

Curso 1996/97
CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS

LUIS FERNANDO OTÓN SÁNCHEZ

**Metástasis hematógenas en pulmón irradiado.
Estudio experimental**

Director
CLAUDIO A. OTÓN SÁNCHEZ



SOPORTES AUDIOVISUALES E INFORMÁTICOS
Serie Tesis Doctorales

I.- INTRODUCCIÓN .-

La capacidad de producir metástasis, colonización de órganos en discontinuidad con el tumor primario, es una aptitud trascendental en las neoplasias malignas y con toda probabilidad la que efectos más devastadores produce¹¹⁰. El proceso de metastatización por vía hematógena es el resultado una serie de sucesos complejos en sus mecanismos íntimos, pero substanciados en dos condiciones: la competencia de la célula tumoral metastatizante y la receptividad del lecho que va a ser colonizado; la teoría de semilla y terreno (“seed and soil theory”)^{73,81,164}. Es lógico suponer que aquellos factores que modifiquen las características de una o la otra, puedan cambiar en cantidad o calidad tal proceso; de hecho, la práctica así lo sentencia^{6,9,11, 49,55,97,117,140,143}.

Las radiaciones ionizantes, aplicadas en dosis de las utilizadas para la terapia antineoplásica, producen alteraciones morfológicas y funcionales en los tejidos normales que muy bien pudieran trastocar la receptividad del lecho. Tal modificación, nunca bien documentada en la clínica¹²², ha sido objeto de algunos estudios experimentales en cuanto al número de metástasis, sin que los resultados hayan sido concluyentes como se expondrá más adelante en esta misma introducción. Tampoco existe documentación respecto al Efecto Lecho, la facilidad o dificultad que puedan encontrar las metástasis en su crecimiento tras los cambios inducidos por la radiación en el tejido de soporte.

1.1.- EL FENÓMENO DE LA METÁSTASIS .-

1.1.1.- *La cascada metastásica* .-

Se ha venido utilizando este término para designar la cadena de sucesos por la cual una célula tumoral o un grupo de ellas sería capaz de escindirse de su lugar de origen y vehiculizada por el torrente circulatorio sanguíneo o linfático, ganar un órgano distante para allí proliferar, perpetuando su estirpe en una nueva colonia.

Para entender el desarrollo de la capacidad metastatizante por un tumor es interesante contemplarlo desde un punto de vista convencionalmente darwiniano. En su estado natural, una comunidad de organismos o en este caso de células va acumulando una serie de mutaciones que determinan la variabilidad individual de cada uno de sus componentes. Con el tiempo, un pequeño porcentaje de esta población genotípicamente polimorfa responde a un cambio, fenotípico o de su entorno, aventajando a sus contemporáneos y accediendo a nuevos recursos de supervivencia⁴. No es sostenible la antigua hipótesis de que la metastatización se producía de manera pasiva como evolución natural del crecimiento del cáncer^{64,81}. Si tal evolución natural se produce es a través de la acumulación de probabilidades de que surja un fenotipo metastásico en una población cada vez más numerosa y heterogénea, pero tal comportamiento se ejerce de manera activa y deliberada.

Dada su complejidad, esta serie de acontecimientos puede arbitrariamente dividirse en tantos pasos como se desee^{64,110,111,112,162}. Para esta Introducción se ha venido a sistematizar en 12 etapas necesarias, enumeradas en la Tabla I. Esta auténtica carrera de obstáculos sólo puede ser superada si la célula tumoral se halla en posesión de características fenotípicas que den respuesta a cada problema en particular. No es sorprendente que de las células circulantes, menos de un 0,01% la completen con éxito^{4,64,66,110}.

Para los objetivos de esta tesis los sucesos acaecidos antes de la llegada, vía circulación, de las células tumorales al territorio irradiado (pasos uno a cinco de la Tabla I) no son relevantes, ya que el objeto del estudio reside la variabilidad del lecho. Además, las fases de intra y extravasación son notablemente semejantes en cuanto a los procesos bioquímico-moleculares y al comportamiento celular implicados⁶⁴; esto es, los puntos siete, ocho y nueve de la Tabla I son la imagen especular del dos, tres y cuatro. Por contra, todos los sucesos que dentro de la cascada metastásica se

TABLA I

Cascada Metastásica

- 1.-** Desprendimiento de la masa tumoral primaria.
- 2.-** Migración hasta un vaso sanguíneo.
- 3.-** Permeación a través de la membrana basal.
- 4.-** Permeación a través del endotelio eintravasación.
- 5.-** Circulación por el torrente sanguíneo, soportando la turbulencia mecánica y las defensas del huésped.
- 6.-** Anclaje en el endotelio del órgano diana.
- 7.-** Penetración a través del endotelio.
- 8.-** Penetración a través de la membrana basal.
- 9.-** Migración hasta el intersticio.
- 10.-** Creación de un microentorno favorable.
- 11.-** Proliferación.
- 12.-** Generación de angiogénesis para su propio sustento.

desarrollen sobre el lecho receptor de la metástasis, son de la máxima trascendencia en el experimento, ya que si la irradiación actúa en un sentido o en otro lo hará a través de la modificación de estos fenómenos. A continuación se abordan, haciendo hincapié en los factores dependientes del lecho.

1.1.1.1.- Anclaje al endotelio .-

Durante su transporte sanguíneo las células tumorales interactúan bien entre ellas mismas para formar agregados (adhesión homotípica) o bien a elementos circulantes del huésped como plaquetas y linfocitos (adhesión heterotípica)¹¹². Este comportamiento parece tener importancia, ya que en el primer caso está demostrado que los grandes trombos de células tumorales sobreviven significativamente más que los pequeños o las células aisladas³⁷. En cuanto a la heterotípica lo tiene porque ciertos sistemas enzimáticos necesarios en los siguientes pasos serán aportados eventualmente por las plaquetas y no exactamente por la célula tumoral⁴⁷.

Aunque algunos modelos de metastatización efectúan la extravasación por proliferación intravascular y rotura de la pared del vaso^{48,111}, la mayoría de los sistemas llevan a cabo la maniobra por medio de complejos sistemas que comienzan con la adherencia del elemento neoplásico al endotelio. Ningún elemento de la superficie celular, receptor de membrana o molécula parece ser completamente responsable de la especificidad del anclaje célula tumoral-endotelio¹¹¹. Sin embargo, diversos experimentos implican en el proceso a receptores del tipo integrinas y no integrinas que reconocen alguna glicoproteína, singularmente la fibronectina¹¹, el antígeno 4 de activación tardía (VLA-4)¹¹⁴, la molécula de adhesión celular vascular (VCAM-1)¹¹⁴, la conexina43³¹ y sobretodo la laminina⁶².

Laminina:

Esta glicoproteína es una molécula en forma de cruz con tres brazos cortos y uno largo. Su parte central, relativamente resistente a proteasas, contiene el punto de unión para su receptor específico⁸². Numerosas estirpes celulares tumorales y no tumorales presentan receptores de superficie para ella y la presencia de éstos así como su adición o inhibición pueden aumentar o disminuir respectivamente el rendimiento metastásico^{21,62,82,94,111,143,150, 152}.

El receptor de laminina puede intervenir de diversas formas en la adhesión de la célula tumoral al vaso^{21,82}:

- a/ Si el receptor de la célula tumoral está libre, viene a unirse directamente a la laminina de la superficie del endotelio.

(Figura 1a)

b/ Si el receptor está ocupado por laminina, ésta puede unirse a:

b₁/ receptores libres situados en la superficie del endotelio, probablemente a través de las regiones globulares del extremo de los brazos cortos. (Figura 1 b₁)

b₂/ colágeno tipo IV, en regiones expuestas de la membrana basal. (Figura 1 b₂)

Esta última posibilidad resulta interesante puesto que si bien las disrupciones en la basal son excepcionales¹²⁴, la radiación gamma puede inducir la retracción física del endotelio^{109,116}.

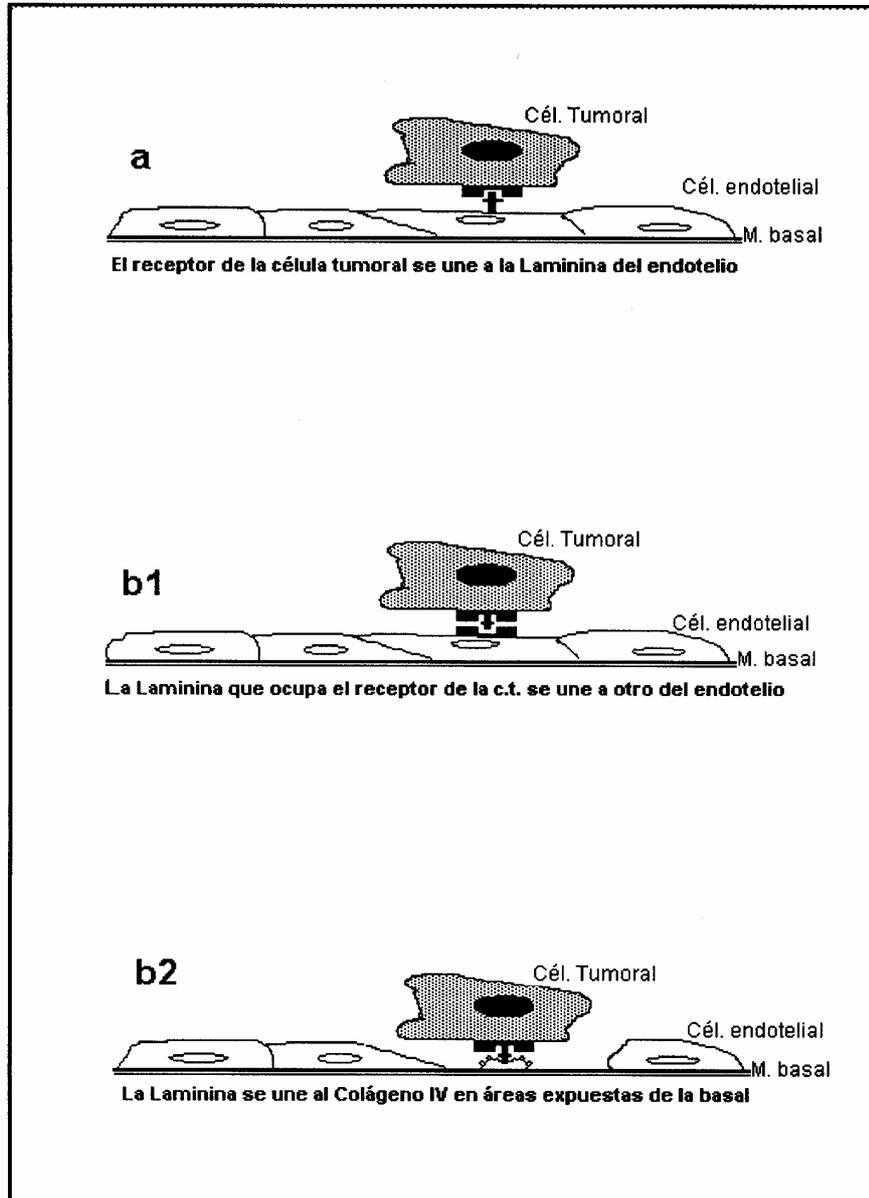
1.1.1.2.- Penetración del endotelio .-

Una vez en contacto con la superficie del endotelio, la célula tumoral o el grupo de ellas ha de superar la barrera que las propias células endoteliales constituye. La hipótesis más extendida es que este paso se efectuaría a través de una retracción física reversible de las células endoteliales, inducida directa o indirectamente por la célula metastatizante. Numerosas sustancias han mostrado su capacidad de inducir tal retracción, pero en modelos tumorales la más documentada es el ácido 12(S)-hidroxieicosatetraenoico (12[S]-HETE).

El 12(S)-HETE es un derivado del ácido aracnidónico, producido por oxidación a través de la 12-lipoxigenasa (12-LOX). Posee importantes funciones biológicas, es capaz de activar la proteína-quinasa y mediar las funciones de numerosos factores de crecimiento y citoquinas^{47,58,147}. Entre sus propiedades demostradas experimentalmente está la de inducir una retracción reversible de las células endoteliales, tanto en cultivo como “in vivo”⁴⁸.

La capacidad de las células tumorales para biosintetizar 12(S)-HETE se correlaciona con su potencial metastásico^{47,58}. Además, la retracción endotelial inducida por el tumor puede potenciarse con plaquetas homólogas, hallazgo que ofrece una explicación a la contribución plaquetaria al fenómeno de la metástasis, ya que poseen 12-LOX y son capaces de producir 12(S)-HETE⁴⁸.

Figura 1.-



1.1.1.3.-Penetración de la membrana basal .-

La penetración de la basal es probablemente el proceso más intensamente estudiado de los abordados en esta introducción, tanto porque constituye un importante evento para la intra y extravasación de la célula tumoral en la cascada metastásica, como sobretodo porque en una etapa más inicial en la historia de una neoplasia, supone la trascendental diferencia entre un carcinoma “in situ” y uno invasivo. Visto de otro modo, penetrar la basal es una lección ya aprobada por la célula carcinomatosa a estas alturas; otro tanto tuvo que hacer para dejar atrás el epitelio donde nació.

Hace años, Lance Liotta sistematizó las interacciones de la célula tumoral con la membrana basal y la matriz extracelular en tres pasos^{81,82,83}; esta sistematización sigue esencialmente vigente y será la que a continuación se utilice, con las aportaciones que la moderna bioquímica ha ido ofreciendo.

1.1.1.3.1.- Adhesión .-

La membrana basal consiste en una densa matriz de fibras de colágeno, glicoproteínas y proteoglicéridos¹⁰⁵. Puesto que la matriz subendotelial es usualmente un substrato adhesivo mucho mejor que la superficie endotelial, una vez que la retracción del endotelio ofrece los componentes de la basal, tiende a producirse un movimiento neto de la célula metastatizante hacia tales componentes¹¹¹.

Bastantes elementos de la membrana basal han sido identificados como moléculas de adhesión: colágeno tipo IV, proteoglicano heparán sulfato, fibronectina, vitronectina, factor de Von Willebrand, tenascina C y de nuevo, por supuesto, la laminina^{4,21,62,64,82,111,112,137,143,150}. Este reconocimiento se efectúa de manera análoga al de las Moléculas de Adhesión Celular (CAM), responsables de la arquitectura y estructura tridimensional de los tejidos^{64,148}. Las células metastásicas pueden además ligarse a componentes de la matriz extracelular asociados, pero no integrantes, de la basal, tales como la elastina y el ácido hialurónico¹¹¹. La Tabla II muestra los tipificados para el melanoma B16, objeto de la fase experimental de esta tesis, y su importancia relativa en cuanto a adhesividad.

TABLA II

Adhesión relativa de las células de melanoma
B16
a componentes de la membrana basal.

Laminina	+++
Fibronectina	++
Colágeno I/II	+
Colágeno IV/V	+
Heparán sulfato	+

1.1.1.3.2.- Degradación .-

De dos a ocho horas después de la fijación, una zona sumamente localizada de la membrana basal en contacto con la célula tumoral es lisada^{4,64}. A tal fin, es necesario que la célula tumoral segregue, o induzca a células vecinas a segregar, enzimas proteolíticas hasta que al menos en un punto la concentración de éstas supere a los inhibidores de proteasas presentes en el suero.

Una larga lista de enzimas degradativos han sido implicados en la proteólisis de la basal. La tabla III ilustra los conocidos, así como sus posibles inhibidores; pero entre los enumerados, la familia que más interés está provocando es la de las metaloproteasas.

Colagenasa tipo IV

Las fibras de colágeno representan un substrato clave para la degradación de la membrana basal, no en balde constituyen el armazón sobre el que el resto de los componentes se ensamblan¹⁰⁵. Los colágenos tipo IV y V de la membrana basal difieren substancialmente de los colágenos I, II y III intersticiales en cuanto a su susceptibilidad proteolítica: los primeros no son atacados por la clásica colagenasa intersticial que sí degrada a los segundos. Como era de prever se ha encontrado una metaloproteinasa colagenolítica tipo IV, precisamente en células tumorales metastásicas y en células endoteliales^{25,82}. De hecho, el nivel de colagenasa tipo IV está aumentado en muchos tumores altamente metastásicos^{81,82,84,94}, la actividad colagenasa IV se asocia con inducción genética del fenotipo metastásico⁴ y los agentes que inhiben la actividad o la secreción de colagenasa previenen la invasión de la célula tumoral “in vitro”^{4,82}.

Desde el punto de vista del huésped un elemento crucial parecen ser los inhibidores de estas metaloproteinasas. No se ha establecido si éstos son producidos por el tumor o por el lecho, como una defensa frente a la invasión. Los estudios que han utilizado la hibridación “in situ” favorecen la hipótesis de la defensa¹⁶², pero los tumores también pueden producir inhibidores; en una comparación de las líneas celulares de adenocarcinoma mamario murino, se pudo observar en las células metastásicas una concentración más baja de inhibidores que en las líneas no metastásicas¹²⁵.

TABLA III

Enzimas degradativas asociadas al tumor^{48,64,111}.

<u>Enzimas</u>	<u>Inhibidores</u>
Metaloproteasas -Colagenasas intersticiales -Gelatinasas (colagenasa IV) -Estromalisinas	 TIMP
Plasminógeno-Plasmina	 α_2 -MG
Catepsina B Catepsina D Catepsina G	 α_1 -PI
Elastasa	 α_1 -PI
Heparanasa y otras endoglicosidasas	 H
Exoglicosidasas	 H
Uroquinasa	 H

TIMP	= Inhibidor tisular de Metaloproteasa.
α_1 -PI	= α_1 -Proteinasa Inhibidor.
α_2 -MG	= α_2 -Macroglobulina.
H	= Heparina

1.1.1.3.3.- Migración .-

La locomoción es un requisito absoluto para la invasión y las metástasis, desarrollado por mecanismos físico-químicos necesariamente integrados en la biología de la célula metastásica. En su regulación intervienen mecanismos compartidos por otras células dotadas de motilidad, como son:

Quimiotaxis: motilidad direccional hacia un componente bioquímico.

Quimiocinesis: motilidad errática por la presencia del componente.

Haptotaxis: migración hacia un factor unido a un sustrato, en fase sólida.

La laminina, la fibronectina y el colágeno tipo IV provocan haptotaxis y quimiotaxis "in vitro"^{4,62}. Es factible pensar que las células tumorales, al tiempo que destruyen componentes de la membrana basal e intersticio, van creando su propio gradiente de concentraciones que facilita su migración direccional. Así pues, la cadena adhesión-proteólisis-migración constituye un mecanismo perfectamente acoplado e iterable cíclicamente para una más profunda invasión en la matriz extracelular.

Pero además, la célula tumoral es capaz de secretar sus propios factores de motilidad. Una familia de citoquinas producidas por células neoplásicas presentan importante actividad, principalmente quimiocinética^{4,84}, se trata de los factores de motilidad autocrinos (AMF). Posteriormente se identificó y secuenció un receptor específico⁴⁸, el *gp78*. Otras sustancias con actividad quimiotáctica demostrada son el 12(S)-HETE^{48,84}, la trombospondina⁸⁴, la bombesina⁸⁴, factores del Complemento¹¹⁷ y el Factor de crecimiento de tipo insulínico (FCI-1)⁴.

1.1.1.4.- Migración por el intersticio .-

El proceso físico químico del movimiento en sí se inicia con la unión de los factores de atracción a los receptores de membrana, activándose un sistema de transducción que induce mensajeros secundarios intracelulares. Estos mensajeros consiguen alterar la estructura de la capa cortical de la célula, que se expande en algunas regiones para formar protrusiones denominadas, dependiendo de su conformación, ruffles, filopodios o pseudópodos^{4,84}.

Aunque las glicoproteínas, primordialmente la fibronectina en el terreno intersticial, pueden contribuir a los aspectos direccionales de la respuesta motora, no son suficientes para mantener la locomoción intrínseca de las células metastatizantes. La disponibilidad de los atrayentes solubles dependería en gran medida del huésped y en el mejor de los casos la célula tendría acceso a tales estímulos a intervalos esporádicos⁸⁴, condición desfavorable para alcanzar una migración continuada. Para obviar esta desventaja las citoquinas, actuando como factores de motilidad autocrina,

inducen la formación de pseudópodos por su capacidad quimiocinética. Estos pseudópodos actuarían como “palpos”, ricos en receptores para componentes de la matriz que localizan indicadores direccionales y proporcionan sustrato para la tracción propulsiva. Además, la propia deformidad incluye organelas, entre las que se encuentran corpúsculos secretorios que por degradación proteica pueden fomentar la cadena adherencia-proteolisis-locomoción^{4,84}.

1.1.1.5.- Creación del microentorno .-

Existen pocas dudas de que habitualmente, cada colonia metastásica procede de una sola célula; a esta conclusión se ha llegado tanto por la monoclonalidad^{38,73} como por medidas carioquinéticas¹²⁶. La célula individual invierte las primeras horas o días en los fenómenos de invasión y acondicionamiento bioquímico del entorno.

Como se ha citado anteriormente, el factor de crecimiento insulínico y la propia insulina estimulan una respuesta quimiotáctica positiva en ciertas cepas tumorales. Puesto que ambos han sido implicados como factores de crecimiento necesarios para el cultivo de células de melanoma humano, el péptido puede servir como factor direccional (“homing”) conduciéndolas a un lugar secundario donde el microentorno sea favorable a su desarrollo⁴.

Alcanzada una localización lo suficientemente confortable, en la célula tumoral se manifiestan capacidades ya mostradas por su cepa en la colonia primaria: la respuesta a factores de crecimiento⁷³. La fuente de estos factores puede ser autocrina o paracrina, presentando cierta especificidad por órganos pero con actividad cruzada entre ellos¹¹¹. La expresión en contenido de RNA de algunos de estos factores ha sido cuantificada; por ejemplo en pulmón resulta mayor en una región afectada por tumor que en la indemne¹³⁵.

1.1.1.6.- Proliferación .-

En modelos experimentales, no existe reproducción celular antes del tercer día tras la inoculación^{85,126}. Es concebible que la célula metastásica invierta este lapso de tiempo en los pasos citados hasta aquí. A partir de ese momento, la proliferación progresa de manera exponencial de modo que los tiempos de duplicación se van reduciendo desde unos cinco días en

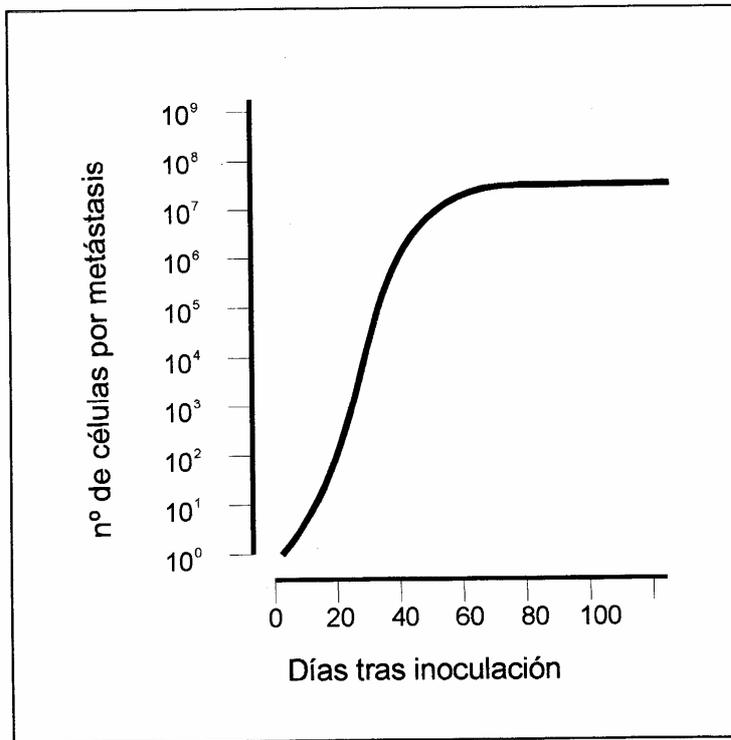


Fig. 2.- Curva de crecimiento de una metástasis

la primera semana hasta unas 30 horas el día 40 (Figura 2)¹²⁶. Este último valor es cercano a las 18 horas de un ciclo celular tipo; es decir, a esas alturas la metástasis se reproduce casi tan rápido como su propia biología le permite¹²⁶ y aparentemente sin otra cortapisa. Por contra en los primeros días la proliferación es mucho más pausada y este hecho se ha teorizado que puede deberse a una mayor oposición por parte de las defensas del huésped cuando la colonia es poco numerosa¹⁴⁹.

Obviamente, estas cinéticas de crecimiento se cumplen de modo bastante riguroso para modelos experimentales pero no para la mayoría de situaciones en la clínica, en las cuales la metástasis se mantiene en estado latente a veces a lo largo de muchos años^{50,57}.

Alcanzado un número de 100.000-1.000.000 de células por metástasis se produce de manera típica un retraso en el crecimiento motivado por varios factores: menor proporción de células clonogénicas, incremento de las pérdidas y necesidad de neovasos para una nutrición y oxigenación integral del nódulo tumoral. Este retraso, observable también en los tumores primitivos, hace adoptar a la curva de crecimiento una forma gompertziana (Figura 2).

1.1.1.7.- Angiogénesis .-

Cuando alcanza un tamaño de medio milímetro, en la colonia metastásica surge la necesidad de una nutrición y oxigenación propia a través de neovasos^{50,66,127}. De lo contrario, la ulterior progresión se ve seriamente comprometida y es probable que las metástasis latentes se mantengan durante años en situación subclínica y sin proliferación efectiva precisamente por esta deficiencia^{57,95}.

La vascularización del nuevo tumor se ve inducida por factores angiogénicos liberados por las propias células metastásicas. Tales factores actuarían por estimulación específica de las células endoteliales mediante división celular y desplazamiento, formando nuevos capilares¹¹⁰. El primero de estos factores en ser descrito y el mejor caracterizado es el Factor de Crecimiento Fibroblástico Básico (β -FGF). Su capacidad angiogénica y su presencia en tumores está bien documentada⁹⁵, así como el hecho de que las regiones con alto contenido en β -FGF mantienen mejor vascularización y oxigenación y son más proliferantes¹³⁸. Otras sustancias con capacidad angiogénica son el Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF)⁹⁵, el Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGF) y un péptido sintético con secuencia de aminoácidos SIKVAV¹⁴³. Se repiten argumentos, puesto que el β -FGF y el PDGF parecen mediar su

acción a través de metabolitos de la 12-lipoxigenasa⁴⁸, en tanto que SIKVAV es un fragmento de la laminina¹⁴³.

Para la angiogénesis tumoral también existe inhibición y en general cualquier elemento que cohiba la formación de neovasos, actuará negativamente en el rendimiento metastásico^{10,52,76,106,107,113,123,136,160,163,169}. Un fragmento del plasminógeno denominado Angiostatina es capaz de bloquear el desarrollo de las metástasis inhibiendo la angiogénesis en las neocolonias. Curiosamente, la fuente de este producto es el propio tumor primario^{113,136}. Otro inhibidor de la angiogénesis es un fragmento de la omnipresente laminina que presenta la secuencia YIGSR¹⁴³.

1.1.2.-Factores que pueden modificar el rendimiento metastásico .-

Sucesos tan intrincados como los que componen la cascada metastásica no pueden por menos que soportar una dependencia multifactorial. Algunos puntos de ese cúmulo de eventualidades son modificables para que el resultado final, las metástasis, se vean alteradas de manera cuantitativa. La irradiación previa del lecho podría encontrarse en este caso, lo que constituye el motivo principal de esta tesis; empero, por su posible paralelismo y por los hallazgos colaterales que del estudio experimental pudieran inferirse, resulta de interés abordar otros factores modificadores ya conocidos.

1.1.2.1.- Factores del lecho .-

1.1.2.1.1.- Anatomoclínicos .-

Por influencia o como crítica de la teoría hemodinámica para el desarrollo de metástasis, se ha intentado correlacionar la riqueza vascular de un órgano o sus características hemodinámicas con el número de colonias metastásicas que acapara. Tanto en los estudios necrópsicos^{44,164} como en los dirigidos a la organoespecificidad^{17,110}, el papel de la vascularización resulta poco significativo. El primer filtro, por ejemplo metástasis hepáticas de territorio vena porta, tendría trascendencia no por su propia sensibilidad a ser colonizado sino más bien porque dejaría pasar menos células hacia segundos o terceros filtros capilares¹⁶⁴.

Si la riqueza vascular no es trascendente para la receptividad metastásica en condiciones normales, sí es cierto que determinados estados morbosos con un sustrato anatomopatológico claro pueden condicionar la cascada metastásica. El caso más conspicuo es la cirrosis: tanto en la de etiología alcohólica como en la posthepatítica existe una misteriosa resistencia a albergar metástasis de cáncer extrahepático⁹⁷.

Otros estados patológicos aparentemente inocentes como la inflamación, pueden también influir en el rendimiento metastásico. En ratones con pulmones inflamados artificialmente el número de metástasis se multiplica por cinco respecto a controles. El motivo aludido es un incremento en la actividad quimiotáctica¹¹⁷.

1.1.2.1.2.- Bioquímicos .-

Los numerosos sistemas enzimáticos utilizados por el tumor para su invasión, se ven contrarrestados por inhibidores presentes frecuentemente en el suero, pero también en el intersticio por donde la célula metastatizante ha de migrar y proliferar (Ver Tabla III). De ellos los más significativos son los inhibidores de metaloproteasas¹⁶².

Además, los órganos expuestos a la metástasis cuentan con mecanismos estrictamente defensivos de carácter más o menos inespecífico: interleuquinas, factor de necrosis tumoral- α ...La estimulación de estos mecanismos es capaz de reducir significativamente el rendimiento metastásico en modelos experimentales^{9,33}.

1.1.2.2.- Factores del huésped .-

Se quiere en este punto enumerar una serie de variables, ajenas a las características de las células metastásicas y que, residiendo en el individuo portador, no pueden considerarse modificaciones del lecho.

El más evidente de estos factores es el estado inmunitario. Su alteración a favor o en contra induce cambios cuantitativos en el rendimiento metastásico^{39,60,100,112,140}; o incluso cualitativos, mostrando las cepas tumorales comportamientos metastásicos inhabituales⁴⁹.

Es posible que otros agentes competentes en la potenciación de las metástasis actúen por inmunosupresión, bien directamente o por mediación hormonal. Tal es el caso de la toracotomía o laparotomía, que aumentan el

número de colonias metastásicas⁵⁵; como podría serlo el de la restricción de movimientos y el “stress” consiguiente, que elevan la adrenalina¹⁵⁴. En este sentido, ciertos anestésicos o fármacos afines poseen capacidad radiosensibilizante¹⁵⁴ o de inhibición de metástasis³⁰. Determinados estados hormonales como el hiper o hipotiroidismo también alteran de manera considerable el rendimiento metastásico⁷⁴. También la irradiación de regiones distintas al propio lecho receptor, ejercerían efecto por mecanismos desconocidos¹.

Por último, dentro de los factores ajenos al lecho y a la propia célula metastásica cabría citar al propio tumor primario. En unos casos su presencia, aunque distante, estimula el crecimiento de metástasis ya establecidas¹². En otras, por mecanismos que recientemente se están dilucidando, lo frena¹¹³.

