

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

ESTUDIO MORFOLOGICO DE LAS  
NEOPLASIAS PULMONARES IN VITRO

TESIS DOCTORAL

Ramón García Gómez  
Madrid , 1992

**Emilio Alvarez Fernandez, Profesor Titular del Departamento  
de Anatomia Patologica de la Facultad de Medicina de la  
Universidad Complutense de Madrid**

**CERTIFICA que habiendo leido en su redaccion final el trabajo  
titulado "ESTUDIO MORFOLOGICO DE LAS NEOPLASIAS PULMONARES IN  
VITRO", realizado bajo mi direccion por D. Ramon Garcia  
Gomez, este reúne las condiciones metodologicas y formales  
necesarias para ser leido y optar al Grado de Doctor**

**Y para que asi conste lo firmo en Madrid a 8 de mayo de 1992**



**Emilio Alvarez Fernandez**

**Atención Especializada.**  
**Area 7. MADRID**

HOSPITAL UNIVERSITARIO  
SAN CARLOS  
Martín Lagos, s/n  
28040 MADRID

Tel. (91) 544 15 00  
(91) 544 15 01



D. JULIAN SANZ ESPONERA, CATEDRATIDO Y DIRECTOR  
DEL DEPARTAMENTO DE ANATOMIA PATOLOGICA, UNIVER  
SIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

CERTIFICA que habiendo leído en su redacción fi-  
nal el trabajo titulado "ESTUDIO MORFOLOGICO DE  
LAS NEOPLASIAS PULMONARES IN VITRO", realizado  
en este Departamento por D. RAMON GARCIA GOMEZ,  
éste reúne las condiciones metodológicas y forma-  
les necesarias para ser leído y optar al Grado de  
Doctor.

Y para que conste, lo firmo en Madrid a 8 de mayo  
de 1.992.

Fdo.: Próf. Sanz Espnora

**DEDICATORIA:** *A mi esposa e hijos Ana, José Ramón y Julia,  
por su comprensión y estímulo. A mis padres.*

## **AGRADECIMIENTOS**

- Al Dr. D. Emilio Alvarez Fernández, con mi mejor consideración por su tutoría científica, ayuda incondicional y crítica constructiva. Por su constante dedicación y orientación en cada una de la fases de este trabajo, sin cuya supervisión hubiera sido imposible la materialización del mismo.

- Al Servicio de Anatomía Patológica del Hospital General Gregorio Marañón de Madrid en pleno, por su acogida y estimable cooperación que me han mostrado siempre, y especialmente la Dra. Ma. Dolores Díez Nau, D. Luis Rodríguez y Da. Magdalena Blanco.

- Al Dr. D. Juan Francisco del Cañizo López por su asesoramiento estadístico.

- A todos mis amigos por su apoyo y confianza.

## INDICE

**INTRODUCCION**

1.- Modificación de la incidencia de las principales causas de mortalidad. Descenso de las infecciones.....	1
2.- Incremento de los tumores malignos en España.....	3
3.- Incremento del cáncer de pulmon.....	8
4.- Incremento del cáncer de pulmón en España.....	10
5.- Momento evolutivo en que se diagnostica el cáncer de pulmón.....	11
6.- Resecabilidad del cáncer de pulmón. Hallazgos en la autopsia postoperatoria inmediata.....	15
7.- Supervivencia global del cáncer de pulmón y progresos en el tratamiento quimioterápico.....	18
8.- Fracaso de los programas de detección precoz.....	24
9.- Utilidad y aplicación de los cultivos de tumores en el cáncer de pulmón.....	25
10.- Importancia del cultivo de tejidos en la clasificación de las neoplasias pulmonares.....	30
11.- OBJETIVOS DE LA TESIS.....	34

**MATERIAL Y METODOS**

1.- OBTENCION DEL MATERIAL.....	36
2.- TRATAMIENTO DEL MATERIAL.....	37
2.A.- Tratamiento de las piezas para el cultivo de tejidos.....	38
2.B.- Tratamiento de las piezas para microscopía electrónica.....	40
2.C.- Tratamiento de las piezas para estudio histoquímico.....	41
2.D.- Tratamiento de las piezas para estudio inmunohistoquímico.....	42
3.- INTERPRETACION Y VALORACION DE LOS RESULTADOS	
3.A.- Clasificación histológica convencional de los tumores.....	43
3.B.- Valoración de los resultados del estudio ultraestructural.....	45
3.C.- Valoración de los resultados de la histoquímica enzimática.....	46
3.D.- Valoración de los resultados del cultivo de tejidos	
3.D.1.- Neoplasias epiteliales malignas.....	47
3.D.2.- Neoplasias no epiteliales.....	59

**HALLAZGOS****I.- NEOPLASIAS EPITELIALES MALIGNAS PULMONARES**

I.A.- Análisis global del crecimiento de los carcinomas.....	62
I.B.- Análisis del crecimiento según el tipo histológico de los carcinomas.	
I.B.1.- Carcinomas epidermoides.....	71

I.B.2.-Adenocarcinomas.....	71
I.B.3.- Carcinomas anaplásicos de células pequeñas.....	75
I.B.4.- Carcinomas anaplásicos de células gran- des.....	75
I.B.5.-Carcinomas indiferenciados.....	78
I.B.6.- Crecimiento de elementos no neoplási- cos.....	80
I.B.7.- Análisis estadístico de los resulta- dos.....	83

## II.- NEOPLASIAS NO EPITELIALES PULMONARES

### II.A.- TUMORES MESOTELIALES.

#### II.A.1.- Mesoteliomas monofásicos mesenquimales.

##### II.A.1.1.- Mesoteliomas fibrosos.....

##### II.A.1.2.- Mesoteliomas fibrosarcomato- sos.....

#### II.A.2.- Mesoteliomas epiteliales.....

### II.B.- ANGIOMA ESCLEROSANTE.....

### II.C.- GRANULOMA DE CELULAS PLASMATICAS.....

### II.D.- HAMARTOMA.....

### II.E.- NEOPLASIAS MUSCULARES BENIGNAS Y MALIGNAS

#### II.E.1.- Leiomioma pulmonar.....

#### II.E.2.- Leiomiosarcoma pulmonar.....

### II.F.- FIBROHISTIOCITOMA.....

### II.G.- MIOBLASTOMA DE CELULAS GRANULOSAS.....

**DISCUSION****I. - CULTIVO DE NEOPLASIAS EPITELIALES MALIGNAS PULMONARES****I.A. - CULTIVOS DE CARCINOMA PULMONAR EN EL LABORATORIO. -****I.A.1. - CULTIVOS IN VITRO**

- I.A.1.1. - Medios de cultivo líquidos.....135
- I.A.1.2. - Datos bibliográficos.....136
- I.A.1.3. - Colonia tumoral.....138
- I.A.1.4. - Influencia de la disgregación celular.....140
- I.A.1.5. - Crecimiento en agar blando.....143
- I.A.1.6. - Viabilidad de las células disgregadas.....144
- I.A.1.7. - Eficacia de clonación.....145
- I.A.1.8. - Contaminación de los cultivos..145
- I.A.1.9. - Período de latencia para el desarrollo de colonias tumorales.....146

