAIRE, M., and CORVOL, P. "Dramatic protective effect of ligand against thermal degradation on minerals and glucocorticoid receptors of rat kidney". J. Steroid Biochem., 8: 19-23, 1977.

161.- SCHULTE, H.F., NIELSEN, C.J., SANDRO, J.J., and PRATT, W.B. "Evidence for a phospholipid requirement in the specific binding of glucocorticoids to receptors of fibroblasts and thymic lymphocytes". J. Biol. Chem., 251: 2279-2289, 1976.

162.- SUTHERS, H.B., PRESSLEY, L.A., and FUNDER, J.W. "Glucocorticoid receptors: Evidence for a second. Non glucocorticoid binding site". Endocrinology, 99: 260-269, 1976.

163.- WERTHAMER, S., SAMUELS, A.J., and AMARAL, L. "Identification and partial purification of 'Transcortin'-like protein within human lymphocytes". J. Biol. Chem., 248: 6398-6407, 1973.

164.- MILGROM, E., LUU THI, M., and BAULIEU, E.E. "Control mechanisms of steroid hormone receptors in the reproductive tract". In: Karolinska symposia on Research Methods

in Reproductive Endocrinology. Sixth Symposium: Protein Synthesis in Reproductive Tissue, pp. 380-403, 1973.

165.- BEATO, M., KALIMI, M., BEATO, W., and FEIGELSON, P. "Interaction of glucocorticoids with rat liver nuclei: Effect of adrenalectomy and cortisol administration". Endocrinology, 94: 377-387, 1974.

166.- FELDMAN, D., FUNDER, J.W., and EDELMAN, I.S. "Evidence for new class of corticosterone receptors in the rat kidney". Endocrinology, 92: 1429-1441, 1973.

167.- GREGORY, M.C., DUVAL, D., and MEYER, P. "Changes in cardiac and hepatic glucocorticoid receptors after adrenalectomy". Clin. Sci. Mol. Med., 51: 487-493, 1976.

168.- DUVAL, D., DARDENNE, M., DAUSSE, J.P., and HOMO, F. "Glucocorticoid receptors in corticosensitive and corticoresistant thymocyte subpopulations. II. Studies with hydrocortisone treated mice". Bochim. Biophys. Acta, 496: 312-320, 1977.

169.- DUVAL, D., DAUSSE, J.P., and DARDENNE, M. "Glucocorticoid receptors in corticosensitive and corticoresistant thymocyte subpopulations. I. Characterization of glucocorticoid receptors and isolation of a corticoresistant subpopulation". Biochim. Biophys. Acta, 451: 82-91, 1976.

170.- SCHAUMBURG, B.P., and CRONE, M. "Binding of corticosterone of thymus cells, bursa cells and blood lymphocytes from the chicken". Biochim. Biophys. Acta, 237: 494-501,

1971.

171.- FAUCI, A.S., and DALE, D.C. "The effect of hydrocortisone on the kinetics of normal human lymphocytes". Blood, 46: 235-241, 1975.

172.- SHORTMAN, K., and JACKSON, H. "The differentiation of lymphocytes. I. Proliferation kinetics and interrelationships of subpopulations of mouse thymus cells". Cellular Immunol., 12: 230-246, 1974.

173.- YU, D.T., CLEMENTS, P.J., PAULUS, H.E., PETER, B.J., LEVY, R., and BARNETT, E.V. "Human lymphocytes subpopulations: Effects of corticosteroids". J. Clin. Invest., 53: 565-571, 1974.

174.- GIANOPOULUS, G. "Ontogeny of glucocorticoid receptors in rat liver". J. Biol. Chem., 250: 5847-5851, 1975.

175.- GIANOPOULUS, G., HASSAN, Z., and SOLOMON, S. "Glucocorticoid receptors in fetal and adult tissues". J. Biol. Chem., 249: 2424-2427, 1974.

176.- KOEHLER, D.E., and MOSCONA, A.A. "Corticosteroid receptors in the neural retina and other tissues of the chick embryo". Arch. Biochem. Biophys., 170: 102-113, 1975.

177.- LIPPMAN, M.E., WIGGERT, B.O., CHADER, G.J., nad THOMPSON, E.B. "Glucocorticoid receptors. Characteristics, specificity and ontogenesis in the embryonic chick neural retina". J. Biol. Chem., 249: 5916-5917, 1974.

178.- CIDLOWSKI, J.A., and MICHAELS, G.A. "Alterations in glucocorticoid binding site number during the cell cycle in HeLa cells". Nature, 266: 643-645, 1977.

179.- MUNCK, A., WIRA, C., YOUNG, D.A., MOSHER, K.M., HALLAHAN, C., and BELL, P.A. "Glucocorticoid receptor complexes and the earliest steps in the action of glucocorticoids on thymus cells". J. Steroid Biochem., 3: 567-578, 1972.

180.- NIELSEN, C.J., SANDO, J.S., and PRATT, W.B. "Evidence that dephosphorylation inactivates glucocorticoid receptors". Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 74: 1398-1402, 1977.

181.- DEFER, N., DASTUGUE, B., and KRUH, J. "Rat liver chromatine non-histone proteins and glucocorticoid binding". Biochimie, 56: 1549-1557, 1974.

182.- DEFER, N., DASTUGUE, B., KRUH, J., DEFORT, J.J., BECK, G., and BECK, J.P. "Comparison of glucocorticoid cytoplasmic receptors from liver, zajdela hepatoma and HTC cells". Federation European Bichem. Soc. Letters, 45: 179-183, 1974.