1.1.2.3.- Factores del tumor .-

En el esfuerzo de culminar con éxito una metástasis, la célula tumoral ha de poner en práctica numerosas habilidades. En la Tabla IV se enumeran características, unas probablemente imprescindibles y otras sólo convenientes, con las que debería contar una cepa tumoral con un marcado carácter metastatizante. Como era de esperar, todo factor que potencie algún paso en los fenómenos bioquímicos de la cascada metastásica conllevará una mejoría en el rendimiento; así, las relaciones con la fibronectina y la laminina se resumen en poseer una baja adhesividad en el intersticio y una alta afinidad por la basal, lo que le confiere libertad de movimientos y capacidad de penetración respectivamente.

Las características genéticas y las fenotípicas se relacionan. Varios oncogenes como *v-src* y *ras* aumentan los niveles de ARN mensajero de un homólogo de la estromelina, una proteinasa. Este y otros datos aportados por la transfección génica apoyan la hipótesis de que tumorigenicidad y metástasis pueden estar bajo controles genéticos separados^{4,73}.

TABLA IV

Características celulares que incrementan su potencial metastásico

<u>Generales</u>	<u>Ref</u>
Formación de émbolos circulantes	112
Adhesividad a células endoteliales.	111
Afinidad por la Laminina	82,111
Capacidad para fijar Laminina a Colágeno IV	62
Receptores de Laminina ubicuos	62
Afinidad por la Fibronectina	111
Poca Fibronectina en superficie	11
Afinidad por el colágeno	7
Biosíntesis de 12(S)-HETE	47
Motilidad elevada	62,7
Resistencia a linfocitos NK	112
Capacidad angiogénica	67,144,170
<u>Enzimáticas</u>	<u>Ref</u>
Colagenasa IV	82,94,149
Colagenasa intersticial	81
Heparanasa	4,81
Activador del Plasminógeno	81
Catepsina B	81
Hialuronidasa	81
Proteinasa Serina-dependiente	4
Pocos inhibidores de metaloproteinasas	162
<u>Citoquinas</u>	<u>Ref</u>
Producción de Factores de Motilidad Autocrina	84
Expresión de VPF	23
Expresión de VEGF	23,145
Expresión de IL 8	141
<u>Genéticas</u>	<u>Ref</u>
Alta expresión Gen <i>mts1</i>	19
Alta expresión Gen Ser/Tre <i>v-mos, v-ras</i>	4
Alta expresión Gen Tir-quinasa <i>v-src, v-fes, v-fms</i>	4
p53 mutante	4
Baja expresión Gen <i>nm-23</i>	
Baja expresión antígenos de histocompatibilidad	49

1.2.- ACCIÓN DE LAS RADIACIONES IONIZANTES SOBRE EL PULMÓN .-

Por su notable trascendencia clínica, la radiosensibilidad pulmonar ha sido objeto de numerosos estudios, bastantes de los cuales serán aludidos más adelante en este apartado. Aunque las alteraciones histopatológicas visibles se encuentran bien definidas^{130,158,96,155}, los mecanismos fisiopatológicos que dan lugar a tales cambios vienen siendo dilucidados sólo parcial y recientemente^{3,40,46,88,132,133,134}.

Existen del orden de 40 tipos celulares diferentes en el pulmón sano⁹⁶. Los macrófagos alveolares, los neumocitos tipo I y II, las células endoteliales de los capilares y los fibroblastos septales parecen estar involucrados en el daño pulmonar por radiación^{61,132}; sin embargo, la célula blanco concreta cuya lesión sería responsable de cada alteración patológica no está identificada^{72,132, 134,156}. Es probable que la causa de este enigma estribe en la inexistencia de tal célula blanco, desencadenándose el daño por una alteración persistente de factores locales que iría produciendo los distintos estados patológicos^{3,88,134}. Esto es, que cada cambio histológico no vendría dado por la radiación directa de un tipo celular, sino que el microentorno bioquímico creado tras la radiación iría produciendo las distintas patologías observables.

La división clínica clásica de las alteraciones pulmonares por radiación, neumonitis –fase precoz– y fibrosis –fase tardía–^{88,91,134}, dio paso en el plano radiobiológico experimental a una separación trifásica –precoz, intermedia y tardía–^{96,155}. Los hallazgos bioquímicos aludidos en el párrafo anterior y el hecho de que las variaciones en el rendimiento metastásico incidan en mayor medida durante los primeros días tras la radiación, aconsejan en este caso añadir una fase aún más precoz que podría denominarse inmediata. En la Tabla V puede verse esta distribución en cuatro fases, así como su cronología y principales rasgos histológicos; con la advertencia de que de alguna manera las fases no son independientes sino que se suceden: el concepto de latencia es función sólo de la incapacidad del investigador para desvelar los cambios bioquímicos que subyacen bajo el curso clínico-patológico¹³².

TABLA V

Fases y cronología en las alteraciones pulmonares por radiación

Fase	Tiempo	Alteración
Inmediata	1 ^h -7 ^o día	Edema alveolar Pérdida de la basal Pérdida macrófagos
Precoz	2 ^o -6 ^o mes	Edema de paredes Fibrina en alveolos Infiltración macrófagos
Intermedia	6 ^o -12 ^o mes	Incremento celularidad septal Células gigantes alveolares
Tardía	8 ^o mes y después	Deposición colágeno

1.2.1.- Fase inmediata .-

Los cambios acaecidos en el pulmón durante las primeras horas o días después de recibir radiación sólo han sido objeto de estudios fructuosos en los últimos años. En esta fase inmediata, discretas alteraciones morfológicas contrastan con marcados cambios bioquímicos que probablemente constituyen la raíz de la ulterior toxicidad.

1.2.1.1.- Cambios bioquímicos .-

Con ánimo de desentrañar la cascada bioquímica que relaciona los primeros días tras la radiación con la fibrosis tardía, el Grupo de Estudio de la Universidad de Rochester ha publicado recientemente varios estudios sobre la liberación de citoquinas inmediatamente después de la irradiación pulmonar^{40,46,132,133,134}. En el plano teórico, estos hallazgos son aplicables también a la susceptibilidad para las metástasis, ya que bastantes de estos factores intervienen en la cascada metastásica abordada en la primera parte de esta introducción.

1.2.1.1.1.- Citoquinas .-

En estudios experimentales, tan sólo un día después de la exposición pulmonar a radiaciones ionizantes, los niveles de ARN mensajero (mRNA) correspondientes al Factor de Transformación de Crecimiento (TGF α y TGF β) se encuentran marcadamente incrementados^{40,132,134}. El origen es su liberación por macrófagos¹³². En investigaciones clínicas, pacientes sometidos a irradiación pulmonar terapéutica, mostraban un aumento de sus niveles plasmáticos de TGF- β ya desde la primera semana de tratamiento³.

Cultivos celulares sometidos a radiación presentan elevación en la transcripción del Factor de Crecimiento Fibroblástico (FGF), el Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGF), el Factor de Necrosis Tumoral (TNF) y el propio TGF⁴⁶. “In vitro”, los niveles de mRNA son infraregulados hasta niveles normales en unas 12 horas y la secreción de factores en el medio de cultivo permanece unas 24-48 horas para regresar más tarde a la normalidad⁴⁶; sin embargo en pulmón el TGF permanece elevado semanas o meses después¹³⁴. Este paradigma puede encuadrar el estado bioquímico anormal que desencadena la posterior toxicidad, pero también aportar una justificación para la variabilidad metastásica tras la irradiación.

Citoquinas mediadoras de la inflamación como la interleuquina-1 α (IL-1 α) aumentan también desde el primer día alcanzando un máximo hacia el día ocho. Otras interleuquinas sin embargo apenas muestran variación¹³⁴.

1.2.1.1.2.- Otras sustancias .-

Desde el punto de vista de la ulterior metastatización, resulta interesante observar los cambios de marcadores de la matriz extracelular. La medida de mRNA para Fibronectina y colágenos I, III y IV aumenta muy precozmente tras la irradiación^{40,133}. Es lógico tal incremento en la fase tardía, con la aparición de fibrosis, lo significativo es su distribución bimodal, con una oleada entre la primera y octava semana y otra a partir de los seis meses¹³⁴.

La elevación en las primeras horas tras la irradiación del contenido de surfactante alveolar parece desencadenada por la rápida pérdida de los cuerpos laminares de los neumocitos tipo II. Sin embargo, el continuo incremento en las siguientes semanas vendría dado más bien por alteración en el recambio, consecuencia de la pérdida de macrófagos y una posible respuesta activa a la lesión de los neumocitos²⁶.

1.2.1.2.- Cambios morfológicos .-

Alteraciones muy precoces pueden evidenciarse ya a las pocas horas de la exposición del pulmón a radiaciones. En este plazo puede detectarse congestión y edema alveolar y la exudación de material proteináceo a los alvéolos compromete el intercambio gaseoso⁹⁶. También en el terreno vascular por microscopía electrónica se aprecia una pérdida de proteoglicanos de la basal, único cambio observable a dosis inferiores a los 9 Gy¹¹⁹.

Esta etapa inmediata puede darse por concluida desde el punto de vista morfológico a los siete días, momento en el que desaparecen los macrófagos alveolares⁹⁶.

El predominio de la afectación vascular en esta fase queda patente en estudios funcionales con radionúclidos, los cuales muestran que la hipoperfusión predomina sobre la hipoventilación. En la práctica esto se traduce en un efecto “shunt”, sin traducción clínica por otra parte, aun en grandes volúmenes⁹⁶.

1.2.2.- Fase precoz .-

A diferencia de la anterior, la fase de neumonitis muestra cambios histológicos muy característicos e intensos y, si el volumen implicado es lo bastante amplio, una correlación clínica que puede acarrear letalidad.

Los dos rasgos predominantes son el incremento en el grosor del intersticio y la presencia de numerosos mastocitos y macrófagos, los primeros en las paredes y los segundos en el espacio aéreo^{91,155,158}. Morfométricamente existe una reducción del 50-70% de neumocitos I, II y de células endoteliales; el total de sangre intracapilar disminuye un 75%. Aunque los fibroblastos suponen el mayor subgrupo del intersticio, la densidad numérica de células de la inflamación e inmunidad está muy aumentada, hasta 150 veces en el caso de los mastocitos¹⁵⁸.

Su aparición está cronológicamente bien definida: comienza hacia la duodécima semana, es máxima entre la decimosexta y la vigesimosegunda y desaparece hacia la trigésima. Por tal motivo, existe un solapamiento de los cambios en regresión de la fase aguda y los iniciales de la intermedia¹⁵⁵.

En cuanto a la dosis, puede marcarse un estricto umbral que para irradiación no fraccionada se sitúa en los 11 Gy. Cuando ambos pulmones están involucrados en todo su volumen, una dosis de 15 Gy. supone un 100% de mortalidad a las 22 semanas¹⁵⁵. El incremento de la dosis supone disminución del período de sobrevida y volúmenes parciales, una mejoría. Es llamativo que a igualdad de volumen, la respuesta es siempre mayor en la base pulmonar que en el vértice⁸⁰.

Por los datos obtenidos en los estudios clínicos, resulta congruente la equiparación de respuesta entre humanos y animales de experimentación en cuanto a histopatología, cronología, dosis umbral y factor volumen^{89,90}.

1.2.3.- Fase intermedia .-

Se trata éste de un periodo notablemente asintomático, tanto en la clínica^{61,88,90} como en experimentación animal por medidas de frecuencia respiratoria^{54,80,86,130}.

Anatomopatológicamente en cambio, sobrevienen rasgos muy característicos como las células de gran talla y citoplasma espumoso en los espacios aéreos¹¹⁵. También se describe incremento en la celularidad septal a base de fibroblastos, células plasmáticas y otros elementos inflamatorios; estos últimos, cambios menos específicos y más de transición entre una fase inflamatoria, la precoz, y otra de organización, la tardía⁹⁶.

Se trata de alteraciones autolimitadas, lo que orienta a un substrato patogenético con α/β alto^{54,108,157}. Los primeros cambios pueden observarse a partir de la vigesimocuarta semana, son máximos hacia la trigésimosexta y han prácticamente desaparecido en la quincuagésima¹⁵⁵. Así pues, en sus primeras y últimas semanas esta fase se superpone con la precoz y la tardía respectivamente, aunque sus picos están perfectamente separados.

El umbral para la aparición en dosis única es idéntico al de la neumonitis: 11 Gy. Asumida su escasa relevancia clínica, no puede esperarse mortalidad en esta fase independientemente de la dosis; algunos ratones que sobreviven a la fase precoz con dosis de 14 Gy. en ambos pulmones, fallecen en una segunda ola de “distress” respiratorio hacia la trigésimosexta semana, pero tales muertes son atribuibles a la siguiente fase por el aspecto necrótico¹⁵⁵.

1.2.4.- Fase tardía .-

Como toxicidad tardía, irreversible y progresiva, la fibrosis ha sido objeto de amplia investigación clínica y básica. No en balde suele ser el principal objeto de preocupación para el radioterapeuta en pacientes que reciben irradiación pulmonar.

El aspecto histopatológico es elemental: la fibrosis engrosa los septos alveolares obliterando los alveolos^{96,155}. El estudio morfométrico muestra un 77% de ocupación por parte del intersticio, frente a sólo un 6% en los controles. Las células plasmáticas y los mastocitos están aumentadas en términos relativos entre 200 y 500 veces¹⁵⁸. Es factible encontrar fenómenos de neumonía granulomatosa, predominantemente cerca de vías aéreas¹³⁰.

El fenómeno se desarrolla de manera insidiosa desde el octavo mes y se estabiliza al cabo de uno o dos años. La dosis umbral para el establecimiento de fibrosis irreversible es, en dosis única, de 13 Gy., ligeramente superior a la neumonitis.

Partiendo de la dudosa asunción de una célula blanco única como responsable de esta toxicidad, se han realizado diversos experimentos para la determinación de su α/β , obteniendo valores entre 2 y 7 Gy^{54,108,130,157}. Si por el contrario se trata de un fenómeno multifactorial, en el cual el factor determinante es la interacción de un microentorno bioquímico con varios elementos celulares^{3,40,46,88,132,133,134}, su predicción por métodos radiobiológicos clásicos es poco valorable.

1.3.- ACCIÓN DE LAS RADIACIONES SOBRE LA MICROVASCULARIZACIÓN .-

La pared de los pequeños vasos es el escenario donde se van a desarrollar los primeros pasos de una metástasis en su nuevo lecho. Es probable que las modificaciones del rendimiento metastásico en ese lecho vengan dadas por la radiolesión esta estructura¹⁰⁹, que por otra parte reacciona a la radiación de diferentes maneras en los distintos órganos³⁴. Parece pues adecuado abordar la radiobiología de la microvascularización de manera separada a otras estructuras pulmonares; prestando especial atención a los vasos del propio pulmón.

1.3.1.- Parámetros radiobiológicos .-

Existen numerosos ensayos clonogénicos dirigidos a cuantificar la radiosensibilidad de las células endoteliales procedentes de diversos órganos de mamíferos^{34,93}. De éstos se obtienen globalmente las siguientes cifras:

$$\begin{aligned}D_0 &= 1,01 - 1,57 \text{ Gy} \\n &= 1,21 - 7 \\Dq &\cong 3 \text{ Gy}\end{aligned}$$

En todos los casos la radiosensibilidad medida por D_0 fue mayor para las células endoteliales que para los miocitos y células de la adventicia de los mismos vasos, cultivadas en condiciones semejantes³⁴.

1.3.2.- Cronología .-

En sistemas vasculares simples como el plexo coroideo, la pérdida de células endoteliales tras la radiación es bastante precoz. El marco radiobiológico vendría dado por la destrucción temprana de una pequeña fracción de células endoteliales de ciclo celular corto y con α/β alto, a diferencia del resto de componente endotelial⁵⁹. La pérdida de células musculares y otros elementos del vaso presenta una latencia mayor.

La merma del árbol vascular en conjunto se inicia, para los pequeños y medianos vasos, unos días después de la irradiación, pero de manera lenta y progresiva. A los tres meses ha caído el 50% y no se completa hasta el séptimo mes. Para los vasos de mayor calibre, más de 16 μm , la latencia es bastante mayor; al tercer mes apenas han disminuido, lo hacen a partir de entonces y hasta los nueve meses⁵⁹.

1.3.3.- *Alteraciones morfológicas .-*

El capilar es la estructura que en plazo más precoz manifiesta morfológicamente el daño radioinducido. Los primeros días o semanas tras la radiación el endotelio muestra cambios evidentes: retracción^{109,116}, pleomorfismo, vacuolización⁹⁶. Las células vacuoladas tienden a desprenderse, produciendo áreas de denudación de la basal y oclusión de la luz capilar por detritus y microtrombos⁹⁶. Otras células muestran incremento en la densidad del citoplasma, disminución de tamaño y finalmente picnosis, desprendiéndose también³⁴. La intensidad de estos fenómenos es dependiente de la dosis⁹⁶.

Asociado a la pérdida celular endotelial pueden encontrarse cambios reactivos y regenerativos: engrosamiento y elongación de núcleos celulares, figuras de mitosis y presencia de pares o grupos de núcleos en puntos determinados de un vaso, desprovisto por lo demás de elementos endoteliales. En ocasiones estos grupos parecen ocluir totalmente la luz del vaso⁵⁹. Además, puede existir cierta neovascularización aun en ausencia de proliferación endotelial efectiva⁴⁵.

En el pulmón, algunos vasos obliterados en las primeras semanas pueden a la larga recanalizarse aunque sea de manera imperfecta, a diferencia de otras localizaciones como miocardio o riñón en las que el daño capilar es irreversible³⁴.

1.3.4.- *Alteraciones funcionales .-*

Es bien conocido el incremento en la permeabilidad vascular tras la irradiación, tanto en estudios con radiotrazadores como en tinciones vitales u observaciones ultraestructurales^{32,34,132,158}. En el pulmón de la rata este incremento es bifásico: un moderado incremento el primer día y una segunda y más intensa ola sobre el decimonoveno³². Más adelante,

coincidiendo con alteraciones volumétricas pulmonares y gasométricas arteriales, es demostrable un desbalance ventilación/perfusión. Los estudios isotópicos reflejan hipoperfusión más que hipoventilación, atribuible al daño microvascular⁹⁶.

Las funciones bioquímicas del lecho endotelial también se ven comprometidas. La actividad del enzima angiotensina convertasa (ACE) y la del activador del plasminógeno disminuyen linealmente de manera proporcional a la dosis^{34,161}. Por el contrario, la producción de tromboxano (TXA₂) y prostaciclina (PGI₂) se ve incrementada, también de manera dosis dependiente¹⁶¹.

Muy relacionado con la posible receptividad metastásica es la liberación de enzimas degradativos de la matriz, como la heparanasa, por parte de cultivos de células endoteliales sometidos a radiación¹⁰⁹. Además, es probable que estas células se vean por la radiación inducidas a liberar factores de crecimiento, con actividad semejante a FGF o PDGF¹⁶², ya citados en el Apartado (1.1.1.7).

1.4.- EFECTO LECHO TUMORAL (“T.B.E.”) .-

Uno de los ejemplos que mejor documenta la complejidad de las relaciones entre un tumor y el lecho donde asienta, son las modificaciones comportamentales de una neoplasia desarrollándose en un territorio irradiado. El término “Tumor Bed Effect” (TBE) se ha utilizado tanto para describir sólo el retraso de crecimiento^{7,15,98}, como desde un punto de vista más amplio el conjunto de cambios observables en esas circunstancias^{13,101}.

Aunque se ha intentado reproducir con otros agentes como drogas o hipertermia, los resultados han sido negativos y por consiguiente este *efecto lecho* puede considerarse sinónimo de *efecto lecho irradiado*^{15,71}.

La experimentación sobre TBE se ha llevado a cabo a través de inoculaciones directas de tumor en territorios irradiados o, en estudios clínicos, por observación de recidivas locales. Así pues, se desconoce si el comportamiento es idéntico en colonias originadas vía metástasis.

1.4.1.- Comportamiento de un tumor en lecho irradiado .-

La evolución de un tumor obligado a crecer en un territorio modificado por radiación, muestra cuatro diferencias cuantitativas respecto a los controles:

- a/ Precisa menos carga tumoral para su inoculación^{13,101}.
- b/ Crece más lentamente^{13,15,20,79,101}.
- c/ Produce más metástasis^{5,6,99,101}.
- d/ Responde peor al tratamiento radiológico o citostático^{98,102,103}.

El efecto más estudiado, el retraso en el crecimiento, así como la respuesta a las terapias, pueden en buena parte justificarse por la pobre perfusión y oxigenación que un lecho radiolesionado proporciona^{69,92}. El flujo sanguíneo viene a representar la mitad que el de un tumor sobre lecho sano⁷⁰, la necrosis es más frecuente y el pH y la presión parcial de oxígeno significativamente menores¹¹⁵.

El que un tumor en condiciones de TBE dé más metástasis es discutible. Si se compara con primarios control a igualdad de tamaño aparecen efectivamente aumentadas, pero el tiempo de exposición habrá sido mayor con TBE, ya que el crecimiento es más lento^{99,101}. Además, si el tumor ha recibido radiación junto con el lecho, su fenotipo puede haberse visto modificado⁶.

El objeto de esta tesis y la facilidad por TBE para aceptar tumor inoculado (“tumor take”) presentan un paralelismo evidente. El parámetro utilizado para medir este aspecto es la TD_{50} (número de células tumorales necesarias para conseguir trasplante tumoral viable en el 50% de los animales inoculados). Las observaciones muestran que, aunque retrasada en el tiempo la aparición del tumor, los valores finales de TD_{50} son siempre menores en lecho irradiado^{2,13,101}. La interpretación más intuitiva de este hecho es que la irradiación previa predispone de alguna manera al lecho para aceptar y mantener a las células tumorales en su fase más inicial, aunque a la larga el crecimiento de la colonia que éstas originen se verá retrasado.

1.4.2.- Elementos modificadores .-

Como fenómeno biológicamente activo, la presencia o intensidad del TBE pueden verse matizadas por varios factores:

Dosis

Las curvas dosis-respuesta para TBE presentan una forma sigmoidea (Fig. 3)²⁰. El efecto se manifiesta tímidamente cuando el lecho ha recibido dosis de 5-10 Gy. A partir de ahí aumenta de manera abrupta hasta una dosis de 20-30 Gy., en donde se establece un “plateau” que se mantiene hasta dosis

de al menos 60 Gy^{20,103}. La forma de la curva puede variar dependiendo de otros factores abordados más adelante, pero sobretodo del parámetro utilizado para su cuantificación¹⁵: tasa de crecimiento del tumor, tiempo invertido en alcanzar un tamaño letal...

Tiempo

De los estudios experimentales puede extraerse que las alteraciones biológicas responsables del TBE son sólo temporales. Si el lapso irradiación-inoculación excede los 200 días, los parámetros receptividad (“a” en el apartado 1.4.1) y producción de metástasis (“c”) son indistintos al grupo control; en tanto que el retraso en el crecimiento (“b”) se mantiene modestamente¹⁰¹. La alteración suele ser mayor para todos los parámetros cuanto menor es el citado plazo¹⁰¹.

Estirpe Tumoral

Si el efecto lecho se debiera exclusivamente al daño vascular con su correspondiente hipoperfusión, el retraso de crecimiento debería ser independiente del tipo tumoral. Partiendo de esta hipótesis se ha cuantificado este parámetro con dos estirpes tumorales distintas, carcinomas mamarios y fibrosarcomas. El resultado fue que los tumores de tipo carcinomatoso exhiben un TBE mucho más marcado, en tanto que algunos sarcomas muestran sólo mínima expresión^{98,103}. La interpretación a este hecho ha de buscarse en las particularidades biológicas de cada tumor, bien por resistencia intrínseca a la hipoxia u otras condiciones ambientales adversas, bien por su capacidad angiogénica¹⁰³. No existen estudios comparativos con el melanoma.

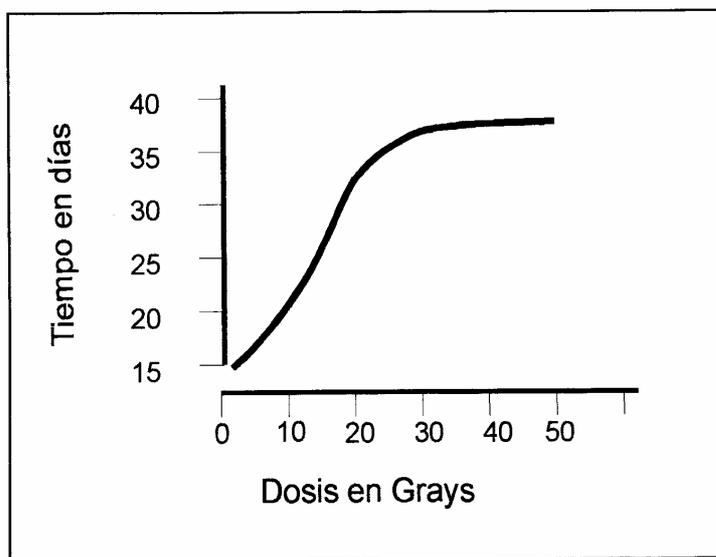


Fig. 3.- Tiempo invertido por un tumor mamario murino en alcanzar 500 mm³ según dosis administrada en lecho.

1.5.- METÁSTASIS EN TERRITORIO IRRADIADO .-

Dos eventos tan habituales en la enfermedad cancerosa como la administración de radioterapia y la aparición de metástasis, no han podido por menos que crear curiosidad en los investigadores en cuanto al posible efecto incitativo de la primera. Fruto de ello ha sido la aparición de algunos trabajos clínicos y experimentales, con resultados poco concluyentes, cuando no abiertamente controvertidos.

1.5.1.- Estudios clínicos .-

El análisis de la intensidad y localización de las metástasis en pacientes que han seguido con anterioridad un curso de radioterapia, es el único modo ético de abordar la cuestión clínicamente. Su trascendencia en el plano oncológico clínico es escasa: cuando el campo irradiado es objeto de menos metástasis cabe atribuirlo a radioesterilización de células tumorales preexistentes y no a modificación en la receptividad del lecho; una metastatización aumentada es un fenómeno poco ilustrado y está sujeto a otras consideraciones.

1.5.1.1.- Metastatización aumentada .-

La publicación más aludida en cuanto a metástasis en el propio lecho sometido a irradiación es la de Dao y Kovaric²⁷. Éstos encontraban mayor incidencia de metástasis cutáneas y pulmonares ipsilaterales en pacientes que habían recibido radioterapia torácica tras mastectomía, respecto a las tratadas sólo con cirugía. Este estudio ha sido muy criticado por otros autores, porque la muestra aparecía sesgada a favor del grupo quirúrgico y por las inaceptables complicaciones secundarias a la radioterapia, que no dudan en calificar de horrendas¹²².

Por otra parte, series semejantes publicadas con posterioridad no muestran tal predisposición²²; si acaso una mayor incidencia de derrame pleural en el lado afecto, pero sin diferencias entre el grupo de mastectomía exclusiva y el irradiado postoperatoriamente¹²².

1.5.1.2.- Metastatización disminuida .-

La radioterapia clínica está plagada de ejemplos en los que un órgano clínicamente indemne es sometido a radiación precisamente con la intención de disminuir el riesgo de aparición de metástasis^{78,104}. La justificación de esta práctica y su interpretación en cuanto a eficacia estriba en la eliminación de focos neoplásicos indetectables.

Circunscribiéndose a casos en los que el órgano expuesto no ha sido irradiado de forma deliberada, existen también ejemplos de reducción en la posterior detección de metástasis. Tal sucede con las partes óseas implicadas en el tratamiento radiológico de un primario de mama o próstata, que en su evolución son típicamente objeto de menos metástasis^{51,65,129}.

Situaciones clínicas en las que el pulmón es globalmente irradiado, como en ciertas neoplasias infantiles, no evidencian incremento metastásico¹⁸; tampoco se encontraron diferencias en la dudosamente escrupulosa experiencia de someter a los niños a tratamiento en un solo pulmón de manera profiláctica⁸⁷.

1.5.2.- Estudios experimentales .-

Los casos clínicos aludidos parten, en el momento de recibir la radioterapia, de una eliminación previa del primario por un arma oncológica radical. Este acercamiento, lógico desde el punto de vista terapéutico, no es el ideal para poner a prueba la hipótesis que aquí se maneja. En los estudios experimentales se intenta que el advenimiento de las células candidatas a formar colonia metastásica tenga lugar con posterioridad al momento de la radiación. Estas células neoplásicas pueden provenir a su vez de un primario provocado o de inoculación intravascular directa.

1.5.2.1.- Metastatización pulmonar .-

Las metástasis pulmonares han sido el modelo más frecuentemente utilizado para el estudio experimental de la diseminación metastásica. Ser el órgano más colonizado por gran número de neoplasias, primer filtro capilar en la circulación venosa general y presentar una cómoda accesibilidad necrópsica lo hacen buen candidato.

1.5.2.1.1.- Con irradiación corporal total .-

Parece lógico suponer que una irradiación corporal total previa, siquiera sea por su efecto inmunosupresor, debe aumentar el número de metástasis pulmonares inducidas con posterioridad, espontáneas o inoculadas por vía intravenosa. Los resultados a este respecto son divergentes en los distintos trabajos. En unos casos se produce efectivamente un incremento positivo^{12,39,100,167,171}; en otros no existe variación^{28,56,165}; en otros incluso, la irradiación previa a dosis bajas inmediatamente antes de la inoculación tendría un misterioso efecto protector^{12,60}.

1.5.2.1.2.- Con irradiación pulmonar total .-

Gran parte de los experimentos en cuanto a metástasis en territorio irradiado se han realizado con exposición de ambos pulmones y comparación frente a grupos control sin radiación. Ello introduce factores de incertidumbre, como la posible inmunosupresión, presente sólo en el grupo expuesto. La significación estadística es también difícil de alcanzar si la diferencia es pequeña y el rango de número de metástasis puede oscilar^{126,128} entre 3 y 280. La Tabla VI resume los artículos encontrados en búsqueda bibliográfica exhaustiva; aunque bastantes de ellos se realizaron con otro fin específico, sus resultados se ilustran sin embargo con algún hallazgo a este respecto. De su análisis en conjunto se pueden extraer resultados sorprendentes. Mientras que en algunas series la irradiación previa centuplica el rendimiento metastásico, en otras el aumento es mucho menos marcado o nulo.

La cuestión del momento posterior a la radiación que más intensamente abre paso a las metástasis ofrece también discrepancias. En unos casos el efecto facilitador se produce muy recortado en el tiempo, dos días máximo; en otros la mayor potenciación tiene lugar tres meses después. En unos casos hay un marcadísimo aumento justo al décimo día; en otros en el día diez lo que hay es disminución.

1.5.2.1.3.- Con irradiación de un pulmón .-

Existen tres citas en la literatura en cuanto a radiación de un solo pulmón, sin que los resultados sean tampoco concluyentes. En el trabajo de Dao y Yogo²⁸ parece encontrarse una mayor propensión a las metástasis en el pulmón radiotratado, pero al utilizar un modelo metastásico poco efectivo (entre cero y cuatro metástasis por animal) el parámetro analizado hubo de ser número de ratas con metástasis homo, contra o bilaterales. Además, el

TABLA VI

Metástasis tras irradiación pulmonar total

Ref.	Tumor	Dosis	Período	Diferencia	Observaciones
41	Walker Iv	2000 R	1-7 d.	(+)	
16	Sarcoma KHT Iv	N.S.	N.S.	(+)	
12	W-256 e Y-P388 Iv	10-15 Gy	7-14 d.	x 100	Máx. d. 10
165	Fibrosarcoma Iv	10-30 Gy	1 h.-30 d.	x 10 x 0,2	Máx. d. 1-2 En d. 10
14	Walker-256 Iv	5 x 3,5 Gy 12,5 Gy	0-38 d. 0-42 d.	x 200 x 100	Máx. d. 1 Máx. d. 21
121	Fibrosarcoma Iv	10 Gy	1 d.	x 2-4	
122	Fibrosarcoma Iv	10 Gy	6 h.-28 d.	x 5	Máx. d. 1-2
29	Fibrosarcoma Iv Ca. mama en muslo	10-12 Gy 12 Gy	0-150 d. 13-143 d.	(+) x 0,5	Máx. d. 120 Metást. espontán.
167	Ca. mama Iv	5-10 Gy	1-14 d.	x 1	

-Período: Tiempo entre radiación e inoculación.