**I.A.2. - CULTIVOS IN VIVO**

- I.A.2.1. - Introducción histórica.....149
- I.A.2.2. - Características inmunológicas del ratón atímico calvo.....153
- I.A.2.3. - Animales inmunodeprimidos artificialmente.....157
- I.A.2.4. - Datos bibliográficos
  - I.A.2.4.1. - Animal de experimentación..158
  - I.A.2.4.2. - Sexo.....159
  - I.A.2.4.3. - Edad.....159
  - I.A.2.4.4. - Vía de inoculación.....159

I.A.2.4.5.- Tipo de injerto.....	160
I.A.2.4.6.- Medios líquidos para el manejo del injerto.....	160
I.A.2.4.7.- Suspensiones celulares....	160
I.A.2.5.- Período de latencia en xenografías.....	161
I.A.2.6.- Definición de crecimiento tumoral en xenografías.....	161
I.A.2.7.- Características generales del crecimiento xenográfico tumoral.....	163

## I.B.- APLICACIONES EN EL LABORATORIO DE LOS SISTEMAS DE CULTIVO

### I.B.1.- ANALISIS DE QUIMIOSENSIBILIDAD

I.B.1.1.- Quimiosensibilidad en ensayos in vitro de corta duración.....	165
I.B.1.1.1.- Disgregación celular.....	165
I.B.1.1.2.- Esferoides.....	166
I.B.1.1.3.- Biología del esferoide....	168
I.B.1.1.4.- Valoración de citotoxicidad en los esferoides.....	169
I.B.1.2.- Quimiosensibilidad en el ensayo clonogénico.....	172
I.B.1.2.1.- El ensayo "Stem cell".....	172
I.B.1.2.2.- Validez del modelo "Stem cell".....	173
I.B.1.2.3.- ¿Qué se entiende por quimiosensibilidad en el ensayo "Stem cell"?....	174
I.B.1.2.4.- Problemas técnicos del ensayo "Stem cell".....	175
I.B.1.2.5.- Utilidad del ensayo no clono-	

génico para la valoración de quimiosensibilidad.....	177
I.B.1.2.6.- Resumen.....	178
I.B.1.3.- Xenografías en el ensayo con citostáticos	
I.B.1.3.1.- Valor científico.....	179
I.B.1.3.2.- Factores que influyen en la valoración xenográfica (índice de prendimiento, estado inmunitario, volumen xenográfico, aceleración del crecimiento).....	180
I.B.1.3.3.- Limitaciones de la valoración de quimiosensibilidad en el laboratorio in vivo (RCE, dosis del citostático, estado inmunitario latente del huésped, FRV).....	182
I.B.1.3.4.- Quimiosensibilidad en xenografías de cáncer de pulmón.....	185
I.B.1.3.5.- Resumen.....	186
I.B.2.- APLICACION DE LOS SISTEMAS DE CULTIVO EN EL ESTUDIO DE LA BIOLOGIA DEL CANCER DE PULMON	
I.B.2.1.- Evaluación de productos biológicos en el cultivo de tejidos.....	187
I.B.2.1.1.- Producción hormonal.....	187
I.B.2.1.2.- Marcadores tumorales del carcinoma de pulmón de células pequeñas.....	189
I.B.2.1.3.- Enzimas polimórficos.....	190
I.B.2.1.4.- Otras sustancias con actividad biológica.....	190
I.B.2.2.- Estudios de cinética celular en cultivo de tejidos.....	191
I.B.2.3.- Estudios citogenéticos en cultivo de tejidos.....	192
I.B.2.4.- Otras aplicaciones del cultivo de	

tejidos.....	196
I.B.2.4.1.- Valoración de la actividad antineoplásica de sustancias no citotáticas.....	196
I.B.2.4.2.- Análisis del comportamiento biológico de las líneas celulares y establecimiento de subgrupos histológicos (carcinoma de pulmón de células pequeñas).....	196
I.C.- ANALISIS COMPARATIVO ENTRE DISTINTOS SISTEMAS DE CULTIVO IN VIVO E IN VITRO Y EL METODO DE KERSTING, APLICADO A LAS NEOPLASIAS EPITELIALES MALIGNAS PULMONARES.-	
I.C.1.- VENTAJAS.-.....	200
I.C.2.- RENTABILIDAD.....	201
I.C.3.- CARACTERISTICAS COMPARADAS DEL METODO DE KERSTING.....	204
I.C.4.- CONSECUENCIAS.....	216
II.- CULTIVO DE NEOPLASIAS NO EPITELIALES PULMONARES	
II.A.- TUMORES MESOTELIALES.-	
II.A.1.- Mesoteliomas monofásicos mesenquimales.....	218
II.A.1.1.- Mesoteliomas fibrosos.....	218
II.A.1.2.- Mesoteliomas fibrosarcomatosos.....	222
II.B.- ANGIOMA ESCLEROSANTE.....	230
II.C.- GRANULOMA DE CELULAS PLASMATICAS.....	235
II.D.- NEOPLASIAS MUSCULARES BENIGNAS Y MALIGNAS	
II.D.1.- Leiomioma.....	239
II.D.2.- Leiomiosarcoma.....	240
II.E.- FIBROHISTIOCITOMA.....	241