183.- NIELSEN, C.J., SANDO, J.S., VOGEL, W.M., and PRATT, W.B. "Glucocorticoid receptor inactivation under cell-free conditions". J. Biol. Chem., 252: 7568-7578, 1977.

184.- NORMAN, M.R., and THOMPSON, E.B. "Characterization of a glucocorticoid-sensitive human lymphoid cell line". Cancer Res., 37: 3785-3791, 1977.

185.- De MOOR, P., and LOUWAGIE, A. "Association of aberrant transcortin levels with HLA antigens and of the B and C loci: high transcortin levels are frequently found in patiens with lymphatic, hairy cell leukemia, or non-Hodgkin lymphoma". J. Clin. Endocrinol. Metab., 51: 868-872, 1980.

186.- BECKER, B., SHIN, D.H., PALMBERG, P.F., and WALTMAN, S.R. "HLA antigens and corticosteroid response". Science (Wash. d.c.), 194: 1427-1428, 1976.

187.- BUTLEY, M.S., ERICKSON, R.P., and PRATT, W.B. "Hepatic glucocorticoid receptors and the H_2 locus". Nature (Lond.), 275: 136-138, 1978.

188.- GUPTA, C., and GOLDMAN, A. "H_2 histocompatibility region: influence on the murine glucocorticoid receptor and its response". Science (Wash. d.c.), 216: 994-996, 1982.

189.- FORKER, A.D., BOLLINGER, R.E., MORRIS, J.H., and LARSON, W.E. "Metabolism of cortisol-C^{14} by human peripheral leukocyte cultures from leukemic patiens". Metab. Clin. Exp., 12: 751-759, 1963.

190.- JEMKINS, J.S., and KEMP, N.H. "Metabolism of cortisol by human leukemic cells". J. Clin. Endocrinol., 29: 1217-1221, 1969.

191.- KLEIN, A., BESSLER, H., HOOGERVORST-SPALTER, H., KAUFMANN, H., DJALDETTI, M., and JOSHUA, H. "A difference between human B and T lymphocytes regarding their capa-

city to metabolize cortisol". J. Steroid Biochem., 13: 517-520, 1980.

192.- KIRKPATRICK, A.F., MILHOLLAND, R.J., and ROSEN, F. "Stereospecific glucocorticoid binding to subcellular fractions of the sensitive and resistant lymphosarcoma P1798". Nat. New Biol., 232: 216-218, 1971.

193.- ROSENAU, W., BAXTER, J.D., ROUSSEAU, G.G., and TOMKINS, G.M. "Mechanism of resistance to steroids: glucocorticoid receptor defect in lymphoma cells". Nat. New Biol., 237: 20-24, 1972.

194.- GILLIS, S., CRABTREE, G.R., and SMITH, K.A. "Glucocorticoid-induced inhibition of T cell growth factor production. I. The effect on mitogen-induced lymphocyte proliferation". J. Immunol., 123: 1624-1631, 1979.

195.- NAKAO, Y., TSUBOI, S., FUJITA, T., MASAKOA, T., MORIKAWA, S., and WATANABE, S. "Glucocorticoid receptors and terminal deoxynucleotidyl transferase activities in leukemic cells". Cancer (Phila.), 47: 1812-1817, 1981.

196.- SKOOG, L., NORDENSKJOID, B., OST, A., ANDERSSON, B., HAST, R., GIANNOULIS, N., HUMLA, S., HAGERSTROM, T., and REIZENSTEIN, P. "Glucocorticoid receptor concentrations and terminal transferase activity as indicators of prognosis in acute non-lymphocytic leukemia". Br. Med. J., 282: 1826-1829, 1981.

197.- RAI, K.A., SAWITSKY, A., CRONKITE, E.P., CHANANA, A.D., LEVY, R.N., and PASTERNACK, B.S. "Clinical staging of

chronic lymphocytic leukemia". Blood, 46: 219, 1975.

198.- BLOOMFIELD, C.D., HOLBROOK, N.J., MUNCK, A.U., et al. "Glucocorticoid receptors: In vitro - clinical correlations in human leukemia and lymphoma". In Raynaud J-P (ed): Second International Congress on Hormones and Cancer. New York, Raven Press (in press).

199.- SIMONSSON, B., NILSSON, K., TERENIUS, L., and GLIMELIUS, B. "Biochemical characteristics of chornic lymphocytic leukemia. Glucocorticoid receptors, B and T lymphocyte surface markers, concanavalin A-induced aglutination and thymidine incorporation". Scand Haematol, 21: 379-389, 1978.

200.- BAXTER, J.D., and FUNDER, J.W. "Hormone receptors". N. Engl. J. Med., 301: 1149-1161, 1979.

201.- PUI, C-H, COSTIOW, M.E., and KALWINSKY, D.K. "Glucocorticoid receptors in childhood acute non-lymphocytic leukemia". Leuk Res., 7: 11-16, 1983.

ABREVIATURAS.

ABREVIATURAS.

LLA.- Leucosis Linfoblástica Aguda.

LLC.- Leucosis Linfoide Crónica.

LANL.- Leucosis Aguda no Lifoblástica.

LMC Ag.- Leucosis Mieloide Crónica en crisis blástica.

RG.- Receptores de Glucocorticoides.

"G".- Glucocorticoide.

EC.- Ensayo Citoplasmático.

ECT.- Ensayo Celular Total.

PRN.- Prednisona.

SP.- Sangre periférica.

MO.- Médula ósea.

RC.- Remisión Completa.

RP.- Remisión Parcial.

F.- Fallo.