-Diferencia: Factor de incremento del nº de metástasis animales radiados/no radiados. P. ej. "x1" ⇒ no diferencia.

-(+): "existen más metástasis", sin mayor especificación.

-N.S.: No especificado.

pulmón expuesto fue siempre el derecho, de mayor volumen y por tanto más dado a acoger metástasis “per se”. En una Carta al Editor¹²⁰, Peters alude a sus resultados con las metástasis espontáneas de un condrosarcoma injertado en flanco; reseña más metástasis en el pulmón previamente irradiado sin exponer cifras ni método estadístico. Finalmente, Thompson¹⁵¹ realiza ocho series por inyección intravenosa en fresco, encontrando diferencias significativas hacia una mayor eficiencia en la formación de colonias en pulmones irradiados, en alguna de las series y con determinada dosificación (20 Gy) y temporización (48 h. y 3¹/₂ meses). Otras series, dosis o períodos no son significativas o no aparecen reseñadas.

1.5.2.2.- Otros órganos .-

La irradiación hepática u otro tipo de traumas previos a la inoculación intraportal de células tumorales, parece incrementar la eficiencia metastásica de éstas sobre el hígado^{41,75}; incluso es así en el caso de pares parabióticos con inyección en la vena porta del miembro no traumatizado⁴².

Ratones inoculados con sarcoma en una pata previamente irradiada, presentaban mayor incidencia de ganglios poplíteos con metástasis linfáticas¹²⁸. Aunque esta cadena ganglionar, la más cercana al lecho irradiado, era la que más diferencia acusaba, es probable que se debiera a un Efecto Lecho (Ver Apartado 1.4.1.) ya que el grupo de ratones irradiados presentaba también más metástasis pulmonares.

II.- MATERIAL Y MÉTODOS .-

Centrado el objetivo en determinar si los cambios tisulares inducidos por las radiaciones ionizantes modifican el comportamiento las metástasis en dicho tejido, se precisa un modelo experimental que conjugue facilidad de manejo y reproductibilidad con una adecuada posibilidad de tratamiento estadístico.

El melanoma murino B16 es probablemente el tumor más utilizado a nivel mundial para estudios de metastatización^{7,31,35,49,62,110,112,118,140,143}. Singularmente su variedad F10 presenta una exquisita especificidad para las metástasis pulmonares, con las ventajas de poder ser inoculado por vía intravenosa y, dado su color negro, facilitar el recuento de colonias. La sensibilidad puede obtenerse procediendo a la irradiación de un solo pulmón en cada animal de experimentación, actuando el otro como control.

2.1.- MÉTODO GENERAL .-

El diseño global del experimento consistió en someter a una población homogénea de ratones a irradiación de un sólo pulmón, derecho o izquierdo. A continuación, transcurridos distintos plazos según el grupo, se inocularon células tumorales con capacidad metastásica por vía intravenosa. Tras un período fijo, necesario para que las metástasis se hagan patentes, se procedió al sacrificio y necropsia del animal, cuantificando las colonias en cada pulmón, así como cualquier otro dato biológico que se considerara de interés.

2.1.1.- Distribución en grupos .-

Ya que el sistema de radiación permite su administración a cuatro ratones a un tiempo (Ver apartado 2.3.1.), los animales se asignaron de cuatro en cuatro. Puesto que se precisa en cada caso una ejemplificación para pulmón derecho e izquierdo, un mínimo de ocho ratones recibieron una determinada dosis de radiación y mismo intervalo radiación-inoculación, constituyendo con ello un Grupo; bien entendido que al no ser todos los sujetos valorables y para aumentar el tamaño de la muestra, bastantes grupos hubieron de repetirse, siempre en conjuntos de ocho individuos.

2.1.1.1.- Grupos de dosis .-

Se eligieron dos dosis en fracción única: 5 Gy y 15 Gy. El primero representa una “dosis baja” y el segundo una “dosis estándar” que en otros estudios supuso la máxima capacidad modificadora (Ver apartado 1.5.2.1.). Los datos bibliográficos indican que estas dosis son bien toleradas^{86,153}.

Inicialmente se proyectó un tercer grupo de dosis de 30 Gy. en fracción única. Al menos en ratas, esta alta dosis había sido administrada en un hemitórax por algún investigador sin complicaciones¹⁵⁸. En los ensayos preliminares del presente estudio, se constató sin embargo que ningún animal sobrevivía más allá de las cuatro semanas, siendo evidente en el estudio necrópsico que la muerte se originaba por efectos secundarios de la irradiación, lo que obligó a abandonar esta rama. Otro tanto vino a ocurrir si los irradiados con 15 Gy se dejaban evolucionar cerca de dos meses, en especial si el expuesto era el pulmón derecho.

2.1.1.2.- Grupos de intervalo radiación-inoculación .-

Evidencias directas e indirectas hacen pensar que las condiciones inducidas por radiación en el lecho que pudieren modificar el rendimiento metastásico, son de naturaleza transitoria^{14,46,48,101,109,122,134,162,165}. También puede inferirse que su prevalencia oscilaría entre algunas horas y unas pocas semanas; sin embargo, sea por diferencias de interpretación, sea porque su cronología varía según el modelo experimental, los resultados son dispares (Ver Tabla VI). Resulta pues de interés multiplicar el número de Grupos para adjudicarlos a distintos intervalos irradiación-inoculación. Éstos fueron:

· 48 horas.

- 7 días.
- 21 días.
- 42 días.

La distribución parece suficiente para detectar los cambios en el rendimiento metastásico a corto y medio plazo e incluye los picos máximos publicados por la mayoría de autores bajo otras condiciones experimentales^{14,122,151,165}. Como se adelantó en el Apartado anterior, el intervalo de seis semanas no pudo ejecutarse con dosis de 15 Gy porque poco antes del momento del sacrificio, los animales mueren por insuficiencia respiratoria. El motivo evidente es la entrada en fase de neumonitis aguda (42 días de intervalo + 21 días para patentizar las metastásasis = 63 días, fase de neumonitis).

2.1.1.3.- *Nomenclatura* .-

Para su identificación, anotación y registro, los grupos fueron denominados con dos cifras:

- la primera por la dosis de radiación recibida en el pulmón expuesto

0 (para grupos control)
 ó
 5 (para 5 Gy)
 ó
 15 (para 15 Gy)

- la segunda por el intervalo radiación-inoculación

.2 (para 48 horas de intervalo)
 .1 (para 7 días de intervalo)
 .3 (para 21 días de intervalo)
 .6 (para 42 días de intervalo).

Aunque los animales fueron individualmente identificados con una escotadura quirúrgica en la oreja del lado correspondiente al pulmón que iba a ser expuesto a radiación, se tomó la precaución adicional de separar

cada Grupo de ocho animales en dos jaulas con la anotación: “.D” o “.I” según la irradiación se hubiera administrado al pulmón derecho o izquierdo respectivamente. Por otra parte las “Líneas Directrices Relativas al Alojamiento y a los Cuidados de los Animales del Consejo de las Comunidades Europeas” recomienda²⁴ seis ó menos animales para el tipo de jaula utilizado (Ver apartado 2.2.2.2.).

Por último, la repetición de Grupos con idéntica dosis e intervalo se identificó con un número entre paréntesis: (1) (2) ...etc.

V.g.: “Grupo 5.3.D(2)” serían los cuatro animales que recibieron radiación en el pulmón derecho, del segundo grupo de ocho, cuya dosis fue de 5 Gy y la inoculación tuvo lugar tres semanas después de la irradiación.

Cada procedimiento de irradiación, inoculación y necropsia, con su fecha y monograma de Grupo queda anotado:

-- En la etiqueta de la jaula.

-- En el cuadro-registro general del experimento (Hoja de Microsoft Excel).

-- En el cuadro-calendario de pared.

-- En el Libro de Laboratorio.

2.1.1.4.- Grupos control .-

A los grupos irradiados hay que añadir los control, sin radiación pero inoculados. De ellos se extraerán datos como la proporción de metástasis pulmón derecho/pulmón izquierdo, la diseminación a órganos extratorácicos u otros parámetros cuyo comportamiento en condiciones normales se precise conocer.

No se llevó a cabo irradiación simulada, pero se tuvo en cuenta la edad, de modo que el Grupo 0.6 fue inyectado cuando contaba con 15 semanas; la misma edad que tenía el Grupo 5.6. en el momento de la inoculación. El Grupo 0.3 a las 12 semanas, etc.

2.1.2.- Modelo metastásico .-

2.1.2.1.- Melanoma B16 .-

Línea celular maligna para estudios “in vivo” e “in vitro”, aislada a partir de la aparición espontánea de un melanoma en la base de la oreja de un ratón, cepa C57BL/6, aislada por el Jackson Laboratory^{110,118}. Transplantable dentro de la cepa singénica por inyección subcutánea, es fácil de mantener en cultivo¹¹² y presenta en su línea original una discreta capacidad metastásica^{62,77,159}.

De la línea parental original se han ido separando una serie de variantes, cada una de las cuales destaca por un comportamiento característico: B16-BL6 (altamente metastásico); B16-F1 (pobrementemente metastásico); B16_a (amelanótico, metástasis espontáneas); B16-F10 (especificidad y rendimiento en metástasis pulmonares); B16-010 (metástasis ováricas) ó B16-PA4M (metástasis ganglionares)^{62,77,118,140}.

2.1.2.1.1.- Melanoma B16-F10 .-

A principios de los años setenta, Fidler llevó a cabo un experimento en el que se sirvió de las células del melanoma B16 para seleccionar subpoblaciones con gran capacidad de metastatización pulmonar^{31,35,36,73,110,112}. Comenzó por aislar y cultivar células tumorales procedentes de metástasis pulmonares de melanoma B16. Esta línea, denominada F1, la inyectó vía intravenosa en otro grupo de ratones, de cuyos pulmones aisló y cultivó la línea F2, dos veces seleccionada, y así sucesivamente. A los diez ciclos, estableció una línea melanómica variante, la B16-F10, que formaba un número significativamente mayor de colonias pulmonares que la línea parental B16 ó que la primera variante seleccionada, la B16-F1.

Este citadísimo artículo³⁵, además de sentar las bases para la organoespecificidad de las metástasis, proporcionó la variante F-10 del melanoma B16, muy utilizada desde entonces para estudios de metastatización en general y de metástasis pulmonares en particular.

2.2.- ANIMALES .-

2.2.1.- Ratones Cepa C57BL/6 .-

Cepa de ratones desarrollada por Little en 1.921. Fue introducida en el Jackson Laboratory en 1.948 (generación F-22) y posteriormente en la empresa IFFA CREDO en 1.981 (generación F-140), de donde fueron obtenidos para este experimento.

Características

Pelaje y ojos negros. Cola despigmentada en el 78% de las hembras y 82 % de los machos. Extremidades finas. Talla bastante pequeña. Vigoroso. Es peculiar su gran actividad motriz. Manifiesta fuerte resistencia a los tumores pulmonares primitivos. Es cepa de referencia para comparaciones en diferentes campos de investigación: cultivos celulares, polución atmosférica, hematología, quimioterapia del cáncer, radiación, mutaciones. Muy utilizado como animal resistente a radiaciones ionizantes^{53,63,118}.

Es buen modelo en oncología tanto por tumores inducidos (tumores subcutáneos por 3-metil-colantreno, linfomas por administración oral de colantreno) como transplantables (melanoma B16, adenocarcinoma mamario BW 10232, leucemia mieloide C1498, carcinoma de glándulas prepuciales ESR586)^{53,63}.

2.2.2.- Características de los incluidos a estudio .-

Para su inclusión se utilizaron ratones C57BL/6 todos ellos machos, a fin de evitar que las variaciones hormonales pudieran interferir los resultados^{11,140,30}. Para el mantenimiento de la línea celular “in vivo” subcutánea, se usaron hembras sin limitación de edad.

2.2.2.1.- Características físicas .-

2.2.2.1.1.- Edad .-

Siempre entre las ocho y las diez semanas. Es la recomendada para este modelo de metastatización^{30,140}. El animal ha completado su desarrollo y está cerca de su máximo peso, que alcanza en la undécima semana⁶³. El intervalo es un compromiso entre la homogeneidad de la población y las disponibilidades de las hembras reproductoras.

Como se indicó anteriormente, los individuos de los grupos control entraron a estudio más adelante; con la edad que les correspondería tener

en el momento de la inoculación, si hubieran recibido radiación entre la octava y décima semana de vida.

2.2.2.1.2.- *Peso .-*

Se realizó control ponderal de los animales con báscula de precisión Mettler PM2000 (GERMÁN WEBER, S.A.), siempre inmediatamente antes de la inducción anestésica. Los valores obtenidos en el momento de su inclusión al estudio pueden verse en la Tabla VII.

2.2.2.2.- *Mantenimiento y cuidados.-*

Durante el período experimental los animales se mantuvieron en jaulas tipo 500 de Macrolón con rejas apilables de acero inoxidable (22x22x14,5 cm). Superficie basal 500 cm². Lecho de serrín tratado al efecto.

Dieta y agua “ad libitum”. Suplementos vitamínicos habituales. Habitación cerrada e iluminación artificial con una periodicidad de 12 horas luz /oscuridad.

Separados en conjuntos de cuatro individuos en principio, que conforman un subgrupo “.D” o “.I”. En el caso de producirse pérdidas no se reagruparon sino que se mantuvieron los tres ó dos restantes en el mismo recinto. La normativa “Líneas Directrices Relativas al Alojamiento y al Cuidado de los Animales del Consejo de las Comunidades Europeas” se observó para los apartados de superficie por animal, ventilación, temperatura, humedad, iluminación, ruidos, sistemas de alarma y sacrificio²⁴.

TABLA VII

Pesos en el momento de entrar a estudio

Grupo(s)	Incluidos (número)	Edad (semanas)	Media pesos (gramos)	Rango (gramos)
De radiación	84	8-10	24,4	22,2-28,7
0.1	8	9-11	25,3	22,9-27,6
0.3	8	11-13	24,9	23,2-26,6
0.6	4	14-16	25,2	23,8-27,4

2.2.3.- Procedimientos anestésicos.-

Para la irradiación, inoculación y necropsia, se procedió a inducción anestésica de los animales por medio de inyección única intraperitoneal de un compuesto veterinario, a distintas dosis según el momento experimental:

Para irradiación e inoculación.

Anestesia superficial con

ketamina + clorbutol: 0,07 mg/gr de peso (Imalgène[®] Lab. Rhône Mérieux)

+

tiazina: 0,01 mg/gr de peso (Rompún[®] Lab. Bayer)

pese a tratarse de una dosis baja, se produjeron dos muertes durante la irradiación y cinco durante la inoculación atribuibles a accidente anestésico o relacionadas de alguna manera con ello.

Previo a la necropsia.

Anestesia profunda con

ketamina + clorbutol: 0,14 mg/gr de peso (Imalgène[®] Lab. Rhône Mérieux)

+

tiazina: 0,02 mg/gr de peso (Rompún[®] Lab. Bayer)

aun con esta dosis, la parada cardiaca no sobrevino en ningún caso antes del pinzamiento de la tráquea (Ver apartado 2.5.1.).

2.3.- IRRADIACIÓN .-

2.3.1.- Aparato .-

Generador de rayos X Dermopan 2 de la marca Siemens. Posición 4 lo que corresponde a una Tensión de 50 KV y una Intensidad de 25 mA. Filtro de 1 mm de Aluminio.

Aplicador de campo cuadrangular de 20x20 cm. Distancia Foco-Piel de 30 cm. Tasa de dosis nominal 100 R/minuto.

2.3.2.- *Dispositivo .-*

Para la irradiación exclusiva de un hemitórax o lo que es lo mismo, para la protección del resto del cuerpo, se diseñó un dispositivo acoplable al aparato y que al mismo tiempo asegurara la inmovilización durante la sesión. Su elaboración se llevó a cabo siguiendo estos pasos:

1°.- Se realizó radiografía de un ratón con el propio aparato de tratamiento y aplicador, utilizado a 29 KV durante 1 sg (Figura 4). Se utilizó un animal tipo de 24 gr de peso, firmemente sujeto por tobillos, muñecas y rabo al chasis de la radiografía.

2°.- Sobre la radiografía se dibujó la línea media, el contorno del animal y un trapecio que incluía ampliamente el hemitórax por todos lados, excepto en su parte medial que coincidía exactamente con la mitad del tórax (Figura 4).

3°.- Sobre una plancha de plomo de 3 mm de espesor y 22x22 cm de lado (ligeramente más grande que el campo de radiación del aplicador), utilizando un molde obtenido del dibujo de la radiografía, se trasladó y dibujó el contorno de cuatro ratones, equidistantes del centro y con su eje mayor en dirección radial (Figura 5).

La disposición radial es crucial, para evitar que la oblicuidad del haz proporcione alguna dosis significativa al pulmón protegido, que actúa como control. La equidistancia del centro también asegura homogeneidad en la dosis entre los cuatro animales.

4°.- Se recortaron en el plomo cuatro ventanas correspondientes a los trapecios hemitorácicos dibujados en la radiografía (Figura 5); para ello se utilizó también una plantilla.

5°.- A la altura de muñecas, tobillos y rabo, pero fuera del contorno del ratón, se practicaron dos orificios por donde se pasó una cinta de seda formando un asa. Asimismo se fabricó suficiente número de cuñas de plástico para tensar la cinta desde el otro lado, una vez introducida la extremidad del animal (Figura 6). Por último, se elaboraron ocho patas de 2 cm de

altura para ser pegadas en los puntos cardinales de la plancha,
cuatro por cada lado.

Figura 4

Radiografía de animal tipo en la unidad de radiación

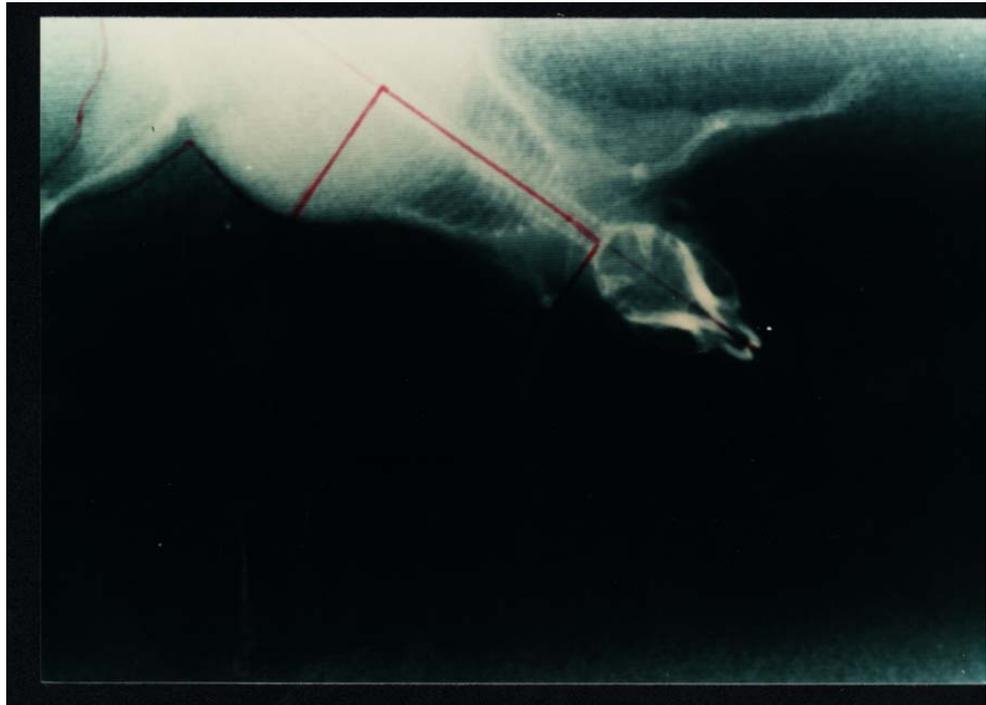
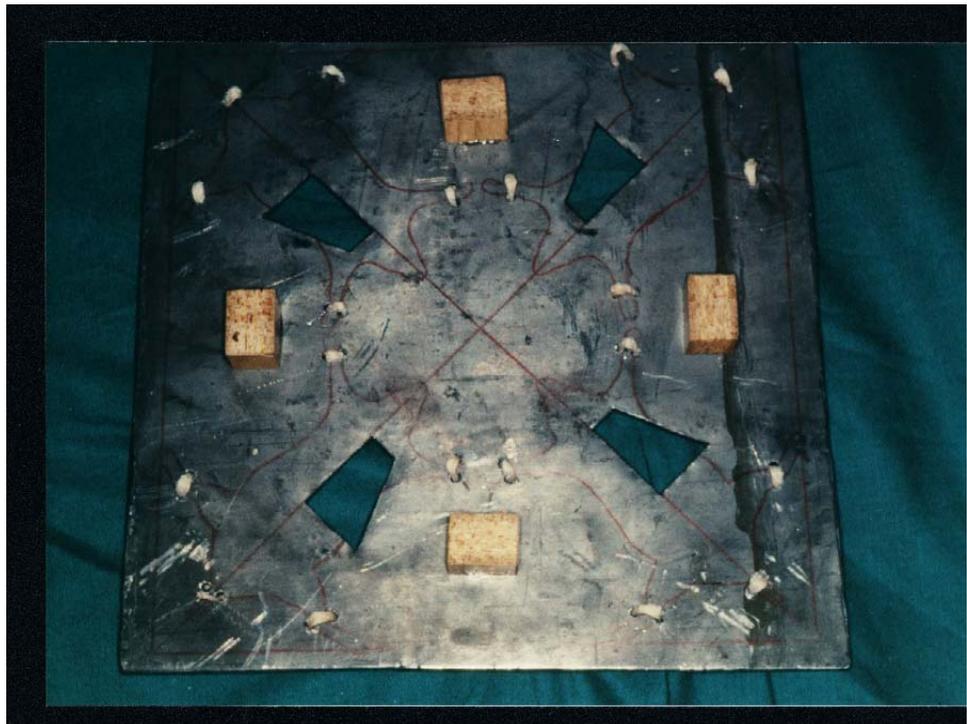
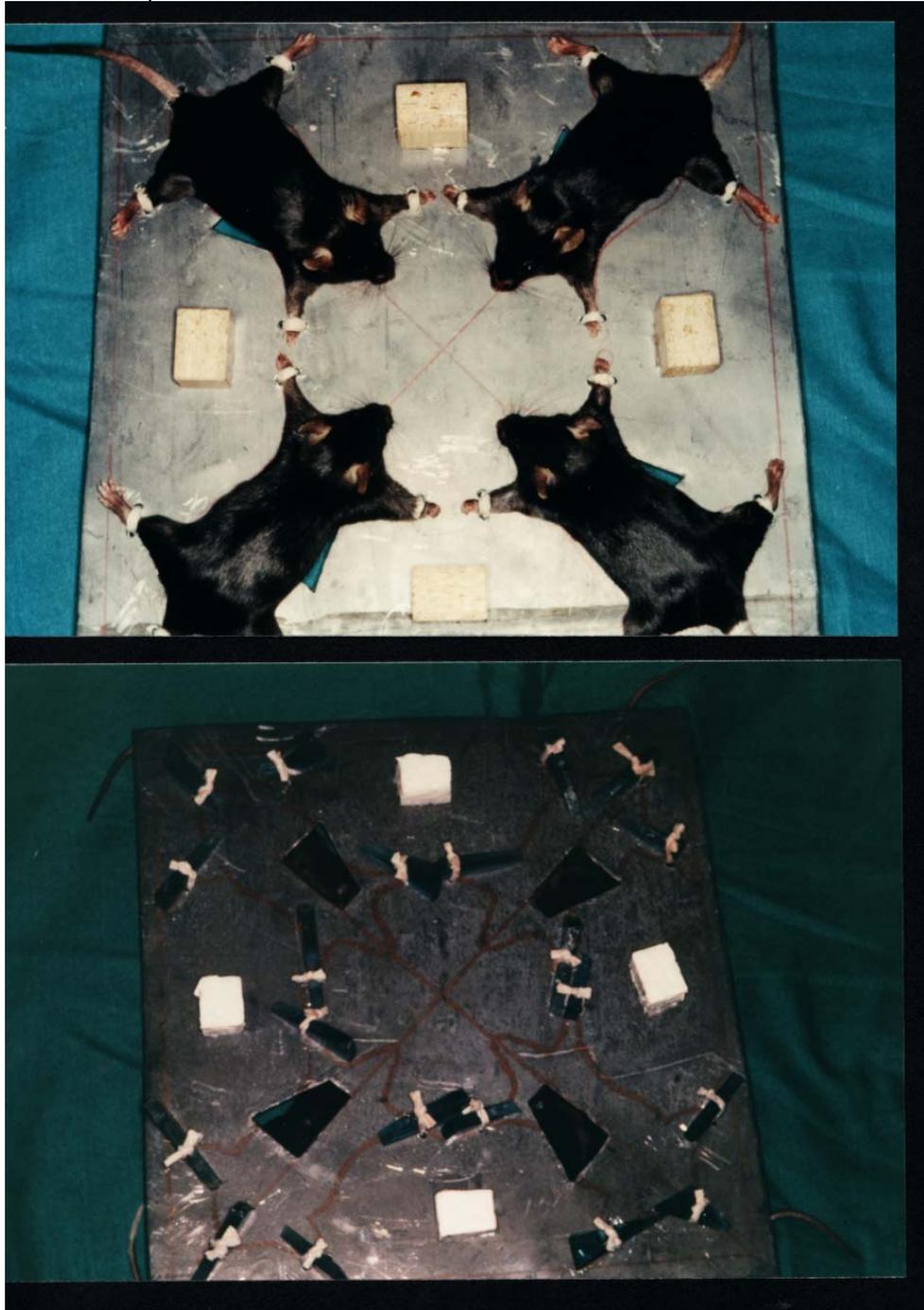


Figura 5
Dispositivo para la irradiación



+

Figura 6
Animales en posición de irradiación



6°.- Con cuatro animales en posición de tratamiento, se realizaron dos radiografías de control de centrado: una inmediatamente, para observar la proyección del haz exactamente sobre el hemitórax y otra a los quince minutos, para asegurarse de la inmovilidad durante un periodo de irradiación prolongado.

2.3.3.- Dosimetría .-

2.3.3.1.- Tasa de dosis .-

Mensualmente y de manera concertada con la dosimetría clínica del aparato, se realizaron medidas de exposición en aire con el aplicador y la posición ya descritos.

Se utilizó una cámara de ionización plana marca PTW-Freiburg modelo Marcus 23343 con electrómetro de la misma marca modelo DI4-Dosimenter.

Los valores obtenidos en tasa de Kerma aire tras su conversión en Exposición estuvieron en todos los casos en el rango de $100 \pm 3,5$ R/minuto. Por consiguiente se tomó siempre 100 R/min como tasa de referencia. Para su conversión en dosis se multiplicó por el factor de corrección correspondiente a la energía: 0,895 en este caso⁶⁸.

2.3.3.2.- Medidas de homogeneidad .-

Para confirmar la simetría de dosis entre los cuatro lechos que iban a recibir radiación simultáneamente, se llevó a cabo una medición en distintos puntos del campo por medio de dosimetría de termoluminiscencia (DTL).

El dispositivo, esto es, la plancha de plomo, se sembró con dosímetros de termoluminiscencia TLD-100[®] de la marca HARSHOW. Material termoluminiscente: Fluoruro de Litio. Dimensiones 2,5x2,5x1 mm.

La distribución de dosímetros puede verse esquematizada en la Figura 7 así como las lecturas obtenidas en cada punto tras un disparo único de dos minutos. De manera arbitraria se denominó Norte al lado del aplicador más alejado de los mandos del aparato y los otros puntos cardinales se adjudicaron en consecuencia.

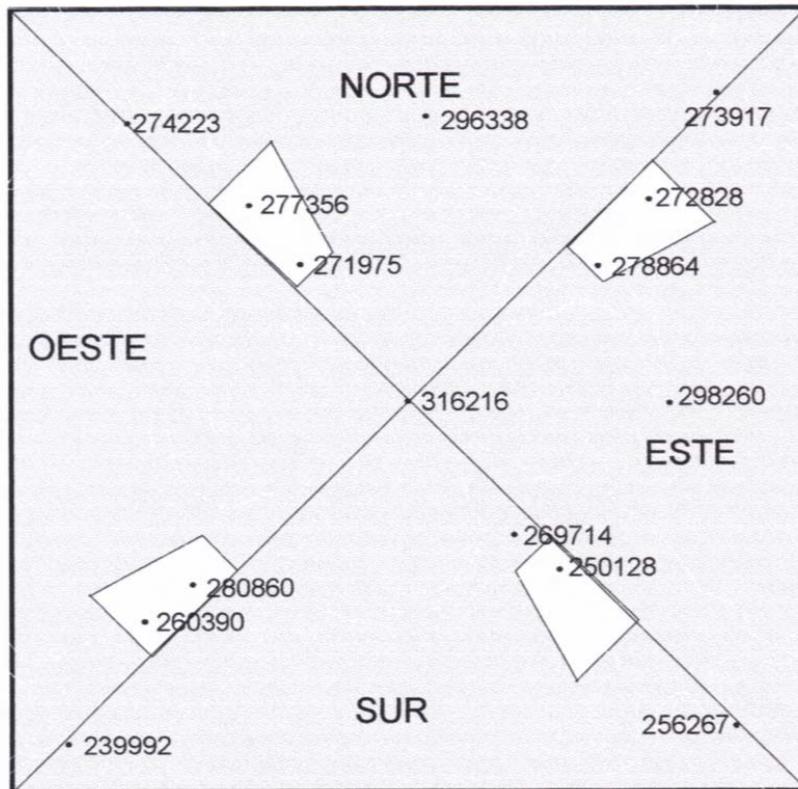


Figura 7.- Lecturas de homogeneidad.

Es necesario advertir que en estas condiciones, todos los dosímetros excepto los colocados en las ventanas de irradiación hemitorácica se ven influidos por retrodispersión.

2.3.3.3.- Dosificación "in necro" .-

Como confirmación adicional de las dosis que iban a ser administradas, su repercusión en profundidad y la aportación al pulmón contralateral, que actúa como control, se realizaron medidas en condiciones lo más semejantes posible a las reales, colocando el mismo tipo de dosímetros de termoluminiscencia en cadáver de ratón y éste en el sistema de irradiación.

Se tomaron cuatro animales tipo (pesos: 23,8gr; 24,6gr; 24,6gr; 25,0gr). Tras su sacrificio con una dosis alta de Ketamina se realizó una toracotomía media y extracción quirúrgica de todo el contenido torácico. En lugar de éste se colocaron dos algodones (representando densidad aire) albergando un dosímetro de termoluminiscencia para la parte izquierda y otro para la derecha. A su vez la semilla se había envuelto para su protección con una monocapa de plástico siliconado. Como es lógico, resulta difícil asegurar si el dosímetro se encontraba exactamente en el centro del algodón o si éste quedaba de perfil o de plano, lo que relativiza los resultados. Cerrada la toracotomía con puntos de seda se dispuso a los animales en posición de radiación para administrar, siempre sobre hemitórax izquierdo:

RATÓN SURESTE y NOROESTE:

Un minuto (100 R en superficie) en campo anteroposterior.