II.F.- MIOBLASTOMA DE CELULAS GRANULOSAS..... 242

**CONCLUSIONES**

I.- NEOPLASIAS EPITELIALES MALIGNAS PULMONARES..... 244

II.- NEOPLASIAS NO EPITELIALES PULMONARES..... 246

**BIBLIOGRAFIA.** ..... 248

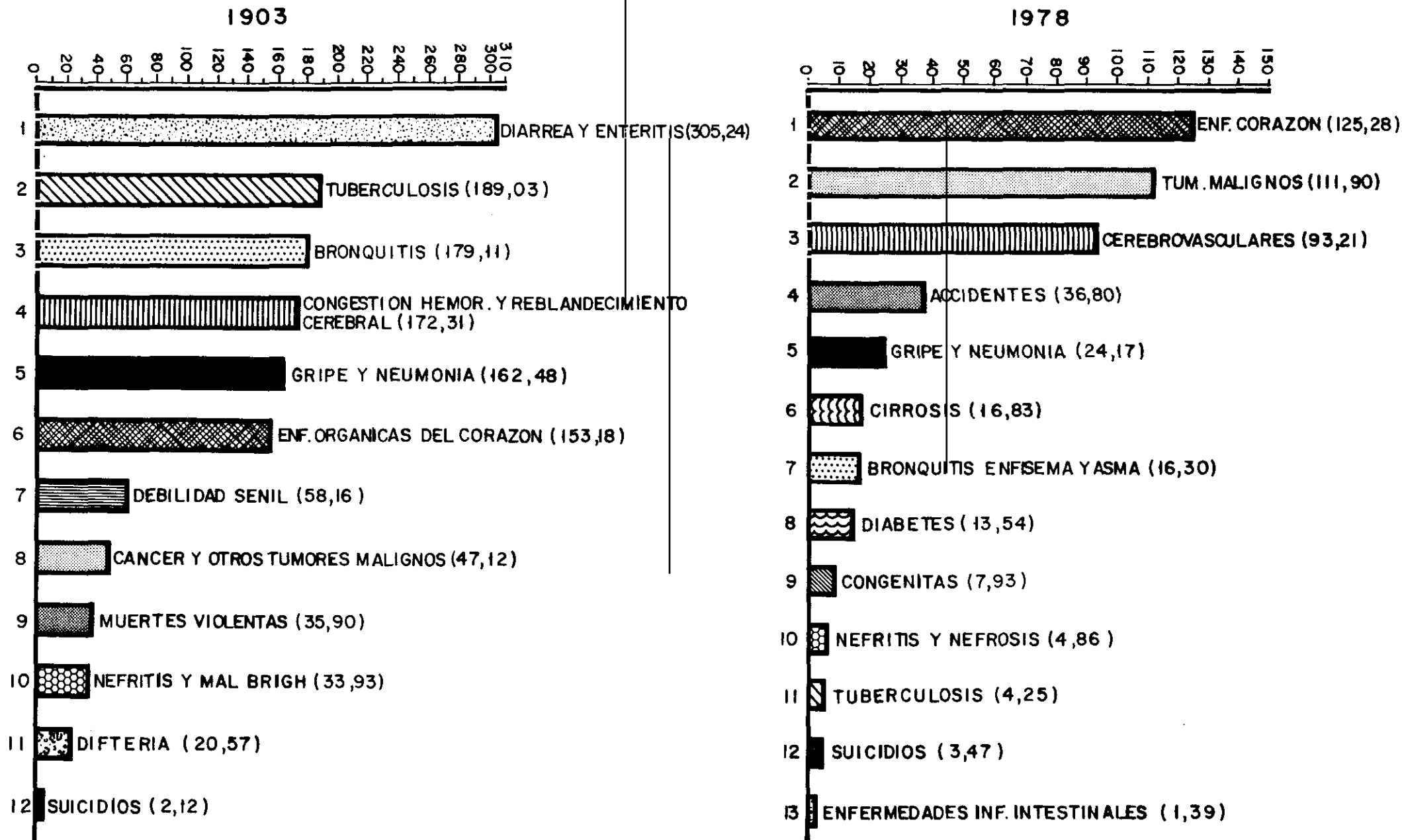
## **introducción**

## INTRODUCCION

### **1.-Modificación de la incidencia de las principales causas de mortalidad. Descenso de las infecciones**

A lo largo del siglo actual se ha producido una modificación sustancial en las causas de mortalidad en nuestro país, que pueden ser seguida muy claramente en los datos proporcionados por el Instituto Nacional de Estadística (Fig 1). En ellos, se puede observar cómo en la primera década del siglo las infecciones constituían las tres primeras causas de defunción, en tanto que las neoplasias ocupaban el octavo lugar. En la última década, por el contrario, las dos causas de muerte más importantes en España son las enfermedades cardiovasculares y los tumores malignos (1). Esta modificación es consecuencia de las mejoras terapéuticas y de los avances en los métodos de diagnóstico. Un ejemplo claro de esta situación lo constituye la tuberculosis, que de ser la segunda causa de mortalidad en la población española ha pasado a ocupar el lugar número once de la lista (Fig. 1).

# MORTALIDAD EN ESPAÑA



ELABORACION: Subdirección Gral. de Vigilancia Epidemiológica (Ministerio de Sanidad y Consumo)  
 FUENTE: Anuario Estadístico  
 POBLACION: 1940

FIG. 1

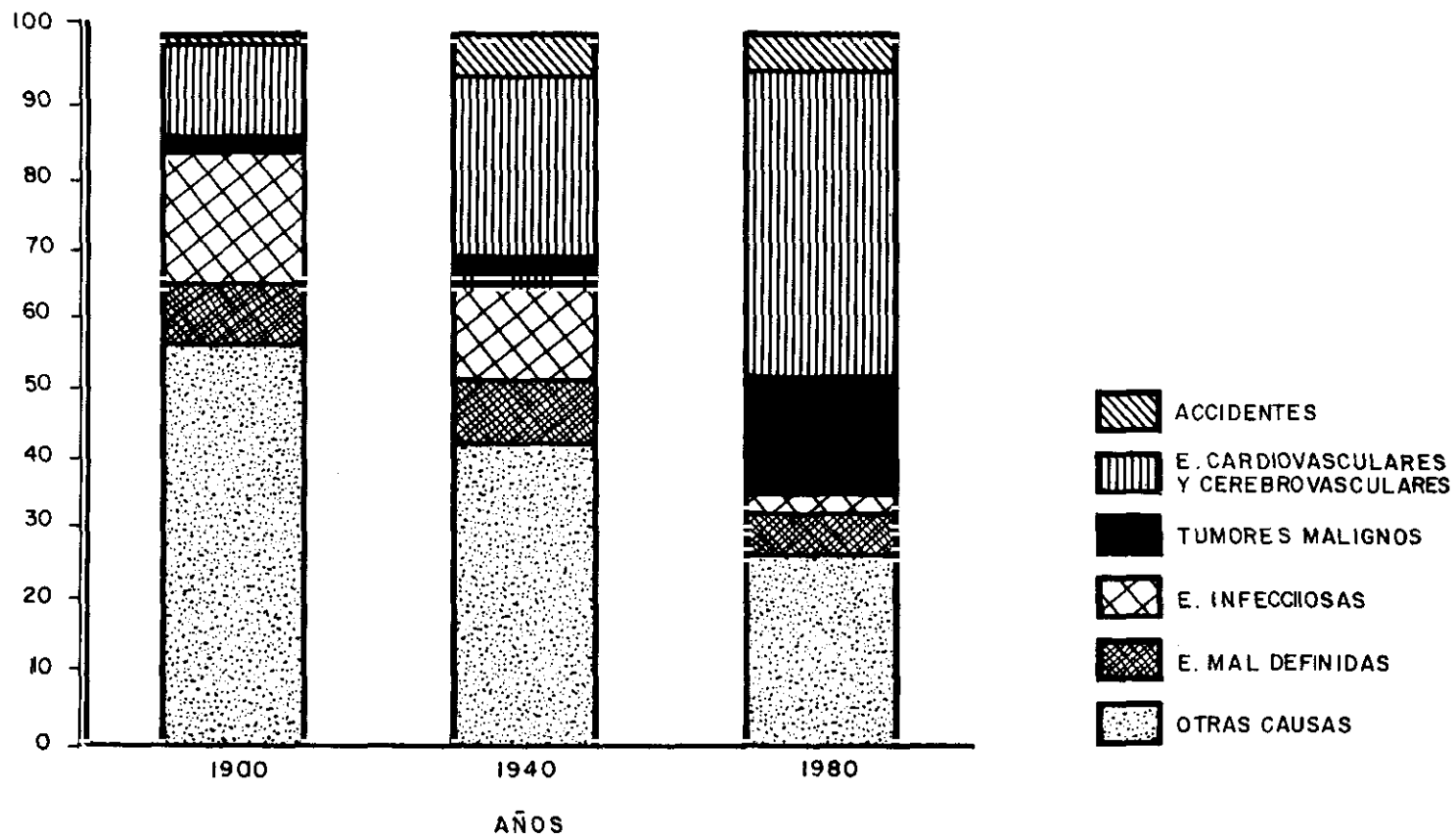
**2.-Incremento de los tumores  
malignos en España.**

Frente al descenso de la patología infecciosa hemos asistido a un incremento real de otro grupo de enfermedades, las neoplásicas (Fig 1 y 2). Entre 1900 y 1980 la tasa de mortalidad por 100.000 habitantes por tumores malignos en varones se ha incrementado 4,5 veces y en hembras 2,6 veces (2), representado en el año 1980, respectivamente un 22 y un 18% de todas las causas de muerte (Fig.3, Tabla I).