+

Un minuto (100 R en superficie) en campo posteroanterior.

RATÓN NORESTE:

Un minuto (100 R en superficie) en campo anteroposterior sólo.

RATÓN SUROESTE:

Un minuto (100 R en superficie) en campo posteroanterior sólo.

Las lecturas dosimétricas obtenidas, bastante coherentes entre sí, pueden verse en la Figura 8.

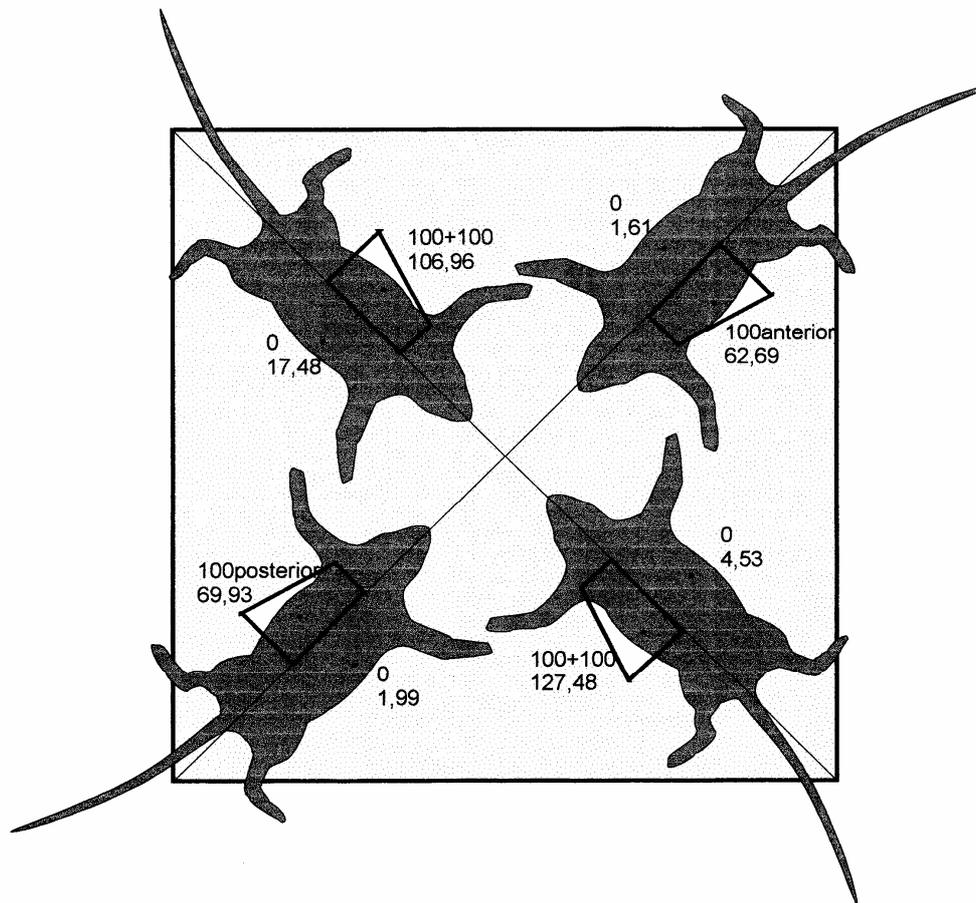


Figura 8.- Medidas sobre cadáver de ratón. Comparación de ambos hemitórax.
 Arriba Exposición. Abajo dosis medida.

2.3.3.4.- Cálculo dosimétrico .-

A partir de las curvas de rendimiento en profundidad para la energía y campo usados y con el contorno y grosor de un animal tipo, se elaboró un plano de isodosis. Se constató que administrando dos campos, antero-posterior y postero- anterior, la isodosis del 140% incluía todo el área del hemitórax (Figura 9). Por tanto la dosificación en superficie (D_s) para cada campo sería:

$$D_s = \frac{d * 100}{140}$$

Siendo d la dosis que se desea administrar en profundidad.

Así, para que el hemitórax reciba 500 cGy:

$$D_s = \frac{500 * 100}{140} = 357 \text{ cGy}$$

Considerando un rendimiento de 100 R / minuto y aplicando el factor de corrección Exposición → Dosis:

$$\text{Tiempo} = \frac{357}{100 * 0.895} = 3,99 \text{ m} = \boxed{3 \text{ m } 59 \text{ sg}}$$

Si lo que se quiere es administrar una dosis de 15 Gy, según los mismos cálculos, por cada campo habría que dar:

$$\text{Tiempo} = 11,97 \text{ m} = \boxed{11 \text{ m } 58 \text{ sg}}$$

Figura 9
Isodosis sobre corte anatómico



2.3.4.- Procedimiento .-

Para la irradiación hemitorácica se siguió la siguiente pauta:

1°.- Se separan los ocho animales en dos subgrupos de cuatro. Se pesan y se anotan los pesos.

2°.- Se anestesia el primer subgrupo con inyección intraperitoneal, según se describe el apartado 2.2.3.

Como norma, sin ninguna motivación especial, se comenzó siempre la irradiación por el subgrupo .D y con el campo antero-posterior.

3°.- Incisión con tijera de la oreja derecha del primer subgrupo.

4°.- Se colocan los ratones con su cara ventral hacia el dispositivo plomado, en el lado de éste, preciso para que sea el hemitórax derecho el que quede contra la ventana. Conforme se introducen manos, pies y rabo por las asas de seda, se va tensando cada una de éstas con una cuña inserta por el otro lado. Al final se realiza un repaso general de la posición de los animales y de la tensión de las cuñas. Se da la vuelta al dispositivo con los animales para que queden éstos abajo y las cuñas arriba.

El sistema de fijación ha sido lo bastante satisfactorio como para que no haya habido que excluir ningún animal del estudio por observar desplazamiento al concluir la sesión de radiación.

5°.- Se coloca el aplicador del aparato adosado al dispositivo y, tras asegurarse del kilovoltaje, la intensidad y el filtro, se dispara el tiempo correspondiente al primer campo.

6°.- Se va retirando a los animales de su posición y se les va colocando sobre la misma ventana, por el lado contrario del dispositivo, con su cara dorsal ahora contra el plomo. De esta manera seguirá siendo el hemitórax derecho el que siga recibiendo radiación, pero en sentido P-A. Se administra el mismo tiempo y los ratones pasan a su jaula donde quedan identificados por etiqueta.

7°.- Se repite el mismo procedimiento de anestesia, marcado e irradiación para el grupo .I, sólo que en este caso con la oreja y hemitórax izquierdos. Para ello hay que colocarlos en posición

ventral en la cara del dispositivo que los derechos ocupaban en posición dorsal y viceversa.

Al ser reversible, el mismo dispositivo permite la irradiación de pulmón derecho o izquierdo y en dirección A-P o P-A.

2.4.- INDUCCIÓN DE METÁSTASIS .-

Las metástasis pulmonares a ratones expuestos con anterioridad a irradiación pulmonar unilateral se provocaron por inyección intravenosa de células de melanoma B16-F10.

2.4.1.- Mantenimiento de la línea celular .-

Para su disponibilidad en el experimento, las células de melanoma se mantienen en el Laboratorio de Radiobiología del Departamento de Radiología y Medicina Física en tres formas:

- Cultivo celular. De donde se obtienen para la inoculación.
- Tumor de crecimiento subcutáneo en el flanco de ratones hembras. Fuente de tumor para cultivos y reserva.
- Congeladas. En Nitrógeno líquido a -196°C . Reservorio para pérdida de las otras fuentes.

Las manipulaciones estériles de los cultivos o sus precursores, así como la preparación de viales de inoculación se llevó a cabo en cámara de flujo laminar modelo Cultair Compact-30 de la casa Cultek. Se cuidó la separación física de las áreas de manejo de los animales y la de cultivos celulares, a fin de prevenir infecciones en los cultivos.

2.4.1.1.- “*In vivo*” .-

De manera habitual e ininterrumpida la línea celular se viene manteniendo por pasos estériles sucesivos en forma de implantaciones subcutáneas en el flanco derecho de ratones hembras. La elección de este punto anatómico estriba en la distensibilidad cutánea, que permite el crecimiento de nódulos solitarios, homogéneos y poco traumatizados. El procedimiento para los sucesivos pasos entre animales portadores es el siguiente:

Alcanzado por el tumor un tamaño de 1,5 cm aproximadamente, lo que ocurre entre los siete y los catorce días tras la implantación, se procede al sacrificio del animal con una dosis alta de anestésico. Previamente, la zona de interés ha sido rasurada y pincelada con una solución de Povidona Yodada al 10% (Betadine®). Inmediatamente se incide la piel y se extrae la masa tumoral en condiciones estériles. Se coloca el nódulo en una placa de Petri y se fragmenta, desechando las zonas necróticas, en tanto se lava con suero fisiológico. Los fragmentos, cuyo tamaño debe rondar el milímetro cúbico, pasan a otra placa donde reciben un nuevo lavado con fisiológico y una solución antibiótica (Anfotericina B: 200 µg/ml; Penicilina: 10.000 U/ml; Estreptomina: 10.000 µg/ml). Estas pequeñas fracciones de melanoma pueden implantarse tal cual en nuevos animales portadores, depositándolas subcutáneamente a través de una pequeña incisión y tunelización para evitar crecimiento tumoral en cicatriz; o bien pueden utilizarse por disgregación para promover cultivo (Ver siguiente Apartado).

2.4.1.2.- “*In vitro*” .-

Las células de melanoma se mantienen en cultivo monocapa albergadas en frascos tipo Falkon, suministrados por Bibby Cultures, de 25 centímetros cuadrados de superficie basal.

El medio de cultivo consiste en una mezcla de Minimal Essential Medium (MEM) con solución salina balanceada de Hank (HBSS), libres de Ca^{++} y Mg^{++} , suplementada con un 10% de suero bovino fetal. pH = 7,5. Los frascos permanecen en incubadora modelo Yamato IT62 de la casa HTEC, a 37 °C, en un ambiente humidificado compuesto de 95 % de aire atmosférico y 5 % de anhídrido carbónico.

Se realiza cambio de medio cada tres días y subcultivos cada seis o cuando las células llegan a la confluencia. Para esto último se desprenden las células de la pared basal del frasco por medio de tripsina EDTA fría y, previa dilución, se siembran en nuevos frascos con medio de cultivo. La

subcultivación nunca se realiza en más de cinco ocasiones a partir de un medio primitivo, ya que están descritas degeneraciones fenotípicas más allá de ese punto. Las células del medio a subcultivar también son aptas para transmisión del melanoma como tumor subcutáneo, con tal de que se inyecten más de 10.000 células.

Puesto que la subcultivación está limitada a cuatro o cinco pases, los cultivos han de ser renovados con células provenientes de tumor “in vivo”. Para ello se parte de los pequeños fragmentos de tumor aludidos en el apartado anterior. Éstos son sometidos a un nuevo lavado con una mezcla de MEM y la solución antibiótica de Penicilina, Anfotericina B y Estreptomina. A continuación se procede a convertir los acúmulos en entidades celulares simples por disgregación química, incubando en Tripsina al 0,1 %. El resultante se somete a centrifugación a 200 g durante tres minutos. Se desecha el sobrenadante, identificándose las células tumorales como una pequeña perla negra en el fondo del tubo. Ésta se diluye en medio de cultivo por agitación vigorosa, se pasa a los frascos y por fin a la incubadora.

La perla resultante de la centrifugación puede también destinarse a reservorio por congelación en Nitrógeno líquido. Para ello habrá que añadirle ácido épsilon-amino-caproico, que evita el daño celular por formación de espículas de hielo.

2.4.2.- Preparación de viales .-

El número de metástasis resultante de una inoculación intravenosa es proporcional a la cantidad de células inoculadas^{16,121}. Partiendo de este dato de la experiencia de otros autores³⁵, se realizaron pruebas piloto que demostraron que una inyección de 0,2 ml conteniendo entre 45.000 y 50.000 células, producían un total de nódulos metastásicos manejable en el experimento.

2.4.2.1.- Método .-

Para la inoculación se seleccionaron células creciendo “in vitro” en segundo o, en ocasiones, en tercer subcultivo. En el frasco, se disgregan y desprenden enzimáticamente con tripsina EDTA al 0,1 %. Pasadas al tubo correspondiente, se centrifugan a 200 g durante tres minutos y, tras desechar el sobrenadante, se resuspenden en 10 ml de HBSS. Realizado el

test de viabilidad y el recuento (Ver siguientes apartados) la muestra se rechaza si:

- La viabilidad es menor del 80 %.
o
- El recuento muestra más de un 10 % de células en acúmulos.
o
- El recuento muestra menos de 200 células por milímetro cúbico.
o
- El recuento muestra más de 500 células por milímetro cúbico.

Caso de que las anteriores cifras sean satisfactorias, a partir de una fracción de los 10 ml citados, se procede a la dilución necesaria para conseguir 400.000 células en 1,6 ml. Se cargan los ocho viales, que son jeringas desechables de inyección subcutánea de 1ml de capacidad, con aguja incorporada 0,36 x 13 mm, calibre 28G. A continuación se depositan en estufa a 37 °C hasta el momento de la inoculación que comienza con el primer ratón del grupo de forma inmediata.

2.4.2.2.- Recuento .-

De los 10 ml originales, se toma una muestra de 0,2 ml, a la que se añaden 0,5 ml de azul tripán al 0,4 % y otros 0,3 ml de HBSS. Con ello se completa 1 ml y por tanto un factor de dilución de 5. La mezcla se deja reposar entre diez y doce minutos.

Con ayuda de una pipeta de Pasteur se transfiere la cantidad adecuada de esta disolución al borde de un hemocitómetro de doble cámara, donde penetra por capilaridad bajo el cubre de la retícula, que ya se encuentra en un microscopio de luz invertida. Se cuentan las células en diez cuadrados de un milímetro cúbico y se saca la media.

2.4.2.3.- Test de viabilidad .-

La viabilidad de la población celular a inyectar se realizó por prueba de exclusión del azul tripán, basada en que las células picnóticas o aun vivas con alteraciones metabólicas graves, son incapaces de impedir la penetración del colorante del medio a su citoplasma.

De este modo, en el mismo microscopio de luz invertida, se utiliza el recuento para aplicar la fórmula:

$$\text{Viabilidad} = \frac{\text{Número de células viables}}{\text{Número total de células}} * 100$$

expresada en tanto por ciento.

Los valores de viabilidad de las muestras usadas en este experimento nunca estuvieron por debajo del 86 %.

2.4.3.- Procedimiento de inoculación .-

Transcurridos los plazos de 2; 7; 21 ó 42 días según el Grupo, se procedió a la inoculación intravenosa de las metástasis de melanoma, siguiendo, animal por animal, el procedimiento que se detalla a continuación, habitual para inyecciones intravenosas a roedores de pequeño tamaño⁴³.

1° .- Anestesia intraperitoneal, según se describe en el Ap. 2.2.3.

2° .- Se calienta el rabo del ratón exponiéndolo a una luz halógena de 50 W durante 90 segundos, a 1,5 centímetros de la bombilla. Durante ese tiempo se va moviendo en sus distintas caras, para evitar erosiones por el calor y para conseguir una vasodilatación homogénea.

3° .- Se introduce al animal en un receptáculo que por el tamaño limita su libertad de movimiento, pero sin fijación específica como en el caso de la irradiación. La parte superior agujereada asegura la renovación de aire. El rabo queda fuera, a través de un orificio practicado al efecto. Sobre la caja que contiene al ratón se deposita un peso, 1 Kg. de plomo, a fin de poder ejercer tracción sin que se desplace el conjunto (Figura 10).

4° .- Se saca el vial de la estufa a 37°C. Sujetando el rabo firmemente desde su extremo, se identifica una de las dos venas dorsales⁴³ y se procede a la punción, casi a bisel sobre la piel y en la dirección del eje longitudinal de la cola (Figura 10). Si la primera punción ha sido infructuosa, se puede repetir hasta en tres intentos más, alternando vena derecha o izquierda y siempre las sucesivas punciones más proximales que las anteriores.

Figura 10
Inoculación intravenosa del tumor



Si tras cuatro intentos no se ha conseguido canalizar vía, o antes si en la extravasación de los intentos previos se ha perdido cantidad significativa de la muestra, el animal queda excluido del estudio. Este caso se dio en dos ocasiones.

La correcta canalización de la vena es fácil de detectar, por la pérdida de resistencia del émbolo de la jeringa y porque conforme la solución va penetrando en la vena, ésta palidece en toda su longitud visible. La inyección debe durar unos quince segundos. Más lenta se corre el riesgo de desplazamiento; más rápida puede producirse parada cardíaca por el contenido en potasio de la solución. Esto último debió ocurrir, según los hallazgos de la necropsia, con cuatro animales que resultaron muertos en el momento de la inoculación.

5°.- Después de extraer la aguja, se comprime el punto de la venopunción durante unos 20 segundos, se saca al animal del receptáculo y se deja en una jaula independiente.

Se repite el procedimiento con los siete animales restantes, quedando todos en sus dos jaulas primitivas y debidamente identificados.

2.5.- NECROPSIA Y OBTENCIÓN DE DATOS .-

Los estudios preliminares indicaron que tres semanas tras la inoculación eran plazo suficiente para que las metástasis se hicieran fácilmente objetivables, sin excesivas posibilidades de muerte por crecimiento tumoral e insuficiencia respiratoria. Este plazo es utilizado con el mismo modelo metastásico por otros autores¹¹.

2.5.1.- Protocolo de sacrificio y necropsia .-

La disección del animal se proyectó siguiendo pautas habituales para roedores de pequeño tamaño¹³¹, con algunas modificaciones para preservar en lo posible la integridad del pulmón, objeto principal de interés. El protocolo, siempre a la vista del experimentador durante la necropsia, reza:

1°.- Anestesia profunda. (Ver 2.2.3.).

2°.- Observación externa:

- depilaciones.
- lugar de la inoculación (rabo).
- otras alteraciones.

3°.- Fijación al plano de trabajo por las cuatro extremidades.

4°.- Incisión cutánea entre el mentón y la raíz de la cola, evitando con una pequeña curva el pene. Disección roma hasta dejar al descubierto el plano muscular de cuello, tórax y abdomen, cuidando no lesionar los vasos axilares.

5°.- Laparotomía media prolongada en dos incisiones por debajo de las arcadas costales, cuidando no perforar el diafragma, sobretodo a la altura de xifoides, o la cavidad pleural perderá el vacío y los pulmones se colapsarán.

6°.- Aislamiento a nivel cervical de la tráquea. Clampar.

El motivo de clampar la tráquea antes de perder la presión torácica negativa reside en que, cuando posteriormente se extraigan, será más fácil identificar los distintos lóbulos si los pulmones están aireados y distendidos. En ese momento los animales solían tener uno ó dos estertores y sobrevenía, como es lógico, la parada respiratoria.

7°.- Empujar el hígado hacia abajo. Seccionar el ligamento falciforme e identificar la vena suprahepática. Se corta ésta y la abundante hemorragia se empapa con una torunda de gasa.

8°.- Toracotomía a ambos lados del xifoides y hacia arriba a ambos lados del esternón. Extirpar ese fragmento de pared anterior del tórax, con cuidado de no tocar el pulmón.

9°.- Extirpar timo y tiroides con pinzas y delicadeza.

10°.- Seccionar la tráquea por encima del clampaje. Ejerciendo tracción suavemente a la pinza de clampaje se van extrayendo lentamente los pulmones, vías aéreas y corazón. Mientras se extraen, se va haciendo disección roma por la parte dorsal para liberar el citado conjunto de esófago, vasos, pleura, etc., que

quedan atrás. Al final queda el contenido torácico colgando de la pinza (Figura 11).

11°.- Extensión sobre papel cartón y primera fijación con unas gotas de formol.

12°.- Identificación del hilio del pulmón izquierdo y sección.

CUANTIFICACIÓN DE METÁSTASIS EN PULMÓN IZQUIERDO

(Ver protocolo correspondiente)

13°.- Identificación del hilio del pulmón derecho y sección.

CUANTIFICACIÓN DE METÁSTASIS EN PULMÓN DERECHO

(Ver protocolo correspondiente)

Los pulmones o lóbulos, conforme quedan contados, pasan a frasco con formol debidamente identificados (Grupo, Subgrupo y Pulmón) para estudio microscópico.

14°.- Completar la disección de abdomen, extrayendo órgano por órgano y dejando en formol, bien identificada, cualquier víscera que presente alteraciones macroscópicas.

15°.- Dar la vuelta al animal. Incindir piel entre nariz y cuello y separarla. Con el escalpelo en horizontal se perfora el hueso interparietal. Se completa la craniotomía en redondo y se extrae el encéfalo para su observación.

16°.- Todo lo que no quede para estudio microscópico, se deja en bolsa cerrada para incineración.

Conforme se iba desarrollando la disección, los hallazgos quedaban anotados en la hoja de datos.

Figura 11
Extracción de los pulmones durante la necropsia.
Obsérvense las metástasis de melanoma como conspicuos nódulos negros.



2.5.2.- Protocolo de cuantificación de metástasis pulmonares .-

La apreciación de los resultados numéricos en cuanto a metástasis pulmonares obtenidas, ha sido un aspecto ejecutado de modo especialmente escrupuloso. La detección de las metástasis se realizó “de visu”, aprovechando el conspicuo color negro del melanoma y porque no existe descripción de sistema más objetivo. Es por supuesto el mecanismo adoptado por otros investigadores^{11,60,112,126}, que incluso informan¹²⁶ de una concordancia histológica superior al 90 %.

Conforme las metástasis se iban contando, quedaban registradas en una Hoja de Datos; una de cuyas copias se presenta en la Figura 12. Cada hoja permite la anotación de cuatro animales, lo que constituye un subgrupo, que con su monograma quedaba anotado en el encabezamiento.

Para uniformizar las observaciones se redactaron unas normas o protocolo, siempre a la vista del experimentador que, como es lógico, siempre era el mismo.

- 1.- Se comienza por el pulmón izquierdo (un sólo lóbulo).
- 2.- Después se hará el derecho (tiene cuatro lóbulos). Se separa lóbulo por lóbulo para el recuento de metástasis.
- 3.- Se observan todas las caras del pulmón o lóbulo. Después se van contando y anotando las metástasis cara por cara.
- 4.- Cuentan las metástasis objetivables a simple vista. Si algún punto, ya detectado así, se duda de que se trate de un nido de melanoma, se recurre al microscopio de baja potencia (x10) para dilucidarlo.

En ocasiones, a pesar de la exsanguinación por suprahepática, algún punto hemorrágico ínfimo podía dar lugar a confusión.

- 5.- Si se tienen dudas de si dos metástasis, en caras distintas de un pulmón o lóbulo, pudieran ser la misma aflorando a ambas caras; después de completar esa pieza se secciona para averiguarlo. Si se tratara de la misma contará lógicamente como una sola, con el tamaño en el lado que fuera mayor.
- 6.- Anotación: se anotan en sus cuadros correspondientes, un cuadro por metástasis, poniendo:

Figura 12

GRUPO _____

1^{er} Ratón

P.IZQUIERDO

P.DERECHO

OTROS HALLAZGOS

2^{do} Ratón

P.IZQUIERDO

P.DERECHO

OTROS HALLAZGOS

-- un signo "<" si mide menos de 0,5 mm.

-- un "1" si tiene entre 0,5 y 1 mm.

-- una cifra con su dimensión en mm. si es mayor de 1 mm.
Redondear siempre por arriba. P. ej. si mide poco más de 2 mm.
se anota con un "3".

7.- Otras observaciones. Utilizar la siguiente tabla
semicuantitativa para metástasis en otros territorios:

Si se ven:

Anotar como:

Metástasis pleurales

- | | |
|--|---|
| -- Nódulos pequeños, menos de tres por hemitórax, con o sin adherencias. | 1 |
| -- Nódulos abundantes, ocupando buena parte de la cavidad pleural. | 2 |
| -- Nódulos confluentes, tapizando cavidad, o asociados con derrame. | 3 |

Linfáticos metastásicos (extratorácicos)

- | | |
|----------------------|---|
| -- Nódulo solitario. | 1 |
| -- Más de uno. | 2 |

Rabo

- | | |
|-------------------------|---|
| -- Uno y menor de 2 mm. | 1 |
| -- Más. | 2 |
| -- Amputación. | 3 |

Bazo

- | | |
|--------------------|-------|
| -- Indicar número. | 16263 |
|--------------------|-------|

2.5.3.- Estudio microscópico .-

La técnica utilizada para la observación de las muestras en microscopía óptica convencional fue Hematoxilina-Eosina. Fijación en formol 10%. Cortes en parafina 5 μ .

Hematoxilina de Harris:

Solución A

Hematoxilina en polvo	5 gr
Alcohol etílico 100%	50 cm ³

Solución B

Alumbre potásico cristalizado	100 gr
Agua destilada	800 cm ³
(el alumbre se disuelve en caliente)	

A las 24 horas se mezclan las soluciones y se añaden 2,5 gr de óxido de mercurio rojo. El resultado se hace hervir 30 minutos y se coloca en un matraz destapado bañado en agua fría.

Eosina:

Eosina	2 gr
Agua destilada	160 cm ³
Etanol 96%	640 cm ³
Ácido acético glacial	9 gotas

Tinción

- 1.- Desparafinar e hidratar.
- 2.- Hematoxilina de Harris (1-2 min)
- 3.- Lavado en agua corriente.
- 4.- Eosina (1-2 min)
- 5.- Deshidratar a partir de etanol 90%, 96% y 100%
- 6.- Carboxilol, Xilol y montaje corriente en Eukitt.

La observación y toma de fotografías se efectuó en microscopio óptico Nikon Ophthiphot con lentes de distintos aumentos según el caso.

2.6.- EVALUACIÓN DE RESULTADOS .-

2.6.1.- Manejo de datos. Normalización .-

Los datos obtenidos en la necropsia fueron anotados en una hoja del programa Excel de Microsoft, versión 5.0. Las propias funciones del programa sirvieron para su tratamiento matemático en cuanto a cálculos, estratificación, medias, etc.

Para aprovechar el hecho de que cada animal constituye su propio control al tener un pulmón expuesto y otro protegido, el parámetro manejado para la evaluación de diferencias numéricas por el factor radiación, será siempre el cociente:

$$P.R. / P.nR. = \frac{\text{Número de metástasis en pulmón irradiado}}{\text{Número de metástasis en pulmón no irradiado}}$$

para cada animal. La evaluación estadística se efectúa posteriormente con la proporción que cada sujeto aporta. La obtención de estos cocientes como paso previo, elimina además las diferencias cuantitativas de metastatización entre unos ratones y otros.

Dado que por su volumen los pulmones derechos reciben más metástasis que los izquierdos, tanto sirvieran como testigo, irradiados, como si eran controles, no irradiados; resulta conveniente normalizar esta diferencia para evitar una duplicidad de órdenes de datos. En la Tabla VIII puede verse que las proporciones obtenidas en los animales valorables de los Grupos Control, sin radiación en ningún hemitórax, entre pulmones derechos e izquierdos, presentan pocas fluctuaciones, concretamente 2,275 como proporción del total y 2,264 como media de los cocientes de cada animal. Con ello es coherente inferir una desviación de 2,27 como norma a favor del pulmón derecho. Así pues, todos los recuentos de pulmones izquierdos se multiplicaron por un factor de 2,27; tanto fuera pulmón expuesto (dividendo), como el protegido (divisor). Resulta ocioso aclarar que al tratarse de un cociente, la multiplicación por un factor constante no constituye una magnificación de la muestra.

Efectuada esta corrección, el valor del cociente arriba citado debería aproximarse a la unidad si la irradiación no influye en el número de metástasis y alejarse hacia cifras mayores o menores según favoreciera o inhibiera respectivamente.

TABLA VIII

Proporción de metástasis pulmón derecho/izquierdo
en Grupos Control

TOTALES

Total Pulmón derecho = 1.019 metástasis

Total Pulmón izquierdo = 448 metástasis

$$\text{Proporción } D/I = \frac{1019}{448} = \underline{\underline{2,275}}$$

PARCIALES

	<u>Proporción</u>	
Grupo 0.1.		
Ratón nº 2	2,508	
Ratón nº 3	2,379	
Grupo 0.3.		
Ratón nº 1	2,104	
Ratón nº 3	2,309	} $\bar{X} = \underline{\underline{2,264}}$
Ratón nº 4	1,846	
Grupo 0.6.		
Ratón nº 1	1,733	
Ratón nº 2	2,542	
Ratón nº 3	2,692	

2.6.2.- Método estadístico .-

Se asume que el conjunto de proporciones pulmón irradiado/ pulmón no irradiado (PR/PnR) en los animales expuestos, sigue una distribución *normal*; es decir que toma la forma aproximada de una campana de Gauss alrededor de un valor promedio. Esta premisa, además de resultar lógica dado el diseño del experimento, puede constatararse en la Figura 13. A partir de ahí, se pretende comparar una media observada (el promedio de las proporciones PR/PnR que cada animal valorable aporta) con una media teórica (que en este caso sería 1). Esta comparación se efectúa con el método de la Desviación Reducida¹³⁹, aplicando la fórmula:

$$\varepsilon = \frac{|m - \mu|}{\frac{s}{\sqrt{n}}}$$

Siendo:

m = media observada.

μ = media teórica = 1

s = desviación típica de la muestra $\cong \sigma$ = desviación típica.

n = número de efectivos de la muestra.

Es el método de las series apareadas o método de las parejas.

Para muestras grandes ($n > 30$), si $|\varepsilon| \geq 1,96$ la diferencia es significativa al menos al 5 % ($p < 0,05$). Para muestras con menos de 30 efectivos se calculará el valor de t y el riesgo que corresponda a cada caso dependerá de la entrada en tabla de ese valor a través de los grados de libertad del grupo.

Las correlaciones con metástasis pleurales o extratorácicas se abordará como la comparación de una repartición observada con una repartición teórica de carácter cualitativo. Así pues se usará el método de la χ^2 con los grados de libertad correspondientes a cada situación. Como en el caso anterior, se considerarán significativas las diferencias $\alpha \leq 5\%$ ($p < 0,05$).

El tamaño de las metástasis se considerará con ambos métodos: 1.- Por método de la χ^2 agrupadas en tamaños en pulmón irradiado y no irradiado. 2.- Como series apareadas calculando el tamaño medio de las metástasis en cada pulmón y restando valor obtenido para el pulmón prueba menos el del

control. El resultado de la media de todos los animales valorables se comparará con la media teórica, que en este caso sería cero.

III.- RESULTADOS .-

3.1.- DATOS GLOBALES .-

Se exponen a continuación los relativos a metastatización pulmonar, objeto principal de la tesis. Los hallazgos referentes a infiltración o metástasis en otros territorios o su relación con las metástasis pulmonares se abordarán en el Apartado 3.4.

3.1.1.- Animales valorables .-

Ciento cuatro animales entraron en el estudio. De ellos 20 correspondieron a grupos control y los restantes 84 a grupos de radiación.

Como puede verse en la Tabla IX (a), un total de 18 se perdieron a lo largo del experimento por motivos ya aludidos en el Apartado Material y Métodos : accidentes anestésicos, imposibilidad de inyectar, etc. Así pues, fueron 86 los sometidos a necropsia reglada y protocolo de cuantificación de metástasis.