**TABLA I**

Año	VARONES		HEMBRAS	
	Tasa bruta	Tasa estandar.	Tasa bruta	Tasa estandar.
1900	40.34	43.23	48.80	57.73.
1910	45.75	48.87	54.91	64.48
1920	55.35	59.14	62.12	72.26
1930	67.02	72.59	72.00	82.57
1940	65.64	68.54	65.08	71.07
1950	76.33	76.16	73.33	73.15
1960	124.19	113.00	108.03	97.84
1970	149.43	122.98	119.40	97.87
1980	184.27	141.37	127.58	96.57

*Estandarización según población de 1950*



**MORTALIDAD PROPORCIONAL EN ESPAÑA**

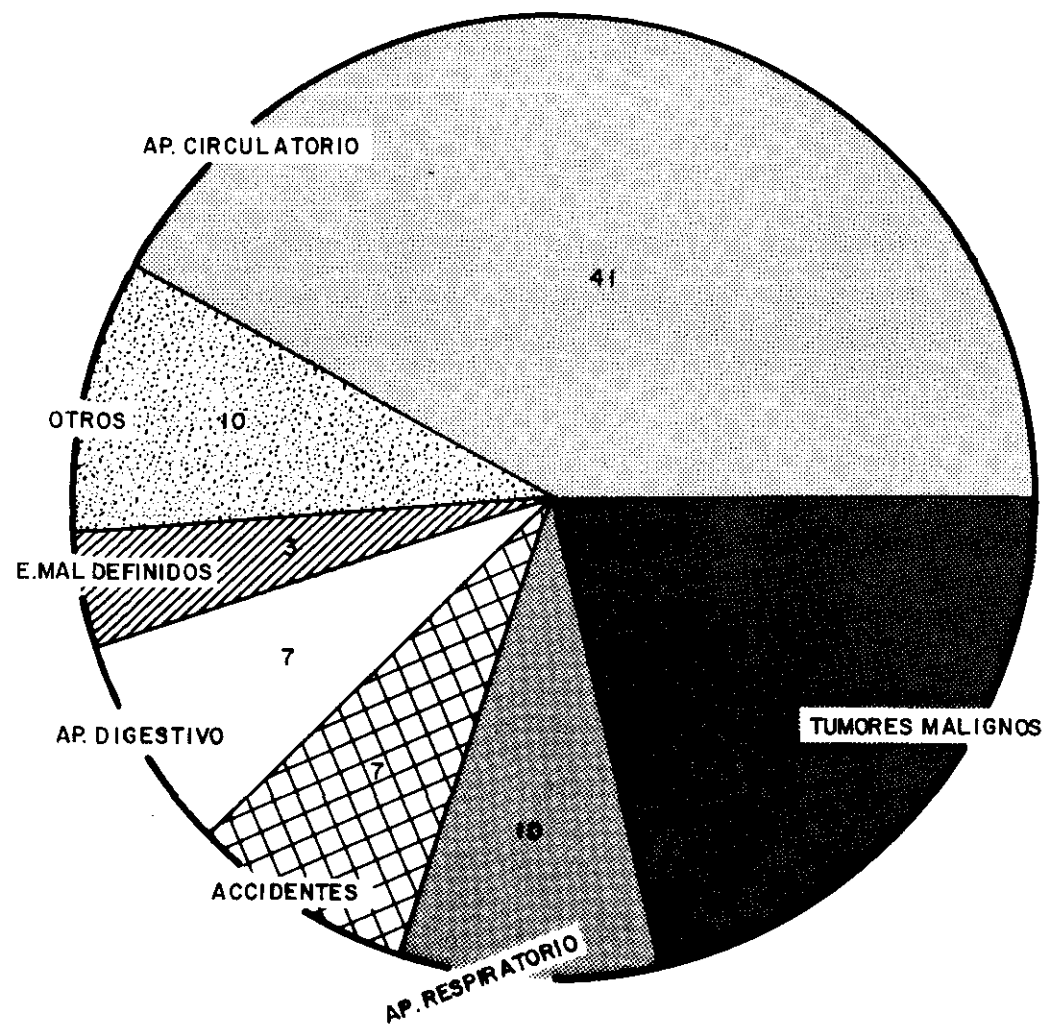
FUENTE: Movimiento Natural de Población I.N.E

FIG. 2

# MORTALIDAD EN ESPAÑA, 1980

EN PORCENTAJES DEL TOTAL

## HOMBRES



## MUJERES

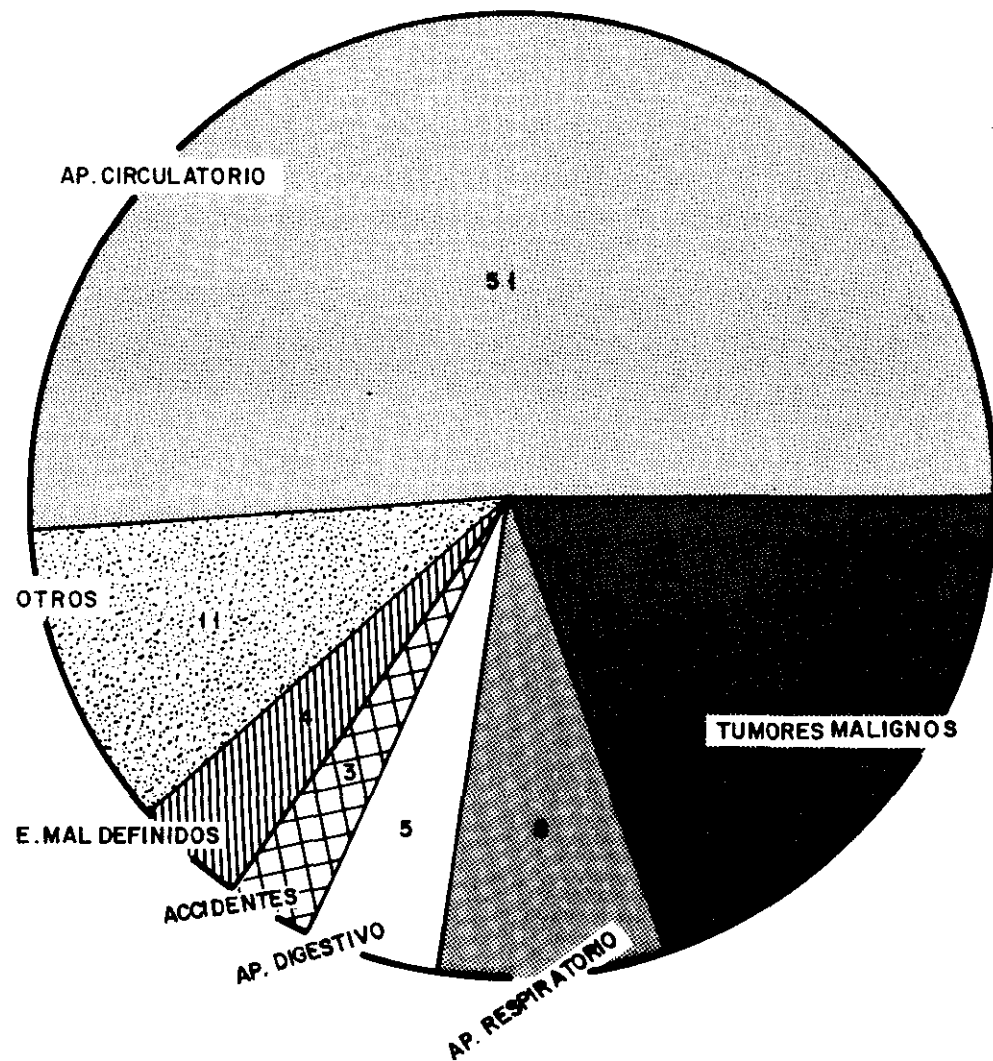


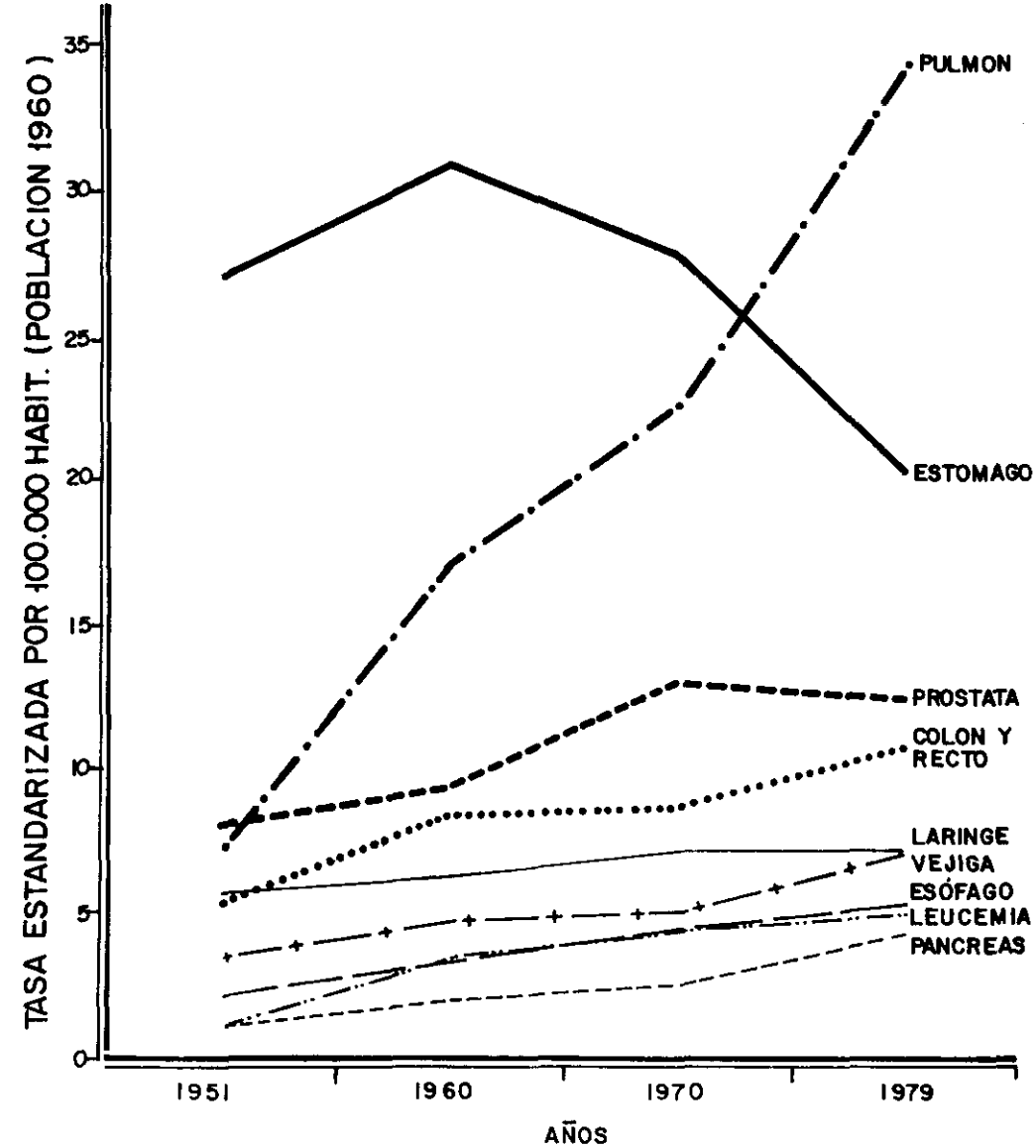
FIG. 3

En los países de la CEE se ha producido una evolución similar pero con cifras aún más altas. En el año 1985 la tasa de mortalidad por 100.000 habitantes en varones se sitúa por encima de 200 en Escocia, Francia, Luxemburgo y Bélgica, este último país con una cifra de 211,5 . En ese mismo año sólo dos países europeos, Grecia y Portugal, con unas cifras de 144,9 y de 137, se encuentran por debajo de España, 151. En el resto de los países de la CEE oscila entre 170 y 200 varones muertos por 100.000 habitantes. Las cifras en hembras son netamente inferiores, con un máximo de 136,5 en Dinamarca y Escocia, estando por debajo de 100 muertes anuales Francia, Portugal, Grecia y España (3).

El incremento de mortalidad no se ha producido por igual en todos los tipos de tumores, ni tampoco en ambos sexos. En el varón éste se debe fundamentalmente al cáncer de pulmón, en tanto que el más moderado aumento en la mujer es debido al cáncer de mama (Fig. 4). Es importante señalar que, junto al aumento de ciertas neoplasias, ha existido una disminución de otras, como el carcinoma gástrico, que muestra una tendencia descendente muy acusada (1).

**ESPAÑA (VARONES)**  
**MORTALIDAD CANCER 1951-1979**

TASAS ESTANDARIZADAS POR 100000 HABITANTES



**ESPAÑA (MUJERES)**  
**MORTALIDAD CANCER 1951-1979**

TASAS ESTANDARIZADAS POR 100000 HABITANTES

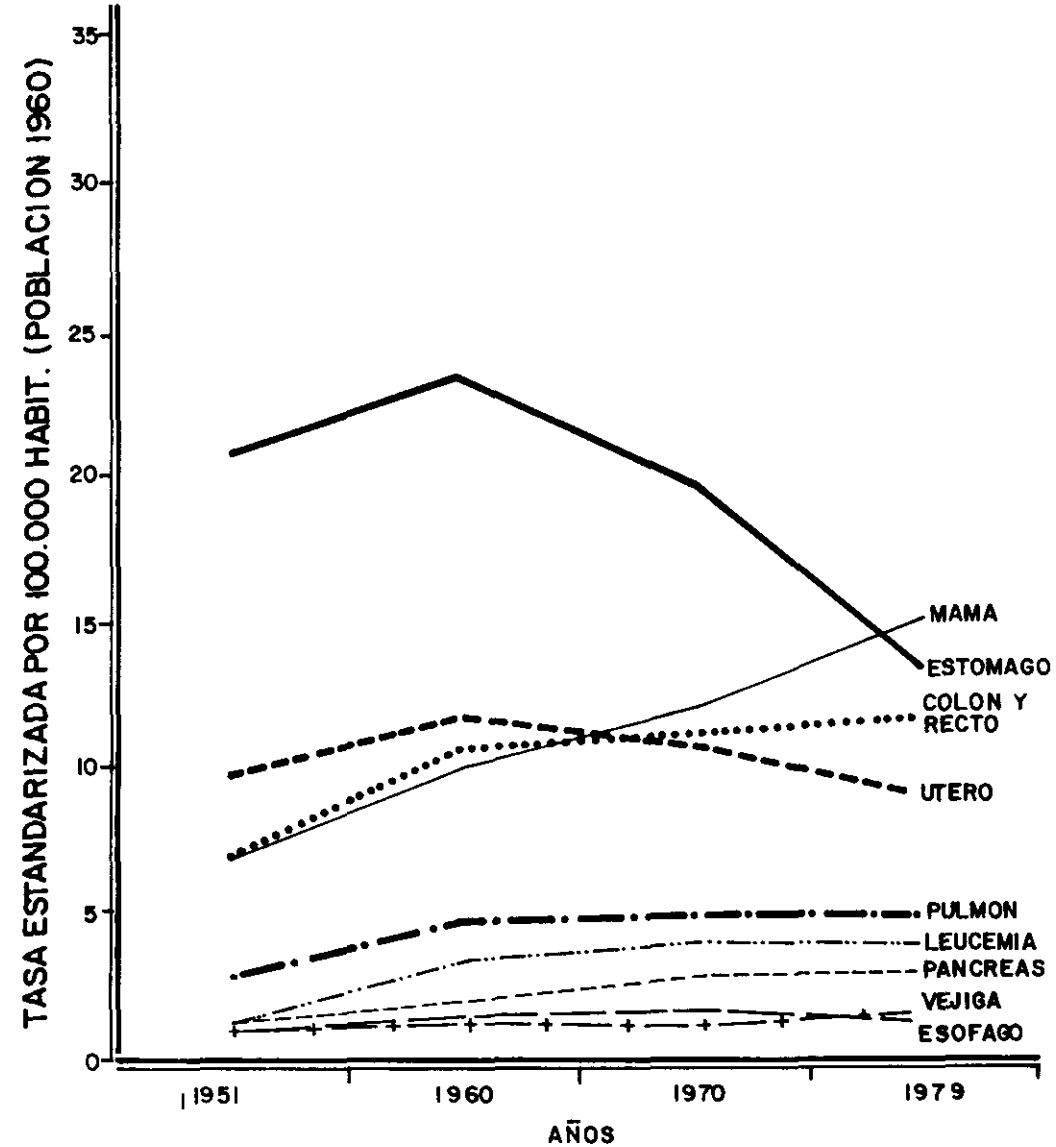


FIG. 4

### **3.-Incremento del cáncer de pulmón**

Haciendo referencia concreta ya al cáncer broncopulmonar, proceso raro hace cincuenta años, puede afirmarse que constituye hoy un grave problema de salud pública en España y otros países industrializados. En nuestro país, según datos de INE referidos al año 1983, de un total de 302.569 defunciones, 11.328 se debieron a los carcinomas de pulmón, es decir un 3,74% del total, representando la primera causa de muerte en el varón. En Europa estas neoplasias originan el 30% del total de los fallecimientos por cáncer en el varón. En la mujer el cáncer de mama alcanza un 17% de todas las muertes por cáncer (3).

En EEUU la tasa de mortalidad por carcinomas de pulmón se duplica, en ambos sexos, aproximadamente cada quince años (4). Constituye la primera causa de muerte por cáncer en varones de más de 35 años y la segunda en las mujeres de edades comprendidas entre 35 y 74 años, siendo responsable en 1980 del 22% de todos los tumores malignos epiteliales masculinos y del 8% de los femeninos (4). En los últimos 50 años el cáncer bronquial se ha incrementado de manera constante (Fig. 5), frente al descenso del carcinoma gástrico y la estabilización de otros tumores malignos (5).

**TASAS DE MORTALIDAD POR 100.000 HABITANTES**  
**EN LOS ESTADOS UNIDOS.**

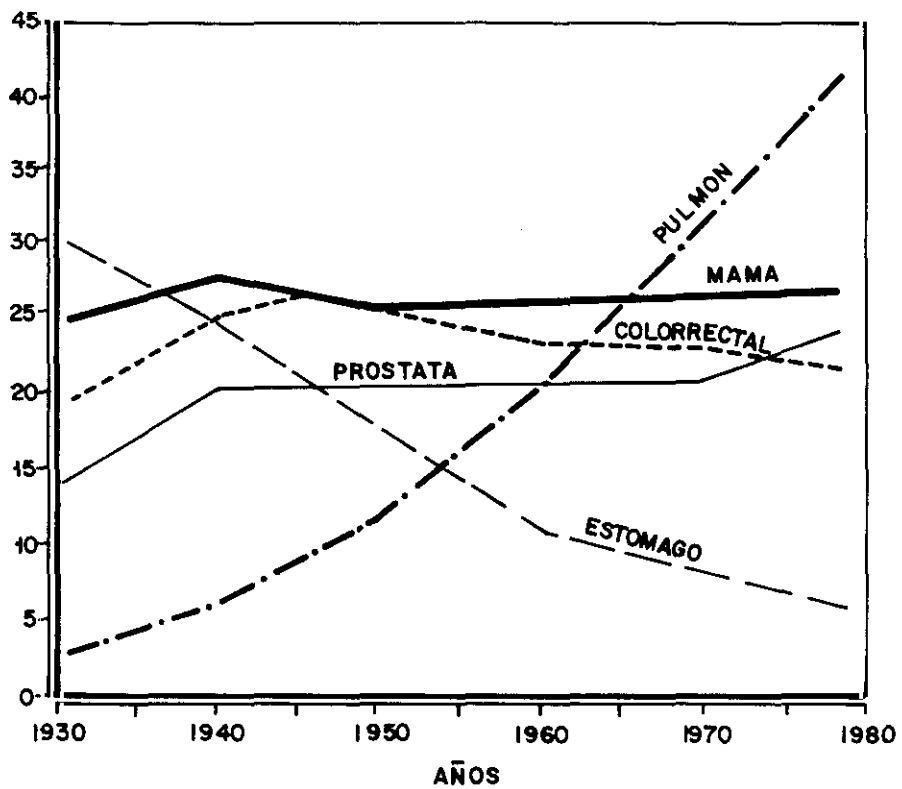


FIG. 5

Un hecho similar se ha observado en otros países. Gsell (6) señaló que las neoplasias malignas bronquiales habían aumentado en Suiza 50 veces desde 1900, en tanto que el resto de los tumores malignos solamente se habían duplicado. En Formosa en 30 años, se había incrementado su incidencia 10 veces (7), mientras que en el Japón se han triplicado en 10 años (8).

#### 4.-Incremento del cáncer de pulmón en España

En España la mortalidad por cáncer bronquial en varones casi se ha cuadruplicado desde 1956 a 1984 (2) (Tabla II), con un incremento constante en varones y una estabilización, al menos momentánea, en hembras (Fig. 4).

TABLA II

Año	Mortal. por cancer bronq.	x100.000 var.	x100.000 hemb.
1956	2.391	12.8	3.7
1961	3.326	17.7	4.2
1966	4.246	21.8	4.9
1971	5.414	26.7	5.6
1976	7.040	34.5	5.4
1981	9.486	44.9	6.0
1982	9.828	46.5	6.0
1983	10.328	48.4	6.4
1984	10.935	51.8	5.9

De seguir así la situación se estima, que para los años noventa, la tasa de mortalidad en varones podría ser de 70,7 por 100.000 habitantes (9) (Fig 6). Dentro de nuestro propio país la distribución de incidencia no es uniforme y así, siempre manejando cifras referidas a varones, éstas oscilan entre 32.4 por 100.000 en Tarragona y 64.13 por 100.000 en Asturias (Fig. 7), (1).

Debe señalarse que el aumento de esta grave enfermedad no se explica sólo por una mejora de los medios diagnósticos y terapéuticos, que en general, al hacer retroceder algunas patologías, permitiría sobresalir otros grupos de entidades nosológicas más difícilmente curables. El ascenso progresivo de la incidencia del cáncer de pulmón es real y constituye un problema sanitario de primer orden, sobre todo al tomar en consideración su comportamiento biológico que brevemente analizaremos a continuación.

#### **5.-Momento evolutivo en que se diagnostica el cáncer de pulmón**

En general, el cáncer de pulmón constituye un proceso que suele ser diagnosticado en estadios evolutivos muy avanzados, circunstancia que deriva de la propia biología del tumor, ya que

# MORTALIDAD POR CANCER BRONQUIAL EN VARONES

MORTALIDAD REAL 1956 - 1976

PREDICCIONES 1981 - 1991

AJUSTE POR MINIMOS CUADRADOS  $Y = 13,34 e^{0.238257t}$

$r = \text{Instrós}$   
 $r^2 = 0.9894$

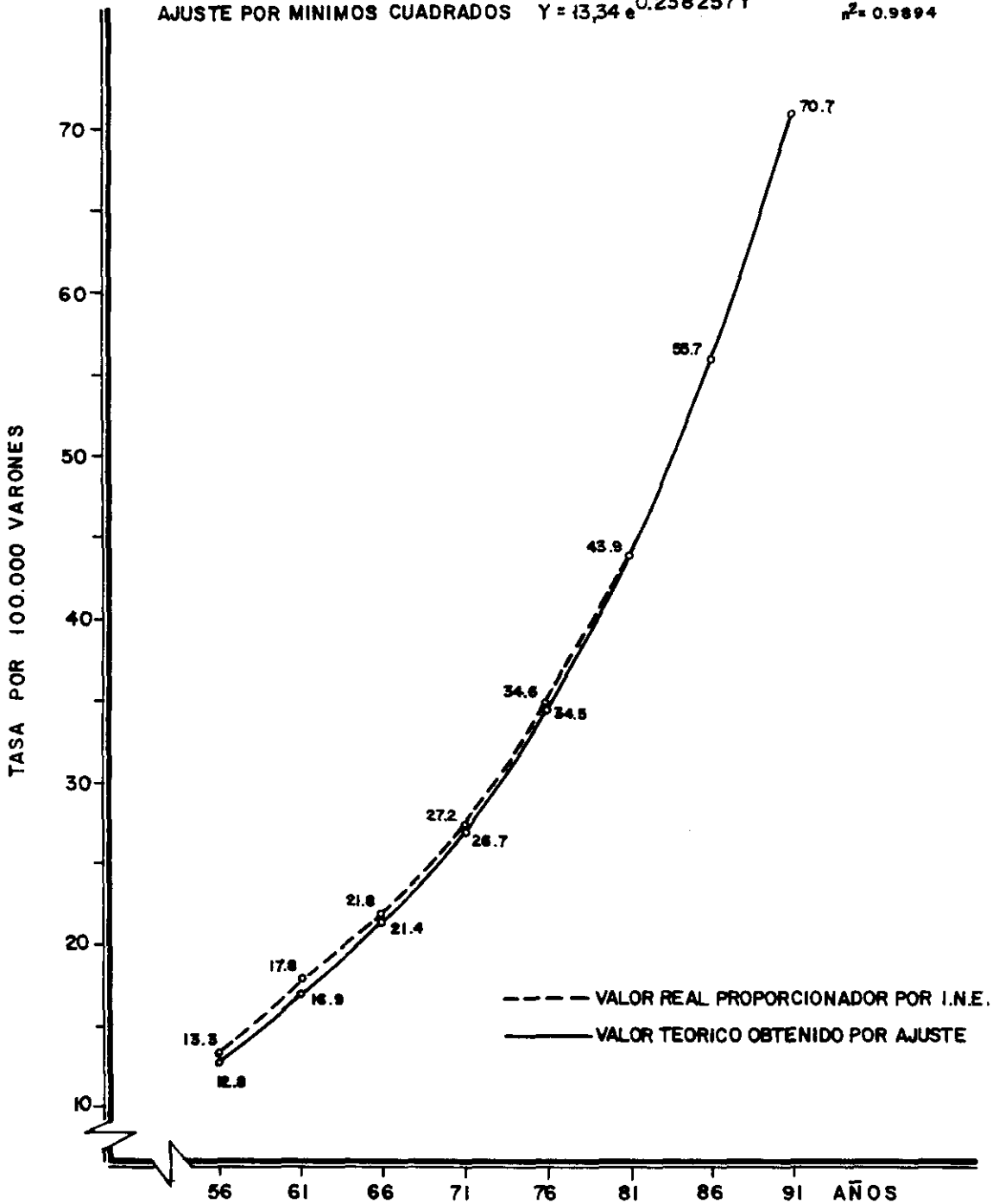
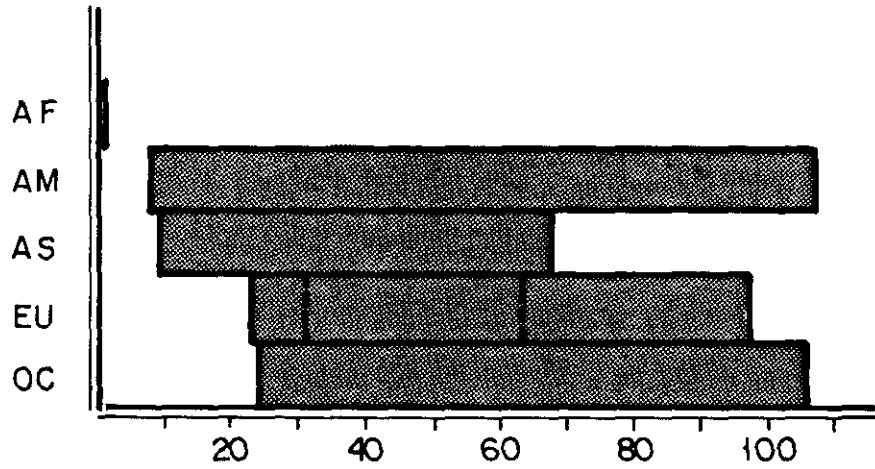