Los sujetos con menos de ocho metástasis entre los dos pulmones (antes de la normalización) no se computaron en las estadísticas de número de metástasis, para evitar un excesivo rango en las proporciones Pulmón Irradiado / Pulmón no Irradiado (P.R./P.nR). En este caso se encontraron 22 animales, quedando 64 ejemplares para analizar, de los cuales 56 pertenecen a Grupos de radiación y ocho a los Grupos control (Tabla IX [b]). Cuando se pretenda considerar sólo las metástasis por encima de un determinado tamaño, la población se verá aún más reducida, al no presentar todos los individuos número suficiente de nódulos de tal tamaño.

TABLA IX (a)

Evolución de los animales sujetos a estudio

Grupo*	Pérd. en rad.	Irradiados	Pérd. Inervalo	Pérd. Inyecc.	Inyectados	Pérd. intervalo	Sacri ficados	Total pérdidas
0.1		NO			8	1	7	1
0.3		NO			8		8	0
0.6		NO			4		4	0
5.2.D		4			4	2	2	2
5.2.I		4			4	1	3	1
5.1.D		8		1	7	2	5	3
5.1.I		8			8	1	7	1
5.3.D		6		1	5		5	1
5.3.I		6		1	5		5	1
5.6.D	1	9	1		8		8	2
5.6.I		10		2	8	1	7	3
15.2.D		4			4		4	0
15.2.I		4			4		4	0
15.1.D		6		1	5		5	1
15.1.I		6		1	5		5	1
15.3.D	1	3			3		3	1
15.3.I		4			4		4	0
TOTALES	2	82	1	7	94	8	86	18

* La repetición de Grupos (1) (2), ya sumadas.

TABLA IX (b)

Evaluación de los animales para número de metástasis.

Grupo*	Sacrificados	8 ó más Met	Menos de 8 Met.
0.1	7	2	5
0.3	8	3	5
0.6	4	3	1
5.2.D	2	1	1
5.2.I	3	3	
5.1.D	5	5	
5.1.I	7	4	3
5.3.D	5	5	
5.3.I	5	5	
5.6.D	8	8	
5.6.I	7	6	1
15.2.D	4	4	
15.2.I	4	2	2
15.1.D	5	3	2
15.1.I	5	4	1
15.3.D	3	3	
15.3.I	4	3	1
TOTALES	86	64	22

* La repetición de Grupos (1) (2), ya sumadas.

A su vez, entre los 56 sujetos con ocho o más metástasis de los Grupos de radiación, en 29 el pulmón derecho actuó como prueba y el izquierdo como control; en los restantes 27 fue al revés.

3.1.2.- Totales metastásicos .-

En el total de los 84 animales sacrificados, se detectaron 7.293 metástasis pulmonares, de las que 4.986 asentaban en pulmón derecho y 2.307 en el izquierdo.

La proporción es pues:

$$\frac{D}{I} = \frac{4986}{2307} = 2,161$$

cifra bastante parecida a la proporción D / I en los Grupos control (Tabla VIII); no es sorprendente, teniendo en cuenta que la irradiación, si ha influido, lo habrá hecho en la mitad de los casos para cada pulmón.

Deducidas las 1.019 derechas y las 448 izquierdas de los Grupos control, restan 5.826 metástasis en los grupos de radiación, que se distribuyen:

2.958 en pulmones que recibieron radiación (P.R.)

2.868 en pulmones que no recibieron (P.nR.).

Proporción:

$$P.R. / P.nR. = \frac{2.958}{2.868} = 1,03138$$

Ello orienta hacia una levísima tendencia a favor de las metástasis en territorio irradiado; anecdótica por otra parte ya que, como se indicó en Material y Métodos, las proporciones se irán haciendo de cada animal en particular y el conjunto de esos datos dará la auténtica medida de la diferencia.

3.2.- METÁSTASIS PULMONARES .-

3.2.1.- Metástasis en pulmón irradiado frente a control .-

Se aborda aquí el tema central del experimento. La cuestión de si aquel pulmón que ha recibido radiación antes de la inoculación, ha sido objeto de más metástasis. Los resultados se expondrán agrupando los animales según los distintos parámetros previos de dosis e intervalo, así como la población en conjunto.

En la Figura 13 puede verse la distribución de los cocientes P.R. / P.nR. obtenidos. La moda estuvo en el rango 0,9 - 1,1 lo que aconteció en 15 animales. La Figura 14 muestra la proporción obtenida en cada ratón evaluable, ordenados de menor a mayor, en forma de diagrama de dispersión.

3.2.1.1.- Toda la población .-

Para los 56 sujetos valorables y a partir del cociente P.R. / P.nR. de cada uno de ellos se obtiene el siguiente resultado:

Suma de cocientes:	62,702147
Animales valorables:	56
Media:	1,11968
	Desviación Típica: 0,4068
Desviación Reducida (ϵ):	2,201539 (p = 0,025)

Es decir, las metástasis son casi un 12% más numerosas en los pulmones que habían recibido radiación y esta desproporción es estadísticamente significativa.

Figura 13.-
Distribución de cocientes P.R./P.noR.

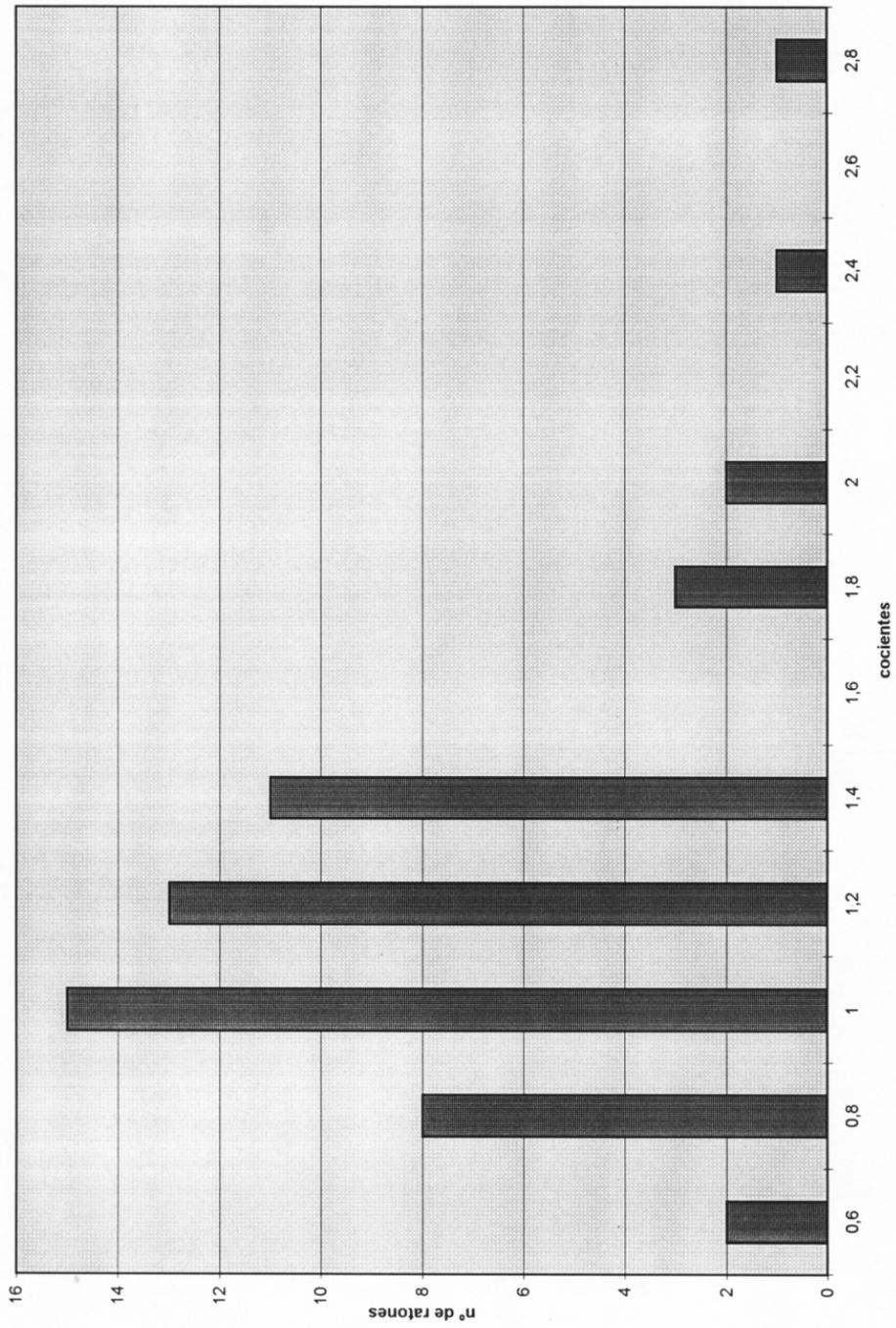
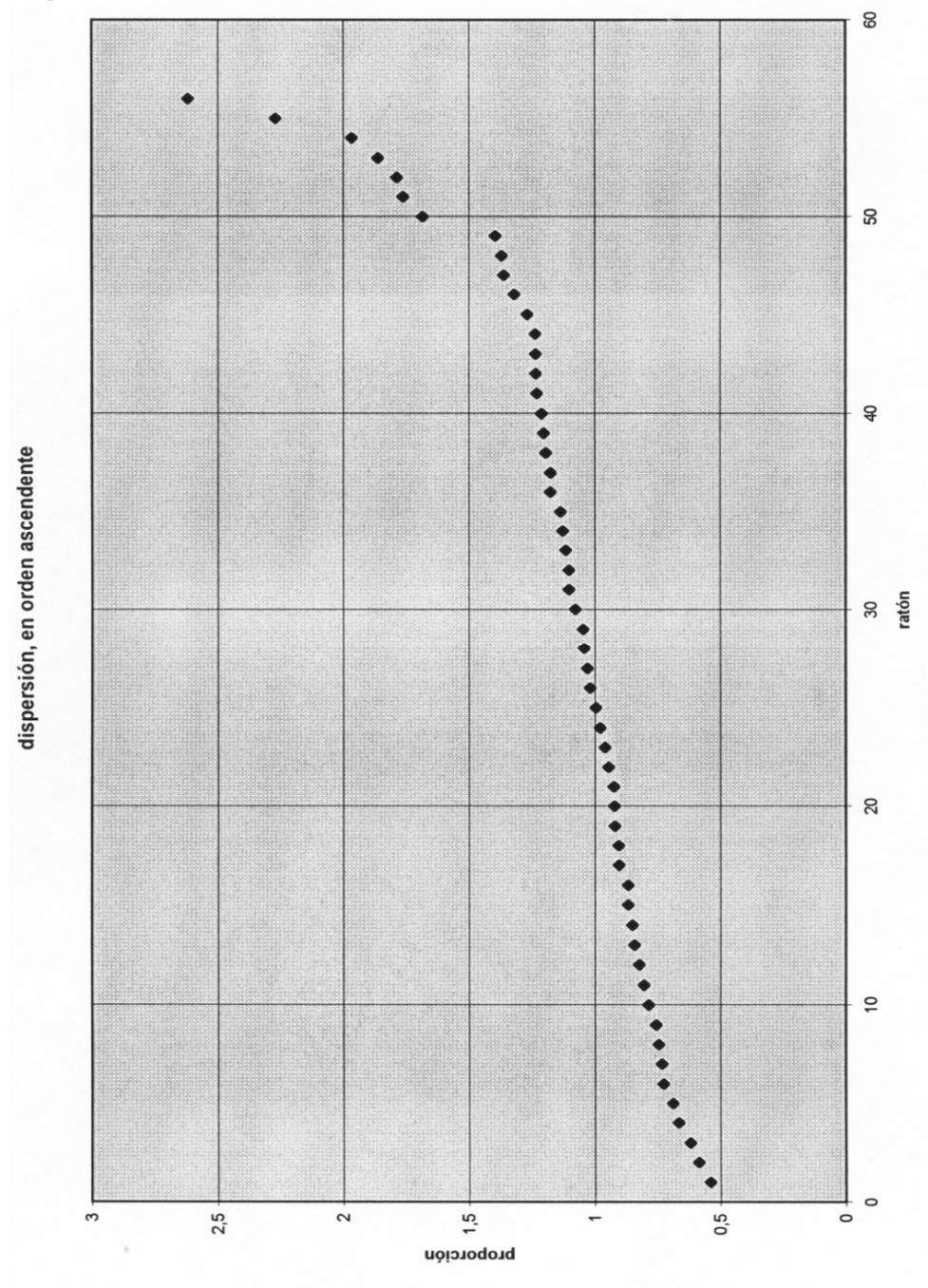


Figura 14
Dispersión



Si se quieren analizar sólo los nódulos mayores de un tamaño dado, por ejemplo metástasis de 1 mm o mayores, según protocolo del Apartado 2.5.2. Punto 6º, la población disminuye en número, porque no todos los animales alcanzaban número suficiente de metástasis de tal tamaño. Aun así, los resultados son significativos:

Suma de cocientes:	55,74797	
Animales valorables:	46	
Media:	1,21191	
		Desviación Típica: 0,65467
	Desviación Reducida (ϵ):	2,1954 (p = 0,028)

Insistiendo más en el asunto del tamaño, pueden hacerse cálculos para las metástasis ≥ 2 mm. La media de proporciones es aún más alta, se separa más de la unidad como valor teórico con el que comparar. Sin embargo, al disminuir el número de efectivos, se incrementa la desviación típica, perdiéndose significación estadística:

Suma de cocientes:	31,33141	
Animales valorables:	25	
Media:	1,25326	
		Desviación Típica: 1,21905
	Desviación Reducida (t):	1,03874 (p = 0,3)

A pesar de la ausencia de significación estadística, el valor relativamente elevado de la media cuando se comparan los nódulos de mayor tamaño, hace pensar que las metástasis no sólo son más numerosas en el territorio irradiado, sino que tampoco encuentran mayor cortapisa para su crecimiento. Esto es, no se manifiesta un “Efecto Lecho”, al menos para estos tamaños y en cuanto al parámetro Retraso en el Crecimiento (Ver 1.4.1). La cuestión se abordará más en profundidad en el Apartado 3.3.

Se puede completar el acercamiento cuestionándolo a la inversa. ¿Son también más numerosas las metástasis de pequeño tamaño en el territorio irradiado? Para ello pueden compararse las metástasis < 1mm, según el protocolo enunciado en el Apartado 2.5.2. Punto 6°. La media de las proporciones es lógicamente menor, pero al ser valorables todos los sujetos, todos tenían suficiente número de metástasis ínfimas para ser valorables, sí que se alcanza significación estadística:

Suma de cocientes:	62,0773	
Animales valorables:	56	
Media:	1,10852	
		Desviación Típica: 0,37942
	Desviación Reducida (ϵ):	2,12123 ($p = 0,033$)

3.2.1.2.- Grupos de Dosis .-

La propuesta ahora es separar los animales en Grupos de igual dosis de radiación al pulmón, independientemente del intervalo que entre ésta y la inoculación haya transcurrido.

El grupo más numeroso fue el de 5 Gy. De nuevo las proporciones adoptan un valor promedio superior a la unidad, pero sin llegar a alcanzarse significación estadística:

Suma de cocientes:	41,03794		
Animales valorables:	37		
Media:	1,10913		
		Desviación Típica:	0,41349
		Desviación Reducida (ϵ):	1,60545 ($p = 0,11$)

El Grupo que recibió 15 Gy manifiesta unos valores aún más separados de la unidad, en el sentido de una mayor tendencia a desarrollar metástasis en el pulmón irradiado. La misma media de proporciones en un grupo más amplio habría alcanzado sin duda significación estadística:

Suma de cocientes:	21,6642		
Animales valorables:	19		
Media:	1,14022		
		Desviación Típica:	0,40381
		Desviación Reducida (t):	1,5136 ($p = 0,15$)

Dicho de otra manera, el efecto potenciador de las metástasis parece ser ligeramente superior con 15 que con 5 Gy, pero sin diferencias estadísticamente significativas entre ellos, ni cada Grupo de dosis por sí mismo.

3.2.1.3.- Grupos de intervalo .-

Se pretende en este apartado separar los animales según el intervalo de tiempo transcurrido entre el momento de la irradiación y el de la inoculación; en busca del periodo posterior a la radiación en que ésta mejor abre paso a la metástasis.

En orden cronológico el primer grupo sería el de 48 horas de intervalo radiación-inoculación. La diferencia, siempre a favor de un mayor número de metástasis en el pulmón irradiado, es relativamente amplia; sin alcanzar significación estadística:

Suma de cocientes:	12,00751		
Animales valorables:	10		
Media:	1,20075		
		Desviación Típica:	0,4768
		Desviación Reducida (t):	1,33144 (p = 0,2)

El grupo de siete días de intervalo también tiende hacia un mayor número de metástasis en el pulmón irradiado, si bien más modestamente y sin significación estadística:

Suma de cocientes:	17,25882		
Animales valorables:	16		
Media:	1,07868		
		Desviación Típica:	0,29519
		Desviación Reducida (t):	1,0661 (p = 0,3)

El grupo con 21 días de intervalo muestra una desproporción relativamente importante, como siempre a favor de mayor incidencia metastásica en el pulmón irradiado. De nuevo el número de efectivos compromete la significación estadística:

Suma de cocientes:	19,53001		
Animales valorables:	16		
Media:	1,22063		
		Desviación Típica:	0,56256
		Desviación Reducida (t):	1,56872 (p = 0,15)

El Grupo con 42 días de intervalo es el único de los presentados hasta ahora con la tendencia contraria. La media de proporciones es prácticamente uno:

Suma de cocientes:	13,9058		
Animales valorables:	14		
Media:	0,99327		
		Desviación Típica:	0,2005
		Desviación Reducida (t):	-0,12556 (p = 0,9)

El hallar un valor de virtualmente la unidad debe considerarse relevante. Ser éste el único Grupo sin tendencia, como era constante hasta ahora, a presentar mayor incidencia metastásica en el territorio irradiado orienta a que efectivamente, la predisposición a la metástasis por irradiación previa es un fenómeno recortado en el tiempo, que entre las tres y las seis semanas perdería efectividad.

De hecho, si se consideran como grupo los restantes 42 individuos, los que tuvieron dos, siete ó veintiún días de intervalo, la diferencia es significativa a favor del pulmón irradiado:

Suma de cocientes:	48,79635	
Animales valorables:	42	
Media:	1,16182	
		Desviación Típica: 0,44943
	Desviación Reducida (ϵ):	2,33342 (p = 0,018)

3.2.1.4.- Grupos de dosis e intervalo .-

Por último, se van a presentar los resultados en su forma más precisa, cada Grupo como tal y por tanto, los animales evaluados en cada conjunto son idénticos entre sí, tanto en dosis como en intervalo. Su análisis, grupo por grupo es el siguiente:

Grupo: Dosis 5 Gy. Intervalo 2 días.

Suma de cocientes:	4,883	
Animales valorables:	4	
Media:	1,22075	
		Desviación Típica: 0,33173
	Desviación Reducida (t):	1,33092 (p = 0,3)
Grupo: <u>Dosis 15 Gy. Intervalo 2 días.</u>		

Suma de cocientes: 7,12451

Animales valorables: 6

Media: 1,18742

Desviación Típica: 0,58536

Desviación Reducida (t): 0,78426
($p = 0,5$)

Grupo: Dosis 5 Gy. Intervalo 7 días.

Suma de cocientes: 10,03269

Animales valorables: 9

Media: 1,11474

Desviación Típica: 0,33089

Desviación Reducida (t): 1,0403
($p = 0,3$)

Grupo: Dosis 15 Gy. Intervalo 7 días.

Suma de cocientes: 7,22613

Animales valorables: 7

Media: 1,0323

Desviación Típica: 0,25962

Desviación Reducida (t): 0,3292
($p = 0,7$)

Grupo: Dosis 5 Gy. Intervalo 21 días.

Suma de cocientes:	12,216	
Animales valorables:	10	
Media:	1,22164	
		Desviación Típica: 0,67179
	Desviación Reducida (t):	1,04334 (p = 0,35)

Grupo: Dosis 15 Gy. Intervalo 21 días.

Suma de cocientes:	7,31356	
Animales valorables:	6	
Media:	1,21893	
		Desviación Típica: 0,37025
	Desviación Reducida (t):	1,44837 (p = 0,2)

Grupo: Dosis 5 Gy. Intervalo 42 días.

Suma de cocientes:	13,9058	
Animales valorables:	14	
Media:	0,99327	
		Desviación Típica: 0,2005
	Desviación Reducida (t):	-0,12556 (p = 0,9)

Al ser grupos con pocos efectivos, ninguno alcanza significación estadística. De su análisis en conjunto sí que se confirma una apreciación

que ya adelantada en la lectura por intervalos radiación-inoculación: en todos los grupos existe preferencia a la metástasis en el pulmón irradiado, excepto de nuevo en el de 42 días de intervalo. Esto redundante en la impresión inicial de que, como fenómeno limitado en el tiempo, los cambios inducidos por radiación que favorecen la metástasis, dejan de actuar en un plazo que debe estar entre los 25 y los 40 días.

El resto de los grupos no muestran apuntes relevantes. Todos propenden a un modesto incremento de metástasis por radiación pero ninguna combinación dosis-intervalo pondera especialmente en este aspecto. Las diferencias observadas, hasta un 22 %, son comparables a las de otras agrupaciones de apartados anteriores.

3.2.2.- Hallazgos microscópicos .-

La observación microscópica de los pulmones metastatizados, puso de manifiesto la presencia de numerosas metástasis de diferente tamaño, constituidas por acúmulos de células melánicas entre las que se observa escaso estroma. Para todos los grupos y situaciones, los focos tienden a predominar en lechos peribronquiales o subpleurales.

La presentación peribronquial se inicia por pequeños nidos celulares, subyacentes al epitelio respiratorio bronquial e íntimamente relacionados con los vasos que discurren en el territorio (Figuras 15 y 16). Conforme los nidos incrementan su tamaño, dan lugar a masas en estrecha aposición con el epitelio bronquial (Figura 17), en ocasiones siguiendo todo su recorrido y rodeándolo a modo de manguito (Figura 18).

La afectación subpleural, compromete el área pulmonar de esta localización (Figura 19), dando también origen a nidos y masas de diferentes dimensiones. Ocasionalmente se observan grandes masas neoplásicas con fenómenos de necrosis (Figura 20).

En general, los nidos neoplásicos están constituidos por melanocitos atípicos, dotados de núcleos ovoides o pleomórficos, frecuentemente con invaginaciones citoplásmicas, uno o varios nucleolos prominentes y cromatina desespiralizada. Las figuras de mitosis son abundantes. En los citoplasmas celulares se pone de manifiesto la presencia de melanosomas o

Figura 15
Nidos neoplásicos subyacentes al epitelio bronquial. H E.

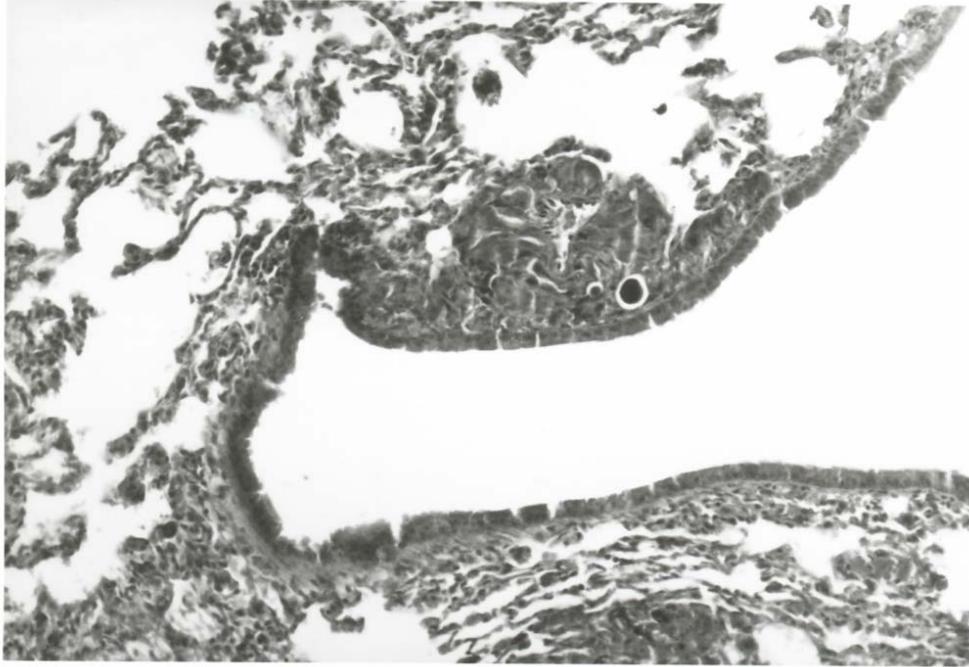


Figura 16
Células con pigmento melánico intracitoplásmico. H. E.

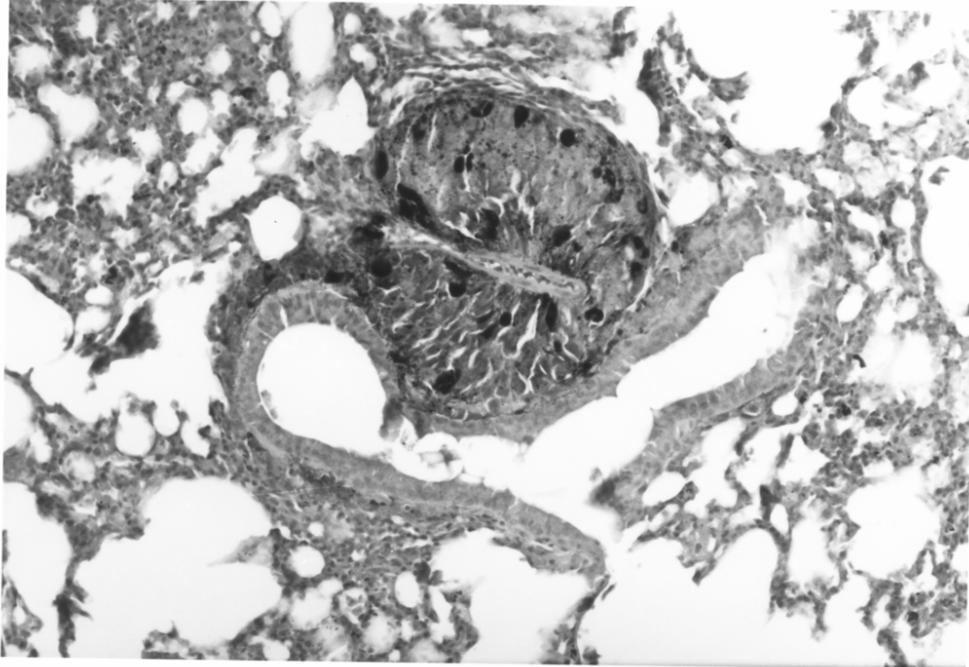


Figura 17
Masa neoplásicas relativamente voluminosas
En torno a estructuras bronquiales. H. E.

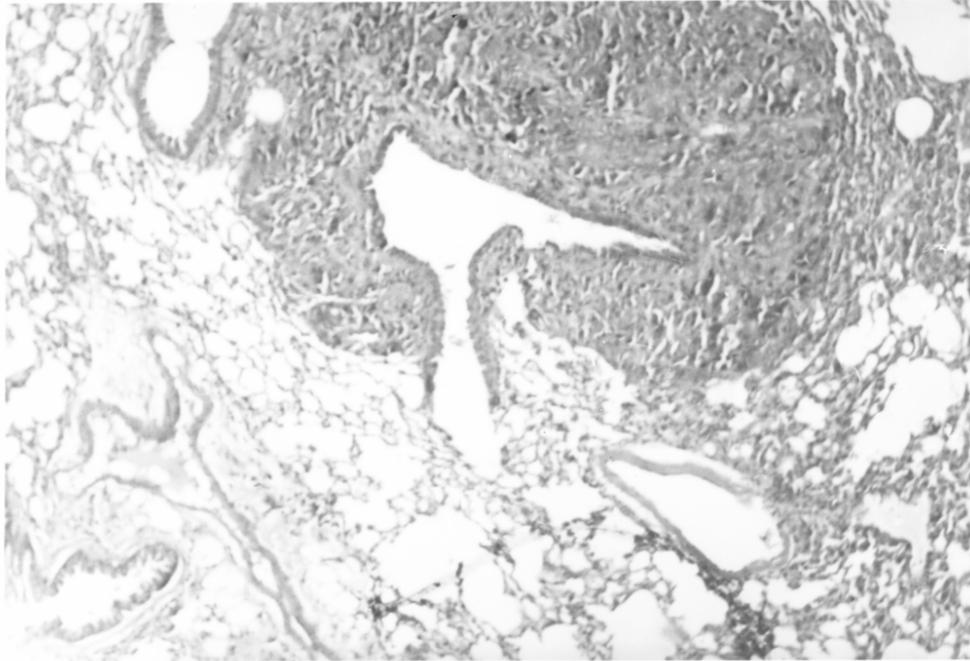


Figura 18
Disposición en manguito de la masa tumoral
Alrededor del bronquio. H. E.

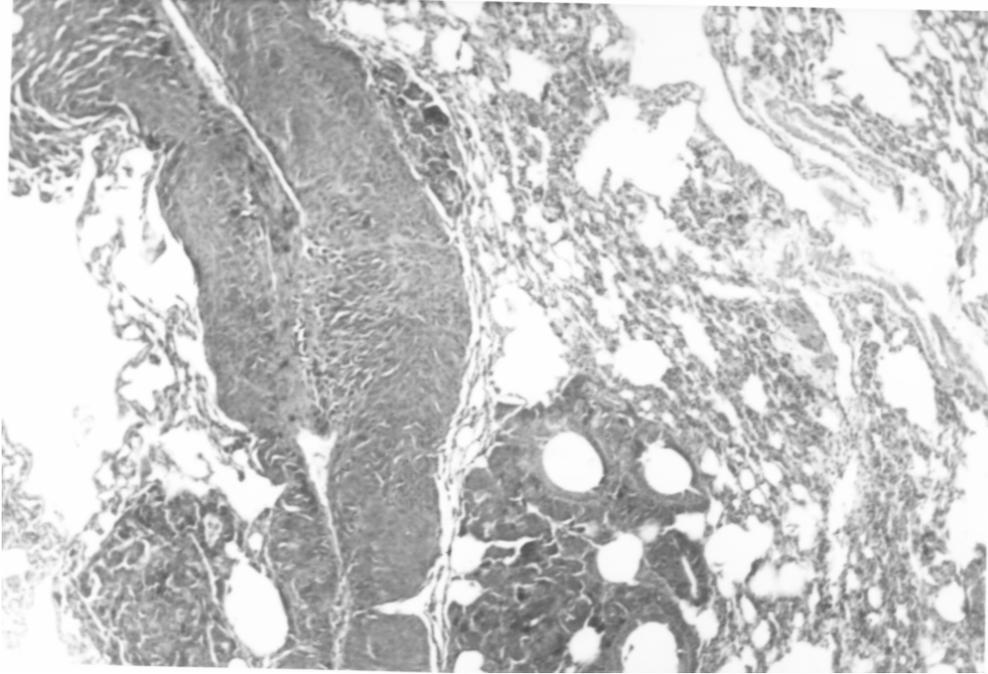


Figura 19
Nido neoplásico de localización subpleural. H. E.

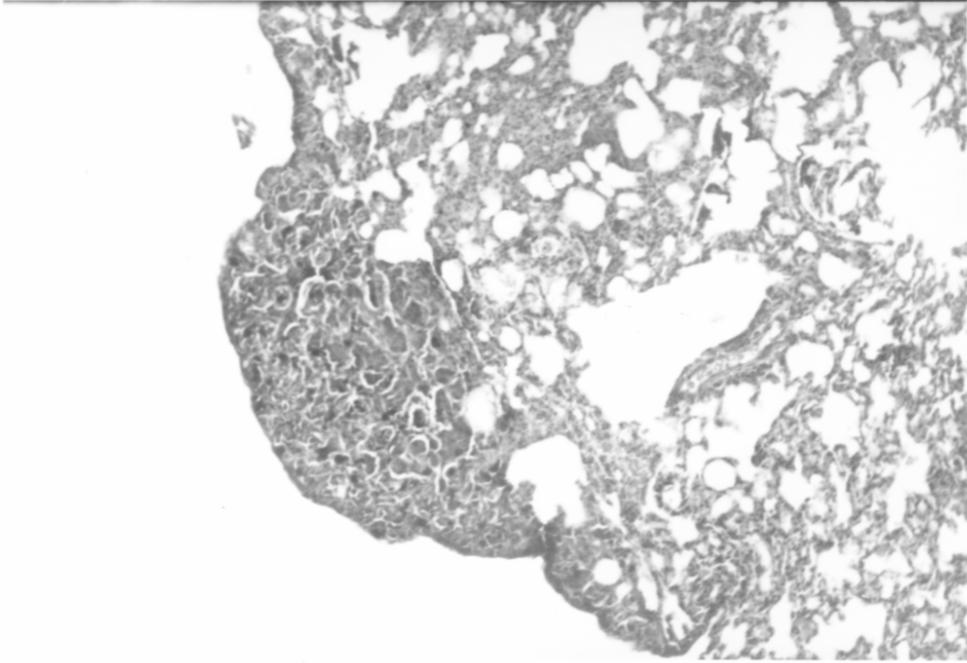


Figura 20
Masa voluminosa metastásica en el pulmón;
Con fenómenos de necrosis. H. E.



premelanosomas. Se evidencia también relación de vecindad entre los elementos neoplásicos y capilares sanguíneos neoformados, de finas paredes endoteliales, en ocasiones con células fenestradas. En el estroma hay abundantes melanófagos y variable infiltrado linfohistiocitario.

El estudio comparativo entre los pulmones irradiados y no irradiados, revela escasas diferencias entre las características de los focos metastásicos. En los tejidos sometidos a radiación se observa un aumento del infiltrado inflamatorio y signos reactivos. Dicho infiltrado está constituido por linfocitos, macrófagos y algunas células plasmáticas. Ni la dosis recibida, ni el intervalo transcurrido entre la irradiación y el sacrificio influyeron aparentemente en la cantidad o características de estos hallazgos.

3.3.- TAMAÑO DE LAS METÁSTASIS .-

Explicado en la Introducción el “Efecto Lecho Tumoral” (“T.B.E.”), resulta atractivo aventurar la hipótesis de que en el terreno de las metástasis vendría a ocurrir lo mismo que en un lecho que ha recibido radiación antes de ser inoculado directamente:

- 1.- Se precisa menos carga tumoral para la inoculación (lo que vendría a estar representado por originarse mayor número de metástasis con la misma inoculación endovenosa).
- 2.- El tumor establecido crece más lentamente.

Para dilucidar esta última posibilidad se ordenaron las 5.826 metástasis pulmonares por tamaños. Como puede verse en la Tabla X(a), los nódulos metastásicos son más frecuentes cuanto menor es su dimensión. Además, la siembra en el pulmón irradiado no parece presentar un tamaño menor; antes bien al contrario, la única medida en la que el pulmón control supera al sometido a radiación es en metástasis mínimas.

Cuando se agrupan en sólo dos categorías [Tabla X(b)] sucede otro tanto, el pulmón prueba supera al control en número de focos metastásicos de buen tamaño, pero los de pequeñas dimensiones son más frecuentes en el territorio protegido, sin llegar a la significación estadística.

Podría ocurrir que una dosis de 5 Gy fuera insuficiente para desencadenar retraso en el crecimiento como manifestación de un Efecto Lecho. Recuérdese (Figura 3) que con estos niveles de dosis no se alcanzan

TABLA X

Relación del Total de Metástasis Pulmonares
distribuidas por Tamaños

a.- TODOS LOS TAMAÑOS:

	< 0,5	0,5 - 1	1,1 - 2	2,1 -3	3,1 - 4	4,1 - 5	5,1 - 6*	TOTAL
P. Irradiados	1663	1095	135	44	19	2	0	2958
P. No Irrad.	1680	1011	115	50	10	1	1	2868
Total	3343	2106	250	94	29	3	1	5826

*Tamaños en milímetros, según norma de protocolo Apartado 2.5.2. Punto 6.

$p = 0,23$

b.- AGRUPADOS:

	< 0,5	$\geq 0,5$	TOTAL
P. Irradiados	1663	1295	2958
P. No Irrad.	1680	1188	2868
Total	3343	2483	5826

$p = 0,069$

respuestas máximas. Así pues, se separaron los nódulos que asentaban sobre animales que habían recibido 15 Gy, lo que se expone en la Tabla XI (a). El sorprendente resultado es que la desigualdad se hace más acusada, pero a favor de un mayor tamaño en el pulmón irradiado, hasta incluso resultar una diferencia significativa. Incrementa notablemente la significación el valor 14 frente a 1 en la categoría 4 mm, por lo que es fácil ampliar aún más la diferencia si se agrupan como se hace en la Tabla XI (b).

Otra modo de abordar el problema de si la metástasis consigue un crecimiento más o menos rápido en el pulmón irradiado o en el contralateral, es calcular su tamaño medio aproximado. La manera de hacerlo será tomar los datos de la Tabla X (a) y multiplicar el número de nódulos de cada categoría dimensional por el tamaño en el que está encuadrada. A las inmensurables se les aplicará el valor 0,3 mm; las otras se extrapolarán al valor medio de su rango. La suma de los productos se divide entre el número total de metástasis y el resultado será el tamaño promedio:

Para las del Pulmón irradiado:

$$\frac{(1663 \times 0,3) + (1095 \times 0,75) + (135 \times 1,5) + (44 \times 2,5) + (19 \times 3,5) + (2 \times 4,5)}{2958} = 0,577468\text{mm}$$

Para las del Pulmón no Irradiado:

$$\frac{1946}{2868} = 0,559536 \text{ mm}$$

Es decir, en contra de lo que cabría esperar si hubiera un retraso de crecimiento en el territorio irradiado, el tamaño medio de la metástasis en el pulmón sometido a radiación es ligeramente superior. Dado el carácter aproximado de las medidas no parece aconsejable deducir una significación estadística paramétrica.

TABLA XI

Relación de Metástasis Pulmonares en Grupos de 15 Gy
Distribuidas por Tamaños

a.- TODOS LOS TAMAÑOS:

	< 0,5	0,5 - 1	1,1 - 2	2,1 -3	3,1 - 4	4,1 - 5	5,1 - 6*	TOTAL
P. Irradiados	702	565	65	22	14	0	0	1368
P. No Irrad.	640	433	47	25	1	0	0	1146
Total	1342	998	112	47	15	0	0	2514

Tamaños en milímetros, según norma de protocolo Apartado 2.5.2. Punto 6.

$p = 0,0043$

b.- AGRUPADOS:

	≤ 3	> 3	TOTAL
P. Irradiados	1354	14	1368
P. No Irrad.	1145	1	1146
Total	2499	15	2514

$p = 0,0024$

Si como se hizo en el caso anterior, los datos se reducen a los aportados por los grupos de más dosis (15 Gy) los resultados son:

Para las de Pulmón Irradiado:

$$\frac{835,85}{1368} = 0,611001 \text{ mm.}$$

Para las de Pulmón no Irradiado:

$$\frac{653,25}{1146} = 0,570026 \text{ mm.}$$

El tamaño va siempre a favor de las metástasis que crecen en territorio irradiado, lo que va en contra de un Efecto Lecho en cuanto a retraso de crecimiento.

Una última manera de calcular si las diferencias de tamaño entre pulmón irradiado y control son significativas es tratarlas como series aparejadas. Para cada animal se calcula la media de tamaño de la metástasis en el pulmón que había recibido radiación (TmP.R.) y lo mismo en el que no (TmP.nR). Se resta una cifra de otra y la diferencia debería ser cero. Cotejando las diferencias (TmP.R.- TmP.nR.) en los 56 animales valorables se obtiene:

Suma de Diferencias:	0,4895
Animales valorables:	56
Media:	0,008741

La suma de las diferencias, positivas y negativas, adopta un valor por encima de cero, indicando que las metástasis alcanzan por término medio mayor dimensión en el pulmón previamente irradiado.

3.4.- OTROS TERRITORIOS .-

Para un cumplido aprovechamiento de la serie, es conveniente y hasta necesario explotar toda la información que ésta pueda ofrecer, aunque algunos datos no representen el objetivo central del trabajo de investigación. Con tal intención y como se expuso en el Apartado 2.5.1. se practicó a cada animal una disección reglada, registrando cualquier indicio patológico o peculiar, estuviera o no en relación con el melanoma inyectado.

Los hallazgos no oncológicos se redujeron a una depilación cutánea circunscrita a los campos de radiación en aquellos animales sometidos a mayor dosis (Figura 21), a la que no se dio otra importancia que sancionar la precisión del sistema de irradiación, ya que en todos los casos la alopecia dibujaba con perfección la línea media y los demás límites teóricos del campo. Se detectaron además ocasionales erosiones por mordedura que no se consideraron motivo de exclusión del estudio.

3.4.1.- Infiltración extrapulmonar .-

Respecto a los datos en este apartado es necesario aclarar que los efectivos totales sobre los que están calculados difieren de los utilizados anteriormente en el apartado de metástasis pulmonares. Para la afectación pleural y de bazo contaban todos los animales que desarrollaron algún tipo de metastatización, incluidos los grupos control, los excluidos antes por bajo número de metástasis pulmonares e incluso un animal que tenía una metástasis en pleura pero fue imposible detectárselas en pulmón. Con ello el total para calcular el porcentaje fueron 75 ejemplares. Para la infiltración de la cola y las metástasis linfáticas se consideraron todos los que habían tenido contacto con el tumor, es decir, los 86 sacrificados.

3.4.1.1.- Localizaciones .-

La pleura fue con mucho el tejido más frecuentemente metastatizado después del pulmón. Desgraciadamente no se dispone de una valoración comparativa entre el lado expuesto a radiación y el control, porque no se contaba con este dato cuando se diseñó el estudio y porque de todas formas hubiera sido difícil plantear un sistema de cuantificación objetiva de las metástasis pleurales. Como puede verse en la Tabla XII en más de las tres cuartas partes de los animales se detectó tumor sobre este tejido en mayor

Figura 21
Depilación cutánea por radiación



TABLA XII

Infiltración de otros órganos o tejidos

Localización	N° de casos	Distribución*(Grado)		
		(1)	(2)	(3)
• Metástasis Pleurales	58 (77 %)	25	17	16
• Metástasis Linfáticas	15 (17 %)	7	8	-
• Metástasis en Bazo	5 (6,7 %)	4	0	1
• Infiltración de la Cola	31 (36 %)	12	6	13

* Según Tabla semicuantitativa de Apartado 2.5.2. Punto 7.-

o menor grado, por lo que se le puede considerar casi tan propenso a las metástasis de melanoma B16-F10 como el pulmón. Los ocho animales de los grupos control no se comportaron de modo distinto, siete de ellos mostraron metastatización pleural llegando a grado 2 en dos casos y grado 3 en otros dos, todo ello a pesar de no haber recibido irradiación previa.

La presencia de ganglios hiliares pulmonares o mediastínicos teñidos de melanoma fue un hallazgo frecuente, pero difícil de reseñar por su confusión con implantes en la pleura mediastínica, de modo que las metástasis linfáticas se anotaron por separado sólo en el caso de ser extratorácicas. De los 15 casos referidos (Tabla XII), uno corresponde a ilíaca externa y los 14 restantes a nódulos paraórticos. El lugar típico de detección se encontraba a nivel de la salida de la mesentérica o caudal a ésta (Figura 22), por lo que parece poco probable que la procedencia sea por flujo retrógrado desde ganglios mediastínicos. Su origen a partir de la infiltración en el punto de inoculación se debatirá más adelante.

El bazo fue la única víscera metastatizada a parte del pulmón, si bien su incidencia fue escasa (Tabla XII). La hipótesis de que su afectación viniera mediatizada por estar incluido este órgano en el campo de radiación hemitorácica derecha es poco sostenible, habida cuenta de que los cinco animales afectados pertenecían a los grupos 0.3.; 0.6. y 5.2.D. un caso cada uno y 5.3.I. en dos casos.

La presencia de melanoma en la cola de algo más de un tercio de los animales inoculados, es indudable que se debe a pequeñas extravasaciones en el momento de la inyección intravenosa. No se consideró este hallazgo motivo de exclusión, ya que las condiciones del protocolo de inoculación pueden calificarse de bastante estrictas (Ver Apartado 2.4.3.) y por otra parte el diseño del experimento no compara unos sujetos con otros sino dos pulmones que han recibido la misma inoculación.

3.4.1.2.- Correlaciones .-

Tanto por su posible relación con las metástasis pulmonares como por sí mismas, parece interesante explorar desde un punto de vista estadístico las correspondencias de unas afectaciones con otras. A ello se dedicarán los siguientes apartados.

Figura 22
Metástasis en ganglio paraórtico



3.4.1.2.1.- Metástasis pleurales y pulmonares .-

La observación de las necropsias a lo largo de la fase experimental del trabajo, fue poniendo de manifiesto que un alto número de metástasis pulmonares llevaba aparejada una intensa infiltración pleural. Llevados los datos al terreno estadístico se confirma tal impresión con un alto nivel de significación (Tabla XIII); no en balde todos los sujetos que presentaban afectación pleural en grados 2 ó 3 tenían más de 25 nódulos pulmonares, en tanto que ninguno de los que carecían de aquella presentaba más de 50 implantes en pulmón.

3.4.1.2.2.- Infiltración en rabo y metástasis ganglionares .-

Cabe la posibilidad de que los ganglios metastásicos encontrados en la región paraórtica de algunos animales procedan de la infiltración creada en el rabo al proceder a la inoculación. Si esto fuera cierto, debería detectarse cierta correspondencia entre un atributo y otro.

En la Tabla XIV (a) y (b) puede comprobarse que esta relación no parece existir. Siete, casi la mitad de los animales con metástasis linfáticas, no mostraban melanoma en la cola. Los ocho que sí tenían, parecen distribuirse de modo bastante homogéneo en las distintas categorías de infiltración de rabo.

3.4.1.2.3.- Nódulos en rabo y metástasis pulmonares .-

Asumido que las infiltraciones de la cola proceden de extravasaciones en el momento de la inoculación, se plantea la posibilidad de que la pérdida de esta cantidad de células venga en detrimento del número de metástasis pulmonares obtenidas.

Cuando se confrontan ambos hallazgos, como se hace en la Tabla XV (a), (b) y (c), no se confirma tal teoría. Ni los casos menos abundantes en metástasis pulmonares tienden a presentar mayor afectación del rabo, ni aquéllos en los que esta infiltración existía o era más conspicua propenden a desarrollar menos metástasis.

TABLA XIII

Correlación de metástasis pulmonares y pleurales

Pulmonares \ Pleurales*	0	1	2	3	TOTAL
De 0 a 10	10	5	0	0	15
De 11 a 25	4	6	0	0	10
De 26 a 50	3	4	0	1	8
De 51 a 100	0	3	4	2	9
De 101 a 200	0	6	8	4	18
Más de 200	0	1	5	9	15
TOTAL	17	25	17	16	75

* Según Tabla semicuantitativa de Apartado 2.5.1. Punto 7.

$p < 0,00001$

TABLA XIV

Correlación de infiltración en rabo y ganglios metastásicos.

a.- DISTRIBUIDOS

Inf.Rabo* Metást.Ganglionares*	0	1	2	3	TOTAL
0	48	8	5	10	71
1	3	3	1	0	7
2	4	1	0	3	8
TOTAL	55	12	6	13	86

* Según Tabla semicuantitativa de Apartado 2.5.1. Punto 7.

$p = 0,22$

b.- AGRUPADOS.

Inf.Rabo* Metást.Ganglionares*	0	1, 2 y 3	TOTAL
0	48	23	71
1 y 2	7	8	15
TOTAL	55	31	86

* Según Tabla semicuantitativa de Apartado 2.5.1. Punto 7.

$p = 0,13$

TABLA XV

Correlación de infiltración de rabo y metástasis pulmonares

a.- DISTRIBUIDOS

Met.Pulmonares \ Inf.Rabo*	0	1	2	3	TOTAL
De 0 a 10	10	0	2	3	15
De 11 a 25	4	2	1	3	10
De 26 a 50	6	0	0	2	8
De 51 a 100	7	2	0	0	9
De 101 a 200	7	5	2	4	18
Más de 200	12	2	1	0	15
TOTAL	46	11	6	12	75

* Según Tabla semicuantitativa de Apartado 2.5.1. Punto 7.

$p = 0,26$

b.- AGRUPADAS

Met. Pulmonares \ Inf.Rabo*	0	1 ó 2 ó 3	TOTAL
De 0 a 10	10	5	15
De 11 a 25	4	6	10
De 26 a 50	6	2	8
De 51 a 100	7	2	9
De 101 a 200	7	11	18
Más de 200	12	3	15
TOTAL	46	29	75

* Según Tabla semicuantitativa de Apartado 2.5.1. Punto 7.

$p = 0,09$

3.4.1.2.4.- Metástasis linfáticas y pulmonares .-

Los ganglios linfáticos han sido el órgano extratorácico más frecuentemente metastatizado. Si se compara su afectación con la de pulmón (Tabla XVI), no se concluye correlación positiva ni negativa, como habría ocurrido si las metástasis ganglionares procedieran de una siembra a pulmón especialmente profusa o si los animales que las presentaron hubieran sido inoculados con alguna subpoblación de melanoma con características fenotípicas especiales en cuanto a potencial metastásico.

TABLA XVI

Correlación de ganglios metastásicos y metástasis pulmonares

a.- DISTRIBUIDOS

Met. Ganglionares*	0	1	2	TOTAL
Met. Pulmonares				
De 0 a 10	14	1	0	15
De 11 a 25	7	1	2	10
De 26 a 50	7	1	0	8
De 51 a 100	8	0	1	9
De 101 a 200	13	2	3	18
Más de 200	13	2	0	15
TOTAL	62	7	6	75

* Según Tabla semicuantitativa de Apartado 2.5.1. Punto 7.

p = 0,56

b.- AGRUPADAS

Met. Ganglionares*	0	1 ó 2	TOTAL
Met. Pulmonares			
De 0 a 10	14	1	15
De 11 a 25	7	3	10
De 26 a 50	7	1	8
De 51 a 100	8	1	9
De 101 a 200	13	5	18
Más de 200	13	2	15
TOTAL	62	13	75

* Según Tabla semicuantitativa de Apartado 2.5.1. Punto 7.

p = 0,52

IV.- DISCUSIÓN .-

Puede decirse que los resultados hasta aquí mostrados responden de manera bastante concluyente a las cuestiones planteadas de inicio. El que así lo hagan y su fiabilidad debe basarse en una metodología lo bastante apurada. A su crítica se dedicará la primera parte de la discusión.

4.1.- METODOLOGÍA .-

El elemento crucial del método de experimental utilizado ha sido la irradiación hemitorácica. De ella se deriva el que cada sujeto cuente con su prueba (pulmón irradiado) y su propio control (pulmón contralateral) y por ende un sistema de evaluación de resultados basado en tales parejas. Dicho eso, es fácil inferir dos premisas importantes:

1°.- Cualquier contingencia que pudiera acarrear una disparidad en cuanto a animales, anestesia, inoculación, etc., queda compensada de base por poseer cada pulmón experimental su propio control, que ha estado expuesto a idénticas contingencias.

2°.- El único elemento diferencial entre el pulmón sometido a experimento y su control es la radiación recibida.

Por tal motivo, el método de irradiación y su dosimetría ha de ser contemplado de manera especialmente escrupulosa.

4.1.1.- Dosimetría .-

De la fuente de radiación utilizada, un tubo de rayos X, es característica la constancia en cuanto a tasa de dosis. No es sorprendente la escasa variación en las sucesivas dosimetrías realizadas con cámara de ionización.

Atendiendo a las medidas de homogeneidad efectuadas para el sistema de irradiación de los ratones (Figura 7) puede llamar la atención la aparente subdosificación de los dosímetros de las ventanas pulmonares con respecto a la dosis en el centro: entre 25 a 28 frente a 31. Es tentador corregir la dosis prescrita por ese factor, en la idea de que la disparidad pueda deberse a una caída a borde de campo y mayor distancia foco piel. Sin dejar de haber algo de verdad en eso, mucho mayor ha de ser la contribución de la retrodispersión. En efecto, los dosímetros situados en las ventanas pulmonares se encuentran estrictamente “en aire”, en tanto que el resto se sitúan sobre el plomo, participando así de su radiación dispersa. Que ésta sea la principal razón de la leve disparidad lo abona la lectura de los dosímetros situados en posición Norte y Este a la misma distancia radial del centro que los de las ventanas pero contribuidos por retrodispersión. Los valores obtenidos se acercan a 30, casi lo mismo que el central, 31 y bastante más que los situados en aire.

Las medidas en cadáver de ratón (Figura 8), sirvieron para corroborar tanto la homogeneidad de la dosis administrada como la protección del pulmón contralateral. Aun con las limitaciones de la interposición de un plástico y la colocación a ciegas de los dosímetros, las dosis obtenidas fueron coherentes entre sí.

Es conocido que el lóbulo retrocardíaco del pulmón derecho de los ratones, sobrepasa en su extremo la línea media¹³¹. Es evidente que con el sistema de irradiación utilizado, esta pequeña cantidad de pulmón ha actuado en sentido contrario al deseado, quedó protegido cuando se irradiaba el hemitórax derecho y expuesto cuando el izquierdo. Sin embargo, dada la ínfima cantidad de tejido pulmonar que viene a suponer, no se ha considerado con suficiente relevancia como para alterar los resultados.

Por último, cabe citar que el sistema de irradiación se mostró sumamente efectivo en cuanto a inmovilización. En ningún animal se detectó desplazamiento significativo, ni en las pruebas realizadas, ni a lo largo del experimento. La depilación en los grupos de 15 Gy, dibujando con perfección el campo planeado (Figura 21), corrobora la observación.

4.1.2.- Evaluación de resultados .-

Del método de cuantificación de metástasis poco puede decirse salvo que se ejecutó de la manera más precisa e imparcial posible. La normalización del recuento —multiplicar el valor de cada pulmón izquierdo por el factor 2,27— sí merece alguna consideración. Puesto que la introducción de este factor se llevó a cabo para sacar luego una proporción, es evidente que no existe una magnificación de la muestra; para el caso lo mismo hubiera dado dividir los pulmones derechos por la misma cifra. Otra cuestión es que, a pesar de los datos aportados por los animales control (Tabla VIII), la relación de volumen pulmón derecho / izquierdo fuera ligeramente mayor o menor a 2,27; ello sí llevaría a una desviación en los cocientes y por tanto en los resultados. Pero contra esta posibilidad, remota por otra parte, también existe protección. Al haberse alternado grupos de irradiación derechos e izquierdos, la proporción de animales que ofrecieron un pulmón u otro quedó bastante compensada: 29 y 27 respectivamente. De este modo, si se hubiera producido por ejemplo una minimización de los pulmones izquierdos porque el valor 2,27 fuera demasiado bajo, en aproximadamente la mitad de los ratones habría ido a favor del pulmón irradiado y en la otra mitad en contra, compensándose así la improbable desviación. Cabe añadir que la proporción de metástasis pulmón derecho / izquierdo para los grupos de radiación fue de 2,16; una cifra bastante cercana al valor utilizado, lo que le confiere credibilidad.

La comparación de cada sujeto consigo mismo ha permitido utilizar un método estadístico muy potente. Basta advertir que sumadas primero todas las metástasis para pulmón irradiado y no irradiado y efectuada luego la proporción, el valor obtenido es de 1,031 (Apartado 3.1.2.). Esta cifra, además de primar unos animales sobre otros en razón de su número de metástasis, hubiera denegado cualquier significación estadística. La elaboración de un cociente para cada sujeto sí ha permitido detectar las diferencias.

Los tamaños reseñados para las metástasis pulmonares pueden no ser reales. Así ha de ser si su dimensión en milímetros se extrapoló a un valor intermedio del intervalo o si para calcular el tamaño medio, las inmensurables se homogeneizaron a 0,3 mm (Apartado 3.3.). No son reales pero sí representativos; si lo que se desea como en este caso es contrastar las del tejido irradiado y las del normal, la comparación es metodológicamente impecable.

4.2.- HALLAZGOS .-

4.2.1.- Número de metástasis pulmonares .-

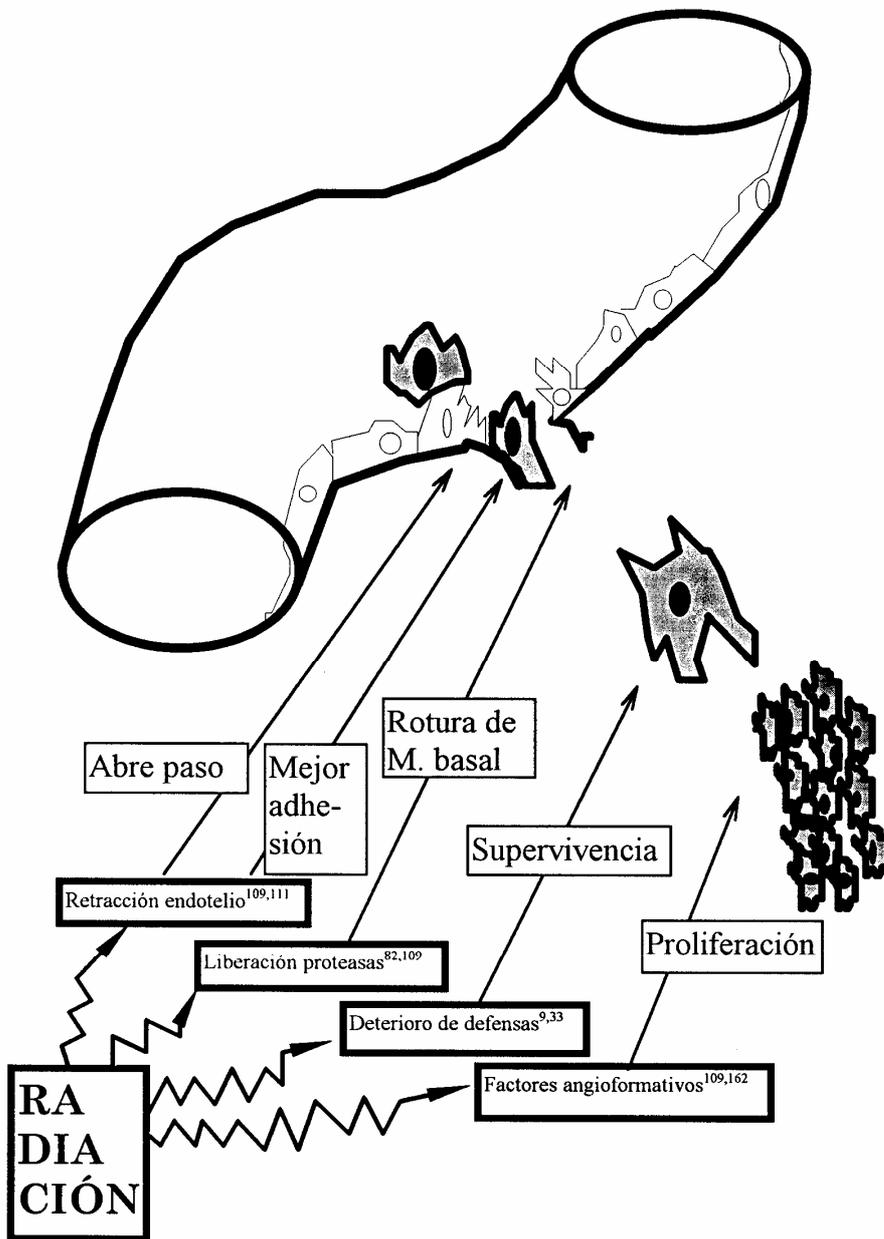
Los cocientes Pulmón Irradiado / Pulmón no Irradiado obtenidos en la población expuesta y su análisis estadístico, muestran de manera inequívoca una mayor frecuencia de metástasis en el pulmón que previamente había recibido radiación. Tal es la única conclusión posible a la vista de su significación estadística y de la constancia de los resultados.

Es destacable que esta acrecencia en el rendimiento metastásico, aun relativamente modesta, se mantiene con obstinación en la práctica totalidad de los grupos. Los valores 1,1 - 1,2 en la media de cocientes hablan de un 15 ó 20 % de aumento en la eficiencia del fenómeno metastásico para la mayoría de circunstancias analizadas; más que lo reseñado por autores que encontraban diferencias negativas o nulas y bastante menos que lo señalado por otros cuyos incrementos alcanzaban niveles exponenciales (Tabla VI). Respecto a los primeros cabe aventurar que una diferencia mínima puede pasar desapercibida con determinados modelos y métodos estadísticos. En cuanto a los segundos, no es descartable encontrar notables variaciones dependiendo de la estirpe tumoral utilizada.

Los mecanismos íntimos por los que la radiación dejaría al tejido pulmonar especialmente predispuesto para captar o desarrollar metástasis, pueden sólo abordarse en el terreno de la especulación. De entrada, no es sorprendente tal predisposición, si se piensa que un tejido irradiado desarrolla fenómenos pseudoinflamatorios y la inflamación aun con una base etiológica inespecífica es capaz de potenciar la metástasis¹¹⁷. Sistemas implicados en la cascada metastásica, abordada en la primera parte de la Introducción, aportan numerosas sugerencias, que se plasman en la Figura 23. La totalidad de esos mecanismos podría encuadrarse en uno de estos dos capítulos:

- 1.- Factores que pueden incrementar la retención de células por el pulmón. Entre ellos habría que incluir especialmente la acción de la radiación sobre la microcirculación.
- 2.- Factores que pueden incrementar las posibilidades de desarrollar colonia por una célula retenida. Entre ellos los probablemente más sustantivos serían los relacionados con la angiogénesis.

Figura 23 .-
Posibles mecanismos por los que la irradiación
previa puede favorecer las metástasis.



En cuanto al primer punto, es importante destacar que la radiación y incrementa la permeabilidad e induce la retracción física de las células endoteliales^{48,109,171}. Una vez expuesta, la riqueza de la basal en y para los receptores específicos la convierte en un sustrato adhesivo mucho mejor que la superficie endotelial para el anclaje de una célula tumoral circulante.

Pero además, un paso más allá en la cascada, las radiaciones ionizantes pueden favorecer la permeación de la membrana basal. Al menos “in vitro”, las células endoteliales son inducidas por irradiación a liberar enzimas degradativas como la heparanasa¹⁰⁹. Tanto la retracción como la secreción de proteasas ofrecen ejemplos de cómo las células endoteliales alteradas por radiación pueden colaborar en lugar de entorpecer la culminación de algunos pasos de la metástasis.