FIG. 6

**INCIDENCIA COMPARADA ENTRE REGISTROS  
NACIONALES 1980-1983 Y LOS OTROS RE-  
GISTROS DEL MUNDO 1973-1977.**

**CA . BRONQUIAL**



**| SITUA LAS TASAS NACIONALES 1980-1983  
CADA BARRA INDICA LOS VALORES MAXIMO Y MINIMO PARA CADA  
CONTINENTE:  
AF (AFRICA), AM (AMERICA), AS (ASIA), EU(EUROPA), OC (OCEANIA)**

**FIG. 7**

en ese momento la mayoría de las duplicaciones de la vida tumoral han sucedido (10). Una célula de 10 micras necesita veinte duplicaciones para formar un nódulo de 1 mm., con 10 duplicaciones más se formaría un nódulo de 1 cm., conteniendo 10.000.000.000 de células, con un peso aproximado de 1 gramo. Estaríamos ante un tumor realmente pequeño, resecable y en teoría curable, pero en esa época tan temprana pueden existir ya metástasis, que dependiendo del estado inmunológico del paciente, de la propia histología del tumor y del tejido anidado, las células podrían ser aniquiladas, quedarían en estado de latencia, o prosperarían desde un principio. Por tanto, las metástasis pueden hacer su debut incluso en las primeras etapas de la enfermedad subclínica. En consecuencia, en este tumor es arriesgado hablar de diagnóstico precoz.

En una revisión de casi un millar de carcinomas de pulmón, que motivó la tesina del autor en el año 1978, se comprobó cómo el retardo desde el inicio de los síntomas de la enfermedad hasta la primera consulta médica, no superaba los tres meses en el 60% de las ocasiones. Sin embargo, el estadio clínico en que llegaban los pacientes era muy avanzado, con un 75% en estadio III, un 8% en el II y, finalmente, un 17% en el I. Una nueva revisión efectuada años más tarde demostró exactamente lo mismo, el estadio de presentación de este tumor en el momento del diagnóstico es habitualmente avanzado (11), en el que las posibilidades quirúrgicas están sobrepasadas.

En un estudio monográfico reciente en nuestro país sobre carcinoma de pulmón, se señala que solamente un 20% de los casos son candidatos a cirugía radical (12).

Esta experiencia es prácticamente universal, y así en los Estados Unidos múltiples publicaciones también señalan que la mayoría de los pacientes, cuando es efectuado el diagnóstico de la enfermedad, son incurables por cirugía (13). De éstos, aproximadamente un 20% llegarían en estadio I, que deberían ser tratados por cirugía sola, un 30% tendría enfermedad localmente más avanzada, algunos de los cuales pueden ser resecados pero con una baja probabilidad de curación. Por fin, el resto sería técnicamente irresecable (14).

Datos similares señala Minna (15), con un 17% de los pacientes con enfermedad localizada, un 22% con diseminación regional y un 48% con metástasis a distancia en el momento del diagnóstico.

#### **6.- Resecabilidad del cáncer de pulmón. Hallazgos en la autopsia postoperatoria inmediata**

El concepto de que un paciente sea operable no implica necesariamente que por la intervención vaya a ser resecado el tumor y en principio curado. Parece claro que las neoplasias de pulmón con histología de células pequeñas deben ser tratados con quimioterapia, en ellos la cirugía juega un

pequeño papel fundamentalmente diagnóstico o paliativo. Por el contrario, en todas las demás variedades de carcinomas de pulmón el tratamiento de elección es la cirugía, pero no en cualquier estadio. En estadios I y II la terapia intervencionista es la indicación. La supervivencia a 5 años tras la resección quirúrgica en estadio I patológico es idéntica en todo el grupo de carcinomas no células pequeñas y superior a un 60%. Sin embargo, en el estadio II los epidermoides sobreviven más que el adenocarcinoma y que el anáplásico de células grandes, aproximadamente 40% frente a casi 20% (16). En todos los casos hay una pérdida constante de enfermos durante los 20-30 primeros meses, con una estabilización de las curvas de supervivencia posteriormente, siendo ésto un indicador de curación potencial (17).

El factor individual más importante de los pacientes sometidos a una resección curativa es la presencia o ausencia de afectación ganglionar, disminuyendo drásticamente la supervivencia a cinco años al estar comprometidos los ganglios hiliares de un 46 a un 33 %, y a un 8% si existe afectación mediastínica (18).

En conjunto el tratamiento quirúrgico en los carcinomas no células pequeñas consigue un 85% de curaciones a 5 años en el estadio I (19). En el estadio II la curabilidad desciende al 40% (20) y en los estadios III oscila entre un 40 y un 26 % (19,21). Pero si consideramos globalmente todos los estadios, sólo un 30 % de los pacientes sometidos a cirugía curativa sobreviven a los

5 años, descendiendo a un 15 % a los 10 años (22). Estos mismos datos se comprueban en las cifras publicadas previamente de nuestro material de revisión (11).

La escasa curabilidad obtenida en el estadio III hace coger con cautela la indicación quirúrgica en estos casos. Mountain (23), entre otros, con el fin de rescatar pacientes con cirugía en el estadio III, con buen pronóstico, intentó reclasificar este estadio en III a y III b (ambos localmente avanzados por la T y/o la N) y el IV (metastásico). De esta forma, se comprueba que el carcinoma epidermoide se comporta de manera algo diferente a la del grupo del adenocarcinoma y carcinoma de células grandes. La supervivencia a cinco años en el grupo epidermoide estadio III A, es de un 15%, mientras que para los estadios III B y IV, es del 0%. Sin embargo, en el grupo adenocarcinoma/células grandes, los estadios III A y III B tienen una supervivencia superponible, inferior al 5%, con un 0% para los estadios IV (24).

Por otra parte, en el 16% de los casos resecaos los pacientes tienen enfermedad microscópica (17). Incluso en aquellos en