Tras algunas etapas como la de motilidad o resistencia a defensas, sobre las que pocos indicios se pueden aportar, aun cuando no se descarte una intervención de los agentes físicos para su ejecución, es durante la fase de desarrollo de la colonia donde más probablemente la irradiación puede haber intervenido para crear un microentorno favorable a la célula metastatizante. Tanto en los primeros pasos de la proliferación como para la posterior generación de vasos, una aportación fundamental ha de provenir de las citoquinas. Estudios bioquímicos desarrollados con fines tan distintos como el estudio del daño pulmonar tardío radioinducido^{46,134} (Apartado 1.2.1.1.1.), pueden dar luz sobre el desarrollo local de metástasis por la participación de algunos de estos mediadores como factores de crecimiento y angiogénicos^{23,84,138,143} (Apartado 1.1.1.7.). Concretamente el FGF y el PDGF, que son liberados por radiación, son conocidos mediadores de la angiogénesis, lo que da carta de verosimilitud a su concurso en la promoción de metástasis en territorio irradiado.

4.2.1.1.- Según dosis .-

La discriminación de los animales en grupos de dosis no ofrece diferencias relevantes. Como en casi todas las agrupaciones, se repiten diferencias de un 10-15% a favor de los órganos irradiados. El valor relativamente más alto en los que recibieron 15 Gy (1,14 frente a 1,11) no parece suficiente para aseverar una relación dosis-respuesta entre los dos niveles probados.

4.2.1.2.- *Según intervalo.-*

El dato por supuesto más llamativo al analizar las diferencias entre los distintos intervalos radiación-inoculación fue la ausencia de desviación en el grupo con 42 días de intervalo. De hecho, el valor del cociente PR / PnR tiende a la unidad, lo que indica una equiparación de ambos órganos, irradiado y control, en cuanto a receptividad metastásica. La segregación de estos sujetos para obtener en el resto una diferencia estadísticamente significativa (Apartado 3.2.1.3.) resulta un tanto artificiosa; pero la constancia de resultados en cualquier otra situación, sugiere que la alteración tisular que hace propender a las metástasis hacia el territorio irradiado es autolimitada y deja de tener efecto a las tres o seis semanas tras la agresión radiológica.

El Efecto Lecho, que debe mantener relaciones de parentesco con el fenómeno aquí estudiado, es también una condición recortada en el tiempo¹⁰¹. Tanto si ambos se originan por alteraciones bioquímicas en el medio, como si existe un componente de daño celular, es lógico suponer que el primero tienda a autoregularse y el segundo a repararse como efecto agudo por radiación.

Las diferencias obtenidas entre los otros intervalos, sobre el 20% para los de dos y 21 días frente a algo menos del 10% para los de siete días, no parecen reflejar un fenómeno biológico sino variabilidad estadística. La comparación de los grupos separados por su dosis e intervalo tampoco ofrece datos relevantes, salvo la constancia de una desviación hacia el pulmón irradiado en todas las situaciones excepto en el intervalo 42 días.

4.2.2.- *Tamaño de las metástasis .-*

Uno de los hallazgos más sorprendentes del estudio ha sido la apreciación de un mayor tamaño de metástasis en el pulmón irradiado que en su control. La comparación de estos tamaños se ha realizado de cuatro maneras distintas:

- 1.- Comparación de proporciones PR / PnR en número de metástasis teniendo en cuenta: todas, sólo las mayores de 1 mm ó solo las mayores de 2 mm (Apartado 3.2.1.1.).
- 2.- Suma y agrupación en cuadro de tamaños, incluida la segregación por dosis (Tablas X y XI).

3.- Cálculo del tamaño medio de la metástasis en pulmones irradiados y no irradiados (Apartado 3.3.).

4.- Comparación en cada animal del tamaño medio de las metástasis de un pulmón frente a otro (Apartado 3.3.).

De las cuatro maneras el resultado ha sido siempre el mismo, las metástasis en el pulmón expuesto han sido mayores en tamaño.

El mayor crecimiento de las metástasis que se desarrollan en territorio irradiado va indudablemente en contra de un comportamiento clásico encuadrado en un Efecto Lecho (TBE) (Apartado 1.4.). En este caso, en lugar de un retraso en el crecimiento habría habido un mayor progreso. Un hallazgo tan inopinado merece comentario.

Una explicación sencilla sería el tipo histológico. Células tumorales de distintas estirpes, sarcomas frente a adenocarcinomas por ejemplo, presentan comportamientos diversos en cuanto a Efecto Lecho^{98,103}. Al no existir datos comparativos con el melanoma, es posible, aunque poco probable, que éste se comporte de manera contraria a otros tipos de tumor.

La presencia de un artefacto experimental tampoco es descartable. Podría haber ocurrido que por no dar suficiente tiempo de evolución, el retraso en el crecimiento no se hubiera producido aún en el momento de la observación. Los resultados paradójicos son frecuentes en la observación del Efecto Lecho, porque el resultado siempre depende del objetivo experimental propuesto. Así, si el planteamiento es comparar tumores cuando alcanzan una determinada medida, los hallazgos pueden variar dependiendo del tamaño elegido; si es en cuanto a tiempo transcurrido desde la inoculación también oscilarán según se opte por uno u otro plazo¹⁵. Un ejemplo es la lectura prematura; si en condiciones de TBE se observan los lechos poco después de su inoculación, puede parecer que ésta haya resultado infructuosa porque el retraso del crecimiento ha impedido que se haga observable¹⁰¹, falseándose así los resultados.

Pero existen otras explicaciones más atractivas para justificar el mayor crecimiento promedio en el pulmón irradiado. En el Apartado 4.2.1. se ha comentado que uno de los factores facilitadores para la metástasis en el territorio expuesto ha podido ser la abundancia de citoquinas con capacidad angiogénica. La angiogénesis es probablemente la clave para que una metástasis silente, sin crecimiento efectivo y subclínica, prolifere y gane volumen^{57,95}. Una hipótesis coherente sería que en el pulmón control, con un ambiente angiogénico más pobre, un alto porcentaje de metástasis hubiera tenido que detener su progresión al alcanzar 0,3-0,5 mm, dimensión máxima que pueden alcanzar en ausencia de neovasos^{50,66,127}. Los nódulos de este tamaño son perfectamente detectables

con el modelo experimental utilizado en esta tesis; como tales se han recogido y tabulado, menguando, si la hipótesis es cierta, la media de tamaño en el pulmón no irradiado. Ni que decir tiene que de acuerdo con el mismo razonamiento, en el pulmón sometido a radiación habría ocurrido lo contrario, más angiogénesis, mayor proporción de metástasis con vascularización propia y por consiguiente mayor talla media.

Para apoyar esta teoría se cuenta con el dato de la Tabla X (a): la única categoría dimensional en la que el pulmón no irradiado supera en número al irradiado es en metástasis menores de 0,5 mm. Este dato no se contrapone al del último cuadro del Apartado 3.2.1.1., donde se encuentra una mayor proporción de nódulos menores de 0,5 mm (anotados como "1") a favor del pulmón irradiado. Está claro que en el segundo caso todos los sujetos priman por igual, puesto que el cálculo se hace por cocientes, con lo que se demuestra con significación estadística que las metástasis asientan proporcionalmente más en territorio irradiado. En el primer caso, en la tabla de tamaños, unos animales suman más que otros, dependiendo de su abundancia metastásica. Con ello el razonamiento se redondea: cuando se habla de número de metástasis cuenta cada ratón y la proporción va a favor del territorio irradiado; cuando se habla de tamaño cuenta cada metástasis y las de pequeñas dimensiones son más numerosas en donde no se administró radiación.

Podría argüirse que este mismo cuadro es aplicable a cualquier desarrollo tumoral en lecho irradiado y sin embargo los experimentos de TBE suelen dar como resultado retraso de crecimiento. Pero lo cierto es que estas experiencias son por inoculación directa en tejido subcutáneo o músculo y sólo el pulmón y sus vasos tienen demostrada liberación de citoquinas por radiación. Podría perfectamente ocurrir que por ser pulmón y no otro tejido o por ser metástasis y no primario, lo que en otros lechos es retraso, aquí fuera progreso.

4.2.3.- Estudio microscópico .-

Es preciso reseñar las escasas diferencias entre los pulmones que habían recibido radiación y los controles, tanto en cuanto a características de los focos metastásicos como al tejido pulmonar. En los primeros, las colonias tumorales, no se les ha podido detectar ninguna relación distintiva tumor-huésped que corrobore morfológicamente un cambio biológico. Por lo que respecta a la ausencia de cambios típicos de toxicidad pulmonar por radiación, no es sorprendente, ya que en la mayoría de los casos el sacrificio se produjo antes de alcanzar los dos meses, momento en el que se hace patente la neumonitis. En aquellos que sí se alcanzó (Grupos de 42

días de intervalo + 21 días hasta la necropsia = 63 días) la dosis, 5 Gy, resulta insuficiente para desencadenar toxicidad en fase precoz.

Nota aparte requieren las localizaciones de los nidos tumorales metastásicos, con una peculiar tendencia a las regiones peribronquiales y subpleurales, sin dejar de ser auténticas metástasis pulmonares. La presentación subpleural pulmonar es habitual en muchas neoplasias, en tanto que la propensión hacia áreas peribronquiales se puede especular se encuentre en relación con una mayor abundancia de vasos, que irían acompañando al bronquio.

4.2.4.- *Infiltración de otros tejidos .-*

Resulta intrigante que la aptitud demostrada en este caso por el melanoma B16-F10 para el desarrollo de metástasis pleurales, 58 de 75 sujetos, no encuentre reflejo en la numerosa literatura que un tumor tan utilizado genera^{31,35,36,73,110,112}. Es tentador atribuir este comportamiento a la irradiación hemitorácica sufrida por la mayoría de animales antes de la inoculación; pero en ausencia de comparación contralateral y teniendo en cuenta la fuerte siembra detectada en los casos control, sería temerario implicar a la radiación como promotora de metástasis pleurales. Si realmente en esta serie ha existido una inhabitual afectación de pleura, una posible explicación sería un cambio fenotípico en la cepa mantenida en este Laboratorio, sobre el cual faltan datos para poder pronunciarse. Lo que no es discutible es su estrechísima relación con la metastatización pulmonar (Tabla XIII), que supera con mucho las diferencias que entre un pulmón y otro pudiera haber e induce a pensar que los mismos factores que han influido en un animal para desarrollar una siembra abundante (cepa, viabilidad, inoculación, condiciones inmunológicas...), han actuado paralelamente para ambas localizaciones.

El origen de la afectación de ganglios hiliares pulmonares y mediastínicos debe ser el pulmón. Aun sin poder aportar una cuantificación y sus correspondencias, la impresión personal del investigador que llevó a cabo todas las necropsias, es de una fuerte correlación con la intensidad de la metastatización pulmonar. Para las metástasis linfáticas extratorácicas la fuente es más confusa. En contra de su procedencia por vía linfática a partir del pulmón o ganglios mediastínicos, está la localización; tendría que haber llegado en dirección retrógrada y saltando varias estaciones. También en contra está la falta de correlación mostrada en la Tabla XVI. Otra teoría sería que los ganglios paraórticos infiltrados sean metástasis linfáticas de los tumores creados accidentalmente en la cola en el momento de la inoculación; pero la estadística parece negarlo de forma contundente

(Tabla XIV). A falta de otra explicación, es perfectamente posible la infiltración por vía hematológica a partir de la inoculación, puesto que el melanoma B16-F10, no obstante su especificidad y rendimiento para la afectación pulmonar, mantiene potencial metastatizador para expresarse en otros tejidos.

El bazo es la única víscera que ha desarrollado melanoma a parte del propio pulmón. Su presencia vale para ratificar la modesta pero real aptitud metastatizadora del melanoma B16-F10 en otros órganos. Lo anecdótico del número, sólo cinco casos, hace infructuosa la búsqueda de correlación estadística.

La infiltración de la cola, resultado sin duda de pequeñas extravasaciones en el momento de la inoculación intravenosa, puede contemplarse como fuente de ambigüedad. Ya se ha citado que la posibilidad de que éste sea el origen de la afectación de los ganglios paraórticos es poco sostenible estadísticamente. Por otra parte puede ser fuente de preocupación la pérdida de dosis inoculatoria intravenosa que la siembra en rabo patentiza; pero la Tabla XV demuestra que los animales con esta característica no presentaban menos metástasis pulmonares. De hecho el resultado casi-significativo de la Tabla XV (b) iría a favor de más nódulos pulmonares en los que presentan tumor en la cola. Por fin, aunque a pesar de todo se quisiera contemplar este hecho como elemento capaz de alterar los resultados, habría que recordar que la influencia sería igual para ambos pulmones, con lo que la intervención seguiría siendo nula.

4.3.- REPERCUSIÓN CLÍNICA .-

Una lectura somera de los datos hasta aquí mostrados, puede resultar inquietante para la radioterapia oncológica. Afirmar sin más que la acción de la radiación sobre los tejidos conlleva al incremento en el número y, al menos en pulmón, en el crecimiento de metástasis, implica una vituperación gratuita de uno de los pilares del tratamiento del cáncer. La reflexión sobre el panorama global del problema orienta hacia conclusiones menos preocupantes.

En primer término, se cuenta con la experiencia de la clínica. Cien años de Radioterapia empírica han llevado a una escasa o nula preocupación por un problema que, de existir, se habría detectado de un modo u otro. Salvo

algún trabajo notablemente aislado²⁷ y ampliamente criticado (Apartado 1.5.1.1.), la generalidad de los estudios clínicos no indican una exacerbación de metástasis en los tejidos sometidos a irradiación, incluso cuando éstos la habían recibido de inadvertida o indeseadamente^{18,22,51,65,122,129}. Si la experiencia con pacientes indica lo contrario que los datos experimentales ¿a qué se debe esta disparidad?

Asumido un comportamiento biológico idéntico entre la metástasis experimental y la observable en Oncología Clínica, cuestión que estaría por demostrar, el propio diseño de la experiencia, siendo válido para la observación del fenómeno básico, ni es ni pretende ser paralelo a la situación médica. La radiación se ha aplicado sobre un órgano escrupulosamente sano para posterior y deliberadamente producir la llegada de las células tumorales. En la práctica clínica, la irradiación de órganos indemnes debe producirse con frecuencia, por ejemplo en muchos casos de tratamiento adyuvante. Pero lo que es casi impensable es proceder a este tratamiento complementario antes de haber atacado por el método que sea el tumor primario. Esta es una diferencia de base y fundamental por la que los hallazgos de esta investigación básica no tienen porqué ser aplicables sin más a la clínica.

Por otra parte, se ha citado en esta discusión que uno de los mecanismos por los que el rendimiento metastásico pudiera estar aumentado en el territorio irradiado, sería la inducción de factores angiogénicos que convertirían metástasis quiescentes en progresivas. Pero para culminar esta promoción ya tendría que estar presente la micrometástasis y en ese caso el efecto tumoricida superaría cualquier posible inducción. Las partes óseas irradiadas junto con un primario de mama o próstata, que en su evolución son típicamente objeto de menos metástasis detectables, ilustran esta situación^{51,65,129}.

Por último cabe advertir que lo documentado en pulmón no es necesariamente aplicable a otros órganos. Se sabe que células endoteliales de varias procedencias reaccionan de manera distinta a la radiación^{34,109,162}. Además, la liberación de ciertas citoquinas por irradiación sólo está documentada en pulmón^{3,40,134,132}.

Para la extrapolación de esta investigación a la clínica, el corolario ha de ser que no hay ningún motivo para revisar las prácticas en radioterapia oncológica; salvo el infrecuente caso de completar la irradiación de un órgano clínicamente libre de tumor antes de haber iniciado maniobras en contra del tumor primario, planificación terapéutica que sería desaconsejable, en especial si el órgano expuesto es el pulmón.

V.- CONCLUSIONES .-

- 1.- La inoculación a ratones C-57 BL6 en vena dorsal del rabo de una dosis de 50.000 células de melanoma B16-F10 en 0,2 ml y observación por necropsia a los 21 días, es un modelo experimental adecuado para la investigación de metástasis pulmonares.
- 2.- La radiación con rayos X de 50 KV y filtro de 1 mm de Al, a 30 cm de distancia fuente-piel, permite con un dispositivo preparado al efecto la irradiación hemitorácica homogénea de cuatro ratones simultáneamente, con buena colimación, distribución dosimétrica e inmovilización.
- 3.- La irradiación de un pulmón previa a la inducción de metástasis de melanoma, condiciona un incremento modesto pero significativo en el número de nódulos metastásicos detectables en el pulmón expuesto.
- 4.- La aplicación de un intervalo de 2; 7 ó 21 días entre la irradiación y la inoculación mantiene constante el incremento del número de metástasis. Por el contrario, una separación de 42 días ya no muestra acrecencia, lo que induce a pensar que el efecto potenciador es temporal y que desaparecería entre las tres y las seis semanas después de la irradiación.
- 5.- No se detectan diferencias relevantes en cuanto a número de metástasis pulmonares entre las distintas dosis administradas al hemitórax: 5 y 15 Gy.
- 6.- No se detecta Efecto Lecho Tumoral en cuanto a retraso en el crecimiento de las metástasis. Antes bien, el tamaño medio de éstas es superior en el pulmón previamente irradiado.
- 7.- Los únicos territorios objeto de metástasis detectables en necropsia son: pulmón, pleura, ganglios linfáticos y bazo.
- 8.- El tejido más frecuentemente metastatizado, a parte del pulmón es la pleura. La incidencia e intensidad de su afectación se correlaciona muy estrechamente con la de pulmón.

VI .- BIBLIOGRAFÍA .-

- 1.- Ando K; Hunter N; Peters LJ. Inhibition of artificial lung metastases in mice by pre-irradiation of abdomen. *Br J Cancer* **41**: 250-258 (1980).
- 2.- Ando K; Koike S. The relationship between lung colony and in situ assays. *Int J Radiation Oncology Biol Phys* **11**:1495-1502 (1985).
- 3.- Anscher MS; Prescott D; Reisenbichler H; Spencer D; Bentel G; Marks G; Sherouse G; Jirtle RL. Changes in plasma TGF- β levels during pulmonary radiotherapy as a predictor of the risk of developing late radiation pneumonitis. *Int J Radiation Oncology Biol Phys* **27** Suppl 1: 182 (1993).
- 4.- Aznavoorian S; Liotta LA. La evolución en etapas de la neoplasia invasora: desequilibrio de la regulación positiva y negativa. *Triángulo* **31** (1): 25-37 (1993).
- 5.- Baker DG; Morgan EP; Persing JA. Squamous cell carcinoma growth in irradiated tissue: a murine model for quantitative assessment of treatment. *Ann Plast Surg* **35**: 171-177 (1995).
- 6.- Baumann M; Suit HD; Sedlacek RS. Metastases after fractionated radiation therapy of three murine tumor models. *Int J Radiation Oncology Biol Phys* **19**: 367-370 (1990).
- 7.- Baumann M; Wurschmidt F; Twardy A; Beck-Bornholdt HP. Impact of tumor stroma on expression of the tumor bed effect in R1H rat rhabdomyosarcoma. *Radiation Research* **140**: 432-436 (1994).

- 8.- Berston ED; Ramos DM; Kramer RH. Metastatic melanoma cells interact with the reticular fibres of the lymph node. *Melanoma Research* **4**: 115-125 (1994).
- 9.- Bidaurrazaga J; Gabius HJ; Vidal-Vanaclocha F. Inhibición de la metástasis hepática del melanoma B16 mediante activación de las células sinusoidales hepáticas con la lectina VA-1. *Oncología* **16**, resúmenes del V Congreso Nacional de la ASEICA: 311 (1993).
- 10.- Borgstrom P; Torres-Filho IP; Hartley-Asp B. Inhibition of angiogenesis and metastases of the Lewis-lung cell carcinoma by the quinoline-3-carboxamide, Linomide. *Anticancer Research* **15**: 719-728 (1995).
- 11.- Bowersox JC; Richters A; Sorgente N. Altered characteristics of B16 melanoma cells induced by chemically crosslinking fibronectin to cell surfaces. *Journal of Surgical Oncology* **29**: 11-14 (1985).
- 12.- van den Brenk HAS; Burch WM; Orton C; Sharpington C. Stimulation of clonogenic growth of tumor cells and metastases in the lungs by local X-radiation. *Br J Cancer* **27**: 291-306 (1973).
- 13.- van den Brenk HAS; Crowe MC; Stone MG. Reactions of the tumor bed to lethally irradiated tumor cells, and the Resvesz effect. *Br J Cancer* **36**: 94-104 (1977).
- 14.- van den Brenk HAS; Kelly H. Potentiating effect of prior local irradiation of the lung on pulmonary metastases. *British Journal of Radiology* **47**: 332-336 (1974).
- 15.- Brown JM. Consequences of the tumor bed effect for regrowth delay studies. (In) *Kallman RF, Rodent Tumor Models in Experimental Cancer Therapy*: 174-178. Pergamon Press, New York (1987).

- 16.- Brown JM. Effect of lung irradiation on the incidence of lung colonies arising from intravenously-injected KHT tumor cells. *Radiation Research* **47**: 271 (1971).
- 17.- Brunson KW; Nicolson GL. Selection of malignant melanoma variant cell lines for ovary colonization. *Journal of Supramolecular Structure* **11**: 517-528 (1979).
- 18.- Burgers JMV; van Glabbeke M; Busson A; Cohen P; Mazabraud AR et al. Osteosarcoma of the limbs. Report of the EORTC-SIOP 03 Trial 20781 investigating the value of adjuvant treatment with chemotherapy and/or prophylactic lung irradiation. *Cancer* **61**: 1024-1031 (1988).
- 19.- Cajone F; Debiassi S; Parker C; Lakshmi MS; Sherbet GV. Metastasis-associated *mts1* gene expression is down-regulated by heat shock in variant cell lines of the B16 murine melanoma. *Melanoma Research* **4**: 143-150 (1994).
- 20.- Campeljhon RS; Penhaligon M. The tumor bed effect: a cell kinetic and histological investigation of tumors growing in irradiated mouse skin. *British Journal of Radiology* **58**: 443-541 (1985).
- 21.- Castronovo V; Taraboletti G; Sobel ME. Laminin receptor complementary DNA-deduced synthetic peptide inhibits cancer cell attachment to endothelium. *Cancer Research* **51**: 5672-5678 (1991).
- 22.- Chu FCH; Lucas JC; Farrow JH; Nickson JJ. Does prophylactic radiation therapy given for cancer of the breast predispose to metastasis? *Am J Roentgenology* **99**: 987-994 (1967).
- 23.- Claffey KP; Brown LF; del-Aguila LF; Tognazzi K; Yeo KT; Manseau EJ; Dvorak HF. Expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth, angiogenesis, and experimental metastasis. *Cancer Research* **56**: 172-181 (1996).

- 24.- Consejo de las Comunidades Europeas. Líneas directrices relativas al alojamiento y a los cuidados de los animales. Anexo II al Artículo 5 de la Directiva del Consejo de 24 de Noviembre de 1986 respecto a la protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos (86/609/CEE). *Diario Oficial de las Comunidades Europeas* 18.12.86. N° L358/1 a N° L358/28.
- 25.- Cornelius LA; Nehring LC; Roby JD; Parks WC; Welgus HG. Human dermal microvascular endothelial cells produce metalloproteinases and response to angiogenic factors and migration. *J Invest Dermatol* **105**: 170-176 (1995).
- 26.- Coultas PG; Ahier RG; Anderson RL. Altered turnover and synthesis rates of lung surfactant following thoracic irradiation. *Int J Radiation Oncology Biol Phys* **13**: 233-237 (1987).
- 27.- Dao TL; Kovaric J. Incidence of pulmonary and skin metastases in women with breast cancer who received postoperative irradiation. *Surgery* **52**: 203-212 (1962).
- 28.- Dao TL; Yogo H. Enhancement of pulmonary metastases by X-irradiation in rats bearing mammary cancer. *Cancer* **20**: 2020-2025 (1967).
- 29.- Dubravsky NB; Dubrawsky C; Jampolis S; Mason K; Hunter N; Withers HR. Long-term effects of pulmonary damage in mice on lung weight, compliance, hydroxyproline content and formation of metastases. *British Journal of Radiology* **54**: 1075-1080 (1981).
- 30.- Dyce M; Sharif SF; Whalen GF. Search for anti-metastatic therapy: effects of phenitoin on B16 melanoma metastasis. *Journal of Surgical Oncology* **49**: 107-112 (1992).
- 31.- El-Sabban ME; Pauli BU. Adhesion-mediated gap junctional communication between lung-metastatic cancer cells and endothelium. *Invasion Metastasis* **14**: 164-176 (1995).

- 32.- Evans ML; Graham MM; Mahler PA. Changes in vascular permeability following thorax irradiation in the rat. *Radiation Research* **107**: 262-271 (1986).
- 33.- Fabra A. Bases biológicas de la organoespecificidad de las metástasis. *Oncología* **16** resúmenes del V Congreso Nacional de la ASEICA: 49 (1993).
- 34.- Fajardo LF. The unique physiology of endothelial cells and its implications in radiobiology. (In) *Vaeth JM; Meyer JL, Radiation Tolerance of Normal Tissues. Front Radiat Ther Oncol* **23**: 96-112, Basel, Karger (1989).
- 35.- Fidler IJ. Selection of successive tumour lines for metastasis. *Nature (New Biol)* **242**: 148-149 (1973).
- 36.- Fidler IJ. The evolution of biological heterogeneity in metastatic neoplasms. (In) *Nicolson GL; Milas L, Cancer Invasion and Metastasis: Biological and Therapeutic Aspects*. Raven Press, NY (1984).
- 37.- Fidler IJ. The relationship of embolic homogeneity, number, size and viability in the incidence of experimental metastasis. *European Journal of Cancer* **9**: 223-227 (1973).
- 38.- Fidler IJ; Talmadge E. Evidence that intravenously derived murine pulmonary metastases can originate from the expansion of a single tumor cell. *Cancer Research* **46**: 5167-5171 (1986).
- 39.- Fidler IJ; Zeidman I. Enhancement of experimental metastasis by X-ray: a possible mechanism. *J Med* **3**: 172-177 (1972).
- 40.- Finkelstein JN; Johnston CJ; Baggs R; Rubin P. Early alterations in extracellular matrix and transforming growth factor β gene expression in mouse lung indicative of late radiation fibrosis. *Int J Radiation Oncology Biol Phys* **28**: 621-631 (1994).

- 41.- Fisher ER; Fisher B. Effects of X-irradiation on parameters of tumor growth, histology, and ultrastructure. *Cancer* **24**: 39-55 (1969).
- 42.- Fisher ER; Fisher B. Experimental studies of factors influencing metastases. XIII. Effect of hepatic trauma in parabiotic pairs. *Cancer Research* **23**: 896-900 (1963).
- 43.- Flecknell PA. Non surgical experimental procedures. (In) *Laboratory Animals: An Introduction for New Experimenters*: 225-260. AA Tuffery; John Wiley & Sons, NY (1987).
- 44.- Fogelquist S; Deutsch B; Groszek L; Valle EF; Stackpole CW. Hemodynamic considerations in organ and tissue patterning of B16 melanoma systemic metastasis and colonization. *Invasion Metastasis* **11**: 261-272 (1991).
- 45.- Folkman J. What is the role of endothelial cells in angiogenesis? *Laboratory Investigation* **51**: 601-604 (1984).
- 46.- Fuks Z; Weichselbaum RR. Radiation tolerance and the new biology: growth factor involvement in radiation injury to the lung. *Int J Radiation Oncology Biol Phys* **24**: 183-184 (1992).
- 47.- Gao X; Honn KV. 12(HETE) as a signaling molecule. *Advances in Oncology* **11**(2): 2-9 (1995).
- 48.- Gao X; Honn KV. 12-Lipoxygenase as a prostate cancer marker and therapeutic target. *Advances in Oncology* **11** (3): 2-8 (1995).
- 49.- Gatoni-Celli S; Calorini L. Transfection of H-2K^b gene in B16 melanoma cells leads to suppression of liver metastases in triple immunodeficient mice. *Int J Radiation Oncology Biol Phys* **24** Suppl 1: 181 (1993).

- 50.- Gómez-Navarro J; González-Barón M. Biología de la célula neoplásica (V): el fenómeno de la metástasis. Bases moleculares. (En) *González-Barón M, Oncología Clínica*. McGraw-Hill-Interamericana, Madrid (1992).
- 51.- Grimard L; Eapen L; McDermot R; Genest P; Nair R. Does parasternal irradiation reduce thoracic vertebral metastases in breast cancer? *Int J Radiation Oncol Biol Phys* **14**: 565-569 (1988).
- 52.- Gutman M; Singh RK; Yoon S; Xie K; Bucana CD; Fidler IJ. Leukocyte-induced angiogenesis and subcutaneous growth of B16 melanoma. *Cancer Biother* **9**: 163-170 (1994).
- 53.- Handbook on genetically standardiced Jax mice (3rd Ed). Hans-Jörg Herniger and John J Dorey, NY (1980).
- 54.- Haston CK; Hill RP; Newcomb CH; van Dyk J. Radiation-induced lung damage in rats: the influence of fraction spacing on effect per fraction. *Int J Radiation Oncology Biol Phys* **28**: 633-640 (1994).
- 55.- Hattori T; Hamai Y; Harada T. Enhancing effect of thoracotomy and/or laparotomy on the development of the lung metastases in rats after intravenous inoculation of tumor cells. *Jpn J Surg* **7**: 263-268 (1977).
- 56.- Hewitt HB; Blake ER. Facilitation of nodal metastasis from a non-immunogenic murine carcinoma by previous whole body irradiation of tumor recipients. *Br J Cancer* **36**: 23-34 (1977).
- 57.- Holmgren L; O'Reylly MS; Folkman J. Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nat Med* **1**: 117-118 (1995).
- 58.- Honn KV; Tang DG; Gao X; Butovich IA; Liu B; Timar J; Hagmann W. 12-lipoxygenases and 12(S)-HETE: role in cancer metastasis. *Cancer Metastasis Rev* **13**: 365-396 (1994).

- 59.- Hopewell JW; Calvo W; Campling D; Reinhold HS; Rezvani M; Yeung TK. Effects of radiation on microvasculature. (In) *Vaeth JM; Meyer JL, Radiation Tolerance of Normal Tissues. Front Radiat Ther Oncol* **23**: 85-95, Basel, Karger (1989).
- 60.- Hosoi Y; Sakamoto K. Suppressive affect of low dose total body irradiation on lung metastasis: dose dependency and effective period. *Radiotherapy and Oncology* **26**: 177-179 (1993).
- 61.- van Houtte P. Radiation and chemotherapy induced lung toxicity. *Int J Radiation Oncology Biol Phys* **13**: 647-649 (1987).
- 62.- Hunt G. The role of laminin in cancer invasion and metastasis. *Experimental Cell Biology* **57**: 165-176 (1989).
- 63.- IFFA Credo. *Souris C57BL/6*. Folleto informativo: 92-96. París (1989).
- 64.- Isamat M; Rosell R; Ariza A. Regulación molecular de la invasión y las metástasis. *Sandorama* **2**: 6-13 (1994).
- 65.- Jacobsson H; Näslund I. Reduced incidence of bone metastases in irradiated areas after external radiation therapy of prostatic carcinoma. *Int J Radiation Oncology Biol Phys* **20**: 1297-1303 (1991).
- 66.- Jahroudi N; Greenberger JS. The role of endothelial cells in tumor invasion and metastasis. *Journal of Neurooncology* **23**: 99-108 (1995).
- 67.- Jeager TM; Weidner N; Chew K; Moore DH; Kerschmann RL; Waldman FM; Carroll PR. Tumor angiogenesis correlates with lymph node metastases in invasive bladder cancer. *Journal of Urology* **154**: 69-71 (1995).
- 68.- Johns HE; Cunningham JR. *The Physics of Radiology*. Appendix A: 736. Milton Friedman, NY (1977).

- 69.- Jurtle R; Clifton KH. Effect of preirradiation of the tumor bed on the relative vascular space of mouse gastric adenocarcinoma 328 and mammary adenocarcinoma CA755. *Cancer Research* **33**: 764-768 (1973).
- 70.- Jurtle R; Rankin JHG; Clifton KH. Effect of X-irradiation of tumour bed on tumour blood flow and vascular response to drugs. *Br J Cancer* **37**: 1033-1038 (1978).
- 71.- Kallman RF. Commentary on part 7. (In) *Kallman RF, Rodent Tumor Models in Experimental Cancer Therapy*: 167-168. Pergamon Press, New York (1987).
- 72.- Keng PG; Phipps R; Penney DP. In vitro radiation sensitivity of mouse lung fibroblasts isolated by flow cytometry. *Int J Radiation Oncology Biol Phys* **31**: 519-523 (1995).
- 73.- Killian JJ; Fidler IJ. The biology of tumor metastasis. *Seminars in Oncology* **16**: 106-115 (1989).
- 74.- Kinoshita S; Sone S; Yamashita T; Tsubura E; Ogura T. Effects of experimental hyper- and hypothyroidism on natural defense activities against Lewis lung carcinoma and its spontaneous pulmonary metastases in C57BL/6 mice. *Tokushima J Exp Med* **38**: 25-35 (1991).
- 75.- Koike a; Nazakato H; Moore GE. The fate of Ehrlich cells injected into portal system. *Cancer* **16**: 716-720 (1963).
- 76.- Kolber DL; Knisely TL; Maione TE. Inhibition of development of murine melanoma lung metastases by systemic administration of recombinant platelet factor 4. *Journal of the National Cancer Institute* **87**: 304-309 (1995).
- 77.- Krishnan EC; Krishnan L; Schweiger GD; Jewell WR. Quantitative assay for the radiosensitivity of malignant melanomas. *Melanoma Research* **4**: 151-155 (1994).

- 78.- Laukkanen E; Klonoff H; Allan B; Graeb D; Murray N. The role of prophylactic brain irradiation in limited stage small cell lung cancer: clinical, neuropsychologic, and CT sequelae. *Int J Radiation Oncology Biol Phys* **14**: 1109-1117 (1988).
- 79.- Leith JT; Faulkner LE; Bliven SF; Michelson S. Tumor bed expression in xenografted artificial heterogeneous colon tumors. *Int J Radiation Oncology Biol Phys* **15**: 151-158 (1988).
- 80.- Liao ZX; Travis EL; Tucker SL. Damage and morbidity from pneumonitis after irradiation of partial volumes of mouse lung. *Int J Radiation Oncology Biol Phys* **32**: 1359-1370 (1995).
- 81.- Liotta LA. Mecanismos de la invasión cancerosa y las metástasis. (En) *DeVita VT; Hellman S; Rosenberg SA, Avances en Oncología 1985*. ESPAXS, Barcelona (1986).
- 82.- Liotta LA. Tumor invasion and metastases—Role of the extracellular matrix: Rhoads memorial award lecture. *Cancer Research* **46**: 1-7 (1986).
- 83.- Liotta LA; Kleinerman J; Catanzara P; Rynbrandt D. Degradation of basement membrane by murine tumor cells. *Journal of the National Cancer Institute* **58**: 1427-1439 (1977).
- 84.- Liotta LA; Schiffmann E. Factores de motilidad autocrina tumoral. (En) *DeVita VT; Hellman S; Rosenberg SA, Avances en Oncología 1988*. ESPAXS. Barcelona (1988).
- 85.- Liotta LA; Vembu D; Saini KR; Boone C; Monitoring of the death rate of artificial murine pulmonary micrometastases. *Cancer Research* **38**: 1231-1236 (1978).
- 86.- Lockhart SP; Down JD; Steel GG. Mouse hemithoracic irradiation and its interaction with cytotoxic drugs. *Radiotherapy and Oncology* **24**: 117-185 (1992).

- 87.- Loughheed MN; Chevalier L. Prophylactic radiotherapy to prevent pulmonary metastases. *Abstract 810, proceedings of XIII International Congress of Radiology*, Madrid. Excerpta Medica, Amsterdam (1973). Cit por 122.
- 88.- Maasilta P; Salonen EM; Vaheri A; Kivisaari L; Holsti L; Mattson K. Procollagen-III in serum, plasminogen activation and fibronectin in bronchoalveolar lavage fluid during and following irradiation of human lung. *Int J Radiation Oncology Biol Phys* **20**: 973-980 (1991).
- 89.- Mah K; Keane TJ; van Dyk J; Braban LE; Poon PY; Hao Y. Quantitative effect of combined chemotherapy and fractionated radiotherapy on the incidence of radiation-induced lung damage: a prospective clinical studt. *Int J Radiation Oncology Biol Phys* **28**: 563-574 (1994).
- 90.- Mah K; van Dyk J; Keane T; Poon PY. Acute radiation-induced pulmonary damage: a clinical study on the response to fractionated radiation therapy. *Int J Radiation Oncology Biol Phys* **13**: 179-188 (1987).
- 91.- Mansfield CM; Kimles BF; Henderson SD; Svoboda DJ; Vats TS. Development of normal tissue damage in the rat subsequent to thoracic irradiation and prior treatment with cancer chemotherapeutic agents. *Am J Clin Oncol (CCT)* **7**: 425-430 (1984).
- 92.- Mäntylä MJ; Toivanen JT; Pitkänen MA; Rekonen AH. Radiation-induced changes in regional blood flow in human tumors. *Int J Radiation Oncol Biol Phys* **8**: 1711-1717 (1982).
- 93.- Martin DF; Fisher JJ. Radiation sensitivity of cultured rabbit aortic endothelial cells. *Int J Radiation Oncology Biol Phys* **10**: 1903-1906 (1984).
- 94.- Martin PM; Lissitzky JC; Poupon MF; Sampol J. Étude de l'activité protéolytique dans les tumeurs humaines. Invasion, métastases des tumeurs solides. (In) *Cancer du sein. Définition du risque métastatique*. Masson, Paris (1987).

- 95.- McBride G. Tumour angiogenesis: the growth of a concept. *Helix* **4**(2): 27-33 (1995).
- 96.- McDonald S; Rubin P; Maasilta P. Response of normal lung to irradiation. (In) *Vaeth JM; Meyer JL, Radiation Tolerance of Normal Tissues. Front Radiat Ther Oncol* **23**: 255-276, Basel, Karger (1989).
- 97.- Melato M; Laurino L; Mucli E; Valente M; Okuda K. Relationship between cirrhosis, liver cancer and hepatic metastases. *Cancer* **64**: 455-459 (1989).
- 98.- Milas L. Tumor bed effect: dependency on tumor type and influence on tumor therapy. (In) *Kallman RF, Rodent Tumor Models in Experimental Cancer Therapy*: 174-178. Pergamon Press, New York (1987).
- 99.- Milas L; Hirata H; Hunter N; Peters LJ. Effect of radiation-induced injury of tumor bed stroma on metastatic spread of murine sarcomas and carcinomas. *Cancer Research* **48**: 2116-2120 (1988).
- 100.- Milas L; Hunter N; Mason K; Withers R. Immunological resistance to pulmonary metastases in C3Hf/Bu mice bearing syngenic fibrosarcoma of different sizes. *Cancer Research* **34**: 61-71 (1974).
- 101.- Milas L; Hunter N; Peters LJ. The tumor bed effect: dependence of tumor take, growth rate, and metastasis on the time interval between irradiation and tumor cell transplantation. *Int J Radiation Oncology Biol Phys* **13**: 379-383 (1987).
- 102.- Milas L; Hunter N; Peters LJ. Tumor bed effect-induced reduction of tumor radiocurability through the increase in hypoxic cell fraction. *Int J Radiation Oncology Biol Phys* **16**: 139-142 (1989).
- 103.- Milas L; Ito H; Hunter N; Jones S; Peters LJ. Retardation of tumor growth in mice caused by radiation-induced injury of tumor bed stroma: dependency of tumor type. *Cancer Research* **46**: 723-727 (1986).

- 104.- Mira JG; Chen TT; Livingstone RB; Wilson HE. Outcome of prophylactic and therapeutic cranial irradiation in disseminated small cell lung carcinoma: a Southwest Oncology Group study. *Int J Radiation Oncology Biol Phys* **14**: 861-865 (1988).
- 105.- Módis L. Organization of the extracellular matrix: A polarization microscopic approach. CRC Press. Boca Ratón, Florida (1991).
- 106.- Mori S; Ueda T; Kuratsu S; Hosono H; Izawa K; Uchida A. Suppression of pulmonary metastasis by angiogenesis inhibitor TNP-470 in murine osteosarcoma. *International Journal of Cancer* **61**: 148-152 (1995).
- 107.- Morishita T; Mii Y; Miyauchi Y; Miura S; Honoki K; Aoki M; Kido A; Tamai S; Tsutsumi M; Konishi Y. Efficacy of the angiogenesis inhibitor O-(Chloroacetyl-carbamoyl)fumagillol (AGM-1470) on osteosarcoma growth and lung metastasis in rats. *Jpn J Clinical Oncology* **25**: 25-31 (1995).
- 108.- Newcomb CH; van Dyk J; Hill RP. Evaluation of isoeffect formulae for predicting radiation-induced lung damage. *Radiotherapy and Oncology* **26**: 51-63 (1993).
- 109.- Nicholson GL; Custead SE; Dulski KM.; Milas L. Effect of gamma irradiation on cultured rat and mouse microvessel endothelial cells: metastatic tumor cell adhesion, subendothelial matrix degradation, and secretion of tumor cell growth factors. *Clinl Expl Metastasis* **9**: 457-468 (1991).
- 110.- Nicholson GL. Metástasis cancerosas. (En) *El cáncer* Cap14. Libros de Investigación y Ciencia. Grafesa, Barcelona (1985).
- 111.- Nicholson GL. Metastatic tumor cell interactions with endothelium, basement membrane and tissue. *Current Opinion in Cell Biology* **1**: 1009-1019 (1989).

- 112.- Nicolson GL; Brunson KW; Fidler IJ. Specificity of arrest, survival, and growth of selected variant cell lines. *Cancer Research* **38**: 4105-4111 (1978).
- 113.- O'Ryelly MS; Holmgren L; Shing Y; Chen C; Rosenthal RA; Moses M; Lane WS; Cao Y; Sage EH; Folkman J. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell* **79**: 315-328. Comment in *Cell* **79**: 185-188 (1994).
- 114.- Okahara H; Yagita H; Miyake K; Okumura K. Involvement of very late activation antigen 4 (VLA-4) and vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) in tumor necrosis factor α . Enhancement of experimental metastasis. *Cancer Research* **54**: 3233-3236 (1994).
- 115.- Okunieff P; Urano M; Kallinowski F; Vaupel P; Neuringer LJ. Tumors growing in irradiated tissue: oxygenation, metabolic state, and pH. *Int J Radiation Oncology Biol Phys* **21**: 667-673 (1991).
- 116.- Onoda JM; Kantak SS; Piechocki MP; Nelson KK; Diglio CA; Jones CL; Mamybekova AZ. Low-dose radiation activates quiescent endothelial monolayers resulting in increased tumor cell adhesion in vitro and metastasis in vivo. *Proc Annu Meet Am Assoc Cancer Res* **34**: A494 (1993).
- 117.- Orr FW; Adamson IYR; Young L. Pulmonary inflammation generates chemotactic activity for tumor cells and promotes lung metastasis. *Am Rev Respir Dis* **131**: 607-611 (1985).
- 118.- Ovejera AA. The use of human tumor xenografts in large-scale drug screening. (In) Kallman RF, *Rodent tumor models in experimental therapy* Chap 46. Pergamon Books, Inc. (1987).
- 119.- Penney DP. Ultrastructural organization of the distal lung and potential target cells of ionizing radiation. *Int Conf on New Biology of Lung and Lung Injury and their Implications for Oncology*, Porvoo (1987). Cit por 96.

- 120.- Peters LJ. The potentiating effect of prior local irradiation of the lungs on the development of pulmonary metastases. *British Journal of Radiology* **47**: 827-829 (1974).
- 121.- Peters LJ; Mason K; McBride WH; Patt YZ. Enhancement of lung colony-forming efficiency by local thoracic irradiation: interpretation of labeled cell studies. *Radiology* **126**: 499-505 (1978).
- 122.- Peters LJ; Mason KA; Withers HR. Effect of lung irradiation on metastases: radiobiological studies and clinical correlations. (In) *Meyn ER; Withers HR, Radiation Biology in Cancer Research*: 515-529, Raven Press, New York (1980).
- 123.- Pipili-Synetos E; Papageorgiou A; Sakkaoula E; Sotiropoulou G; Fotsis T; Karakiulakis G; Maragoudakis ME. Inhibition of angiogenesis, tumor growth and metastasis by the no-releasing vasodilators, isosorbide mononitrate and dinitrate. *British Journal of Pharmacology* **116**: 1829-1834 (1995).
- 124.- Pitelka DR; Hamamoto ST; Taggart NB. Basal lamina and tissue reconnection in malignant mammary tumors. *Cancer Research* **40**: 1600-1611 (1980).
- 125.- Ponton A; Coulombe B; Skup D. Decreased expression of tissue inhibitor of metalloproteinases in metastatic tumor cells leading to increased level of collagenase activity. *Cancer Research* **51**: 2138-2143 (1991).
- 126.- Raabe A; Beck-Bornholdt HP. Radiobiological determination of growth kinetics and radiosensitivity of pulmonary micrometastases of the R1H tumour. *Radiotherapy and Oncology* **30**: 254-262 (1994).
- 127.- Rak JW; St-Croix BD; Kerbel RS. Consequences of angiogenesis for tumor progression, metastasis and cancer therapy. *Anticancer Drugs* **6**: 3-18 (1995).

- 128.- Rappaport DS; Brown JM. Influence of localized preinoculation irradiation of the foot on lymphatic metastasis from a primary tumor growing in the foot. *Radiation Research* **78**: 108-121 (1979).
- 129.- Rees GJG. Influence of parasternal radiotherapy for breast carcinoma on thoracic vertebral metastases. *Radiotherapy and Oncology* **10**: 183-186 (1987).
- 130.- van Rogen E; Tan CHT; Durham SK. Late functional, biochemical and histological changes in the rat lung after fractionated irradiation to the whole thorax. *Radiotherapy and Oncology* **10**: 231-246 (1987).
- 131.- Rowett HGQ. *Guías de Disección: III La rata, con notas sobre el ratón*. Urania, Barcelona (1976).
- 132.- Rubin P; Finkelstein J Shapiro D. Molecular biology mechanisms in the radiation induction of pulmonary injury syndromes: interrelationship between the alveolar macrophage and the septal fibroblast. *Int J Radiation Oncol Biol Phys* **24**: 93-101 (1992).
- 133.- Rubin P; Johnston CJ; Finkelstein JN. Early changes in collagen gene expression in mouse lung associated with late radiation fibrosis. *Int J Radiation Oncology Biol Phys* **24** Suppl 1: 192 (1993).
- 134.- Rubin P; Williams JP; McDonald S; A perpetual cascade of cytokines postirradiation leads to pulmonary fibrosis. *Int J Radiation Oncology Biol Phys* **33**: 99-109 (1995).
- 135.- Rusch V; Baselga J; Cordon-Cardo C; Orazem J; Zaman M; Hoda S; McIntosh J; Kurie J; Dmitrovsky E. Differential expression of the epidermal growth factor receptor and its ligands in primary non-small cell lung cancers and adjacent benign lung. *Cancer Research* **53**: 2379-2385 (1993).
- 136.- Sage EH. Angiogenesis inhibition in the context of endothelial cell biology. *Advances in Oncology* **12**(2): 17-29 (1996).

- 137.- Schenk S; Chiquet-Ehrismann R. The Tenascin family. *Helix* **5** (1): 50-51 (1996).
- 138.- Schultz-Hector S; Haghayegh S. β -Fibroblast growth factor expression in human and murine squamous cell carcinomas and its relationship to regional endothelial cell proliferation. *Cancer Research* **53**: 1444-1449 (1993).
- 139.- Schwartz D. *Métodos Estadísticos para Médicos y Biólogos*. Herder, Barcelona (1985).
- 140.- Shen RN; Hornback NB; Shidnia H; Lu L; Montebello JF; Brahmi Z. A comparison of lung metastases and natural killer cell activity in daily fractions and weekly fractions of radiation therapy on murine B16_a melanoma. *Radiation Research* **114**: 354-360 (1988).
- 141.- Singh RK; Gutman M; Reich R; Bar-Eli M. Ultraviolet B irradiation promotes tumorigenic and metastatic properties in primary cutaneous melanoma via induction of interleukin 8. *Cancer Research* **55**: 3669-3674 (1995).
- 142.- Stephens TC; Peacock JH. Detection and characterization of clonogenic host cells in experimental tumors. (In) *Kallman RF, Rodent Tumor Models in Experimental Cancer Therapy*: 169-173. Pergamon Press, New York (1987).
- 143.- Sweeney TM; Kibbey MC; Zain M; Fridman R; Kleinman HK. Basement membrane and the SIKVAV laminin-derived peptide promote tumor growth and metastases. *Cancer and Metastasis Reviews* **10**: 245-254 (1991).
- 144.- Tahan SR; Stein AL. Angiogenesis in invasive squamous cell carcinoma of the lip: tumor vascularity is not an indicator of metastatic risk. *J Cutan Pathology* **22**: 236-240 (1995).

- 145.- Takahashi Y; Kitadai Y; Bucana CD; Cleary KR; Ellis LM. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor, KDR, correlates with vascularity, metastasis, and proliferation of human colon cancer. *Cancer Research* **55**: 3964-3968 (1995).
- 146.- Tanaka T; Konno H; Matsuda I; Nakamura S; Baba S. Prevention of hepatic metastasis of human colon cancer by angiogenesis inhibitor TNP-470. *Cancer Research* **55**: 836-839 (1995).
- 147.- Tang DG; Diglio CA; Bazaz R; Honn KW. Transcriptional activation of endothelial cell integrin alpha v by protein kinase activator 12(S)-HETE. *J Cell Science* **108**: 2629-2644 (1995).
- 148.- Tang DG; Honn KV. Adhesion molecules and tumor metastasis: an update. *Invasion Metastasis* **14**: 109-122 (1994).
- 149.- Tannock IF. Tumor growth and cell kinetics. (In) *Tannock IF; Hill RP. The basic science of oncology*. Pergamon Books, NY (1987).
- 150.- Taraboletti G; Belotti D; Giavazzi R; Sobel ME; Castronovo V. Enhancement of metastatic potential of murine and human melanoma cells by laminin receptor peptide G: attachment of cancer cells to subendothelial matrix as a pathway for hematogenous metastasis. *Journal of the National Cancer Institute* **85**: 235-240 (1993).
- 151.- Thompson SC. Tumour colony growth in the irradiated mouse lung. *Br J Cancer* **30**: 337-341 (1974).
- 152.- Timpl R; Rohde H; Robey PG; Rennard SI; Foidart FM; Martin GR. Laminin—A glycoprotein from basement membranes. *Journal of Biological Chemistry* **254**: 9933-9937 (1979).
- 153.- Tochner ZA; Pass HI; Sidelar WF; DeLuca AM; Grisell DL; Bacher JD; Kinsella TJ. Long term tolerance of thoracic organs to intraoperative radiotherapy. *Int J Radiation Oncology Biol Phys* **22**: 65-69 (1991).

- 154.- Tozer GM. Some artefacts involved in radiation response of mouse tumors arising from anesthesia and physical restraint. (In) *Kallman RF, Rodent Tumor Models in Experimental Cancer Therapy*: 47-49. Pergamon Press, New York (1987).
- 155.- Travis EL. The sequence of histological changes in mouse lungs after single doses of X-rays. *Int J Radiation Oncology Biol Phys* **6**: 345-347 (1980).
- 156.- Travis EL; Newman RA; Helbing SJ. WR 2721 modification of type II and endothelial cell function in mouse lung after single doses of radiation. *Int J Radiation Oncology Biol Phys* **13**: 1355-1359 (1987).
- 157.- Travis EL; Parkins CS; Down JD; Fowler JF; Thames HD. Repair in mouse lung between multiple small doses of X-rays. *Radiation Research* **94**: 326-339 (1983).
- 158.- Vergara JA; U R; Thet LA. Changes in lung morphology and cell number in radiation pneumonitis and fibrosis: a quantitative ultrastructural study. *Int J Radiation Oncology Biol Phys* **13**: 723-732 (1987).
- 159.- Vollmers HP; Imhof BA; Braun S; Waller CA; Schirmacher V; Birchmeier W. Monoclonal antibodies which prevent experimental lung metastases. *FEBS Letters* **172**: 17-20 (1984).
- 160.- Vukanovic J; Isaacs JT. Linomide inhibits angiogenesis, growth, metastasis, and macrophage infiltration within rat prostatic cancers. *Cancer Research* **55**: 1499-1504 (1995).
- 161.- Ward WF; Molteni A; Ts'ao CH; Solliday NH. Functional responses of the pulmonary endothelium to thoracic irradiation in rats: differential modification by D-penicillamine. *Int J Radiation Oncology Biol Phys* **13**: 1505-1513 (1987).
- 162.- Waxman J; Wasan H. Arquitectura del cáncer. Metaloproteinasas histicas y sus inhibidores. *BMJ Ed esp* **3**: 10-11 (1993).

- 163.- Weinstat-Saslow DL; Zabrenetzky VS; VanHoutte K; Frazier WA; Roberts DD; Steeg PS. Transfection of Thrombospondin 1 complementary DNA into a human breast carcinoma cell line reduces primary tumor growth, metastatic potential, and angiogenesis. *Cancer Research* **54**: 6504-6511 (1994).
- 164.- Weiss L; Haydock BA; Pickren JW; Lane WW. Organ vascularity and metastatic frequency. *American Journal of Pathology* **101**: 101-113 (1980).
- 165.- Withers HR; Milas L. Influence of preirradiation of lung on development of artificial pulmonary metastases of fibrosarcoma in mice. *Cancer Research* **33**: 1931-1936 (1973).
- 166.- Witte L; Fuks Z; Haimovitz-Friedman A; Vlodavsky I; Goodman D; Eldor A. Effects of irradiation on the release of growth factors from cultured bovine, porcine, and human endothelial cells. *Cancer Research* **49**: 5066-5072 (1989).
- 167.- Wondergem J; Haveman J; van der Schueren E. Influence of thorax irradiation on the survival of mice with spontaneous or artificial lung metastases from a transplantable mammary adenocarcinoma. *Int J Radiation Oncology Biol Phys* **11**: 1127-1136 (1985).
- 168.- Yamit-Hezi A; Plaksin D; Eisenbach L. *c-fos* and *c-jun* overexpression in malignant cells reduces their tumorigenic and metastatic potential and affects their MHC class I gene expression. *Oncogene* **9**: 1065-1079 (1994).
- 169.- Yoon TJ; Yoo YC; Choi OB; Do MS; Kang TB; Lee SW; Azuma I; Kim JB. Inhibitory effect of Korean mistletoe (*Viscum album coloratum*) extract on tumor angiogenesis and metastasis of haematogenous and non-haematogenous tumor cells in mice. *Cancer Letters* **97**: 83-91 (1995).

- 170.- Yuan A; Yang PC; Yu CJ; Lee YC; Yao YT; Chen CL; Lee LN; Kuo SH; Luh KT. Tumor angiogenesis correlates with histologic type and metastasis in non-small-cell lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med* **152** (6 Pt 1): 2157-2162 (1995).
- 171.- Yuhas JM; Proctor JO. Differential effects of total-body pre-irradiation on the growth and metastasis of line 1 alveolar cell carcinomas. *Radiation Research* **59**: 216 (1974).

* * *

Es un deber y un honor dar testimonio de las numerosas personas que ofrecieron su colaboración para la elaboración de esta Tesis:

El Prof. Dr. D. Claudio A. Otón Sánchez. Su estímulo en lo personal y su rigor científico en lo profesional, han sido el motor y la esencia de este trabajo.

El Prof. Dr. D. Lucio Díaz-Flores Feo y el Prof. Dr. D. Ricardo Gutiérrez, tras el microscopio, pusieron su sabiduría y valioso tiempo a total disposición.

El Dr. D. Fidel Rodríguez Hernández y el Dr. D. Gilberto Peñate González dedican su celo para mantener “nuestro” melanoma. Camaradas de verdad, cada tarde tendieron la mano para mil pequeños detalles.

El Prof. Dr. D. José Hernández Armas, el Dr. D. Mario García Yanes, el Dr. D. Antonio Catalán Acosta, la Dra. D^a. Berta Robayna Duque y todos los miembros del Laboratorio de Física Médica, aportaron competencia y equipos en las cuestiones dosimétricas.

A todos ellos, con respeto y afecto

MUCHAS GRACIAS.

ÍNDICE

1.- INTRODUCCIÓN.	1
1.1.- El fenómeno de la metástasis.	3
1.1.1.- La cascada metastásica.	3
1.1.1.1.- Anclaje al endotelio.	5
1.1.1.2.- Penetración del endotelio.	6
1.1.1.3.- Penetración de la membrana basal.	8
1.1.1.3.1.- Adhesión.	8
1.1.1.3.2.- Degradación.	10
1.1.1.4.3.- Migración.	10
1.1.1.4.- Migración por el intersticio.	12
1.1.1.5.- Creación del microentorno.	13
1.1.1.6.- Proliferación.	13
1.1.1.7.- Angiogénesis.	15
1.1.2.- Factores que pueden modificar el rendimiento metastásico.	16
1.1.2.1.- Factores del lecho.	16
1.1.2.1.1.- Anatomoclínicos.	16
1.1.2.1.2.- Bioquímicos.	17
1.1.2.2.- Factores del huésped.	17
1.1.2.3.- Factores del tumor.	18

1.2.- Acción de las radiaciones ionizantes sobre el pulmón.	18
1.2.1.- Fase inmediata.	20
1.2.1.1.- Cambios bioquímicos.	20
1.2.1.1.1.- Citoquinas.	22
1.2.1.1.2.- Otras sustancias.	22
1.2.1.2.- Cambios morfológicos.	23
1.2.2.- Fase precoz..	23
1.2.3.- Fase intermedia.	24
1.2.4.- Fase tardía..	25
1.3.- Acción de las radiaciones sobre la microvascularización.	25
1.3.1.- Parámetros radiobiológicos.	26
1.3.2.- Cronología.	26
1.3.3.- Alteraciones morfológicas.	26
1.3.4.- Alteraciones funcionales.	27
1.4.- El efecto lecho tumoral (“TBE”).	28
1.4.1.- Comportamiento de un tumor en lecho irradiado.	28
1.4.2.- Elementos modificadores.	29
1.5.- Metástasis en territorio irradiado.	31
1.5.1.- Estudios clínicos.	31
1.5.1.1.- Metastatización aumentada..	32
1.5.1.2.- Metastatización disminuida.	32
1.5.2.- Estudios experimentales.	32

1.5.2.1.- Metastatización pulmonar.	33
1.5.2.1.1.- Con irradiación corporal total.	33
1.5.2.1.2.- Con irradiación pulmonar total..	33
1.5.2.1.3.- Con irradiación de un pulmón.	35
1.5.2.2.- Metástatización a otros órganos..	35
2.- MATERIAL Y MÉTODOS.	36
2.1.-Método general.	37
2.1.1- Distribución en grupos.	38
2.1.1.1- Grupos de dosis.	38
2.1.1.2.- Grupos de intervalo radiación-inoculación.	38
2.1.1.3.- Nomenclatura.	39
2.1.1.4.- Grupos Control.	40
2.1.2.- Modelo metastásico.	41
2.1.2.1.- El melanoma B16.	41
2.1.2.2.- El melanoma B16 F10.	41
2.2.- Animales.	42
2.2.1.- La cepa C-57 BL6.	42
2.2.2.- Características de los incluidos a estudio.	42
2.2.2.1.- Características físicas.	42
2.2.2.1.1.- Edad.	42
2.2.2.1.2.- Peso.	43
2.2.2.2.- Mantenimiento y cuidados.	43
2.2.3.- Procedimiento anestésico.	45

Comentario [M1]:

2.3.- Irradiación.	45
2.3.1.- Aparato.	45
2.3.2.- Dispositivo.	46
2.3.3.- Dosimetría.	50
2.3.3.1.- Tasa de dosis.	50
2.3.3.2.- Medidas de homogeneidad.	50
2.3.3.3.- Medidas “in necro”.	52
2.3.3.4.- Cálculo dosimétrico.	54
2.3.4.- Procedimiento.	56
2.4.- Inducción de metástasis.	57
2.4.1- Mantenimiento de la línea celular.	57
2.4.1.1.- “In vivo”.	58
2.4.1.2.- “In vitro”.	58
2.4.2.- Preparación de viales.	59
2.4.2.1.- Método.	59
2.4.2.2.- Recuento.	60
2.4.2.3.- Test de viabilidad.	60
2.4.3.- Procedimiento de inoculación.	61
2.5.- Necropsia y obtención de datos.	63
2.5.1.- Protocolo de sacrificio y necropsia.	63
2.5.2.- Protocolo de cuantificación de metástasis pulmonares.	67
2.5.3.- Estudio microscópico.	70
2.6.- Evaluación de resultados.	71

2.6.1.- Manejo de datos. Normalización.	71
2.6.2.- Método estadístico.	73
3.- RESULTADOS .	75
3.1.- Datos globales.	76
3.1.1.- Animales valorables.	76
3.1.2.- Totales metastásicos.	79
3.2.- Metástasis pulmonares.	80
3.2.1.- Metástasis en pulmón irradiado frente a control.	80
3.2.1.1.- Toda la población.	80
3.2.1.2.- Grupos de dosis.	84
3.2.1.3.- Grupos de intervalo.	86
3.2.1.4.- Grupos de dosis e intervalo.	88
3.2.2.- Hallazgos microscópicos.	91
3.3.- Tamaño de las metástasis.	98
3.4.- Otros territorios.	103
3.4.1.- Infiltración extrapulmonar.	103
3.4.1.1.- Localizaciones.	103
3.4.1.2.- Correlaciones.	106
3.4.1.2.1.- Metástasis pleurales y pulmonares.	108
3.4.1.2.2.- Nódulos en rabo y metástasis linfáticas.	108
3.4.1.2.3.- Nódulos en rabo y metástasis pulmonares	108
3.4.1.2.4.- Metástasis linfáticas y pulmonares.	11

4.- DISCUSIÓN.	114
4.1.- Metodología.	115
4.1.1.- Dosimetría.	116
4.1.2.- Evaluación de resultados.	117
4.2.- Hallazgos.	118
4.2.1.- Número de metástasis pulmonares.	118
4.2.1.1.- Según dosis.	120
4.2.1.2.- Según intervalo.	121
4.2.2.- Tamaño de las metástasis.	121
4.2.3.- Estudio microscópico.	123
4.2.4.- Infiltración de otros tejidos.	124
4.3.- Repercusión clínica.	125
5.- CONCLUSIONES.	128
6.- BIBLIOGRAFÍA.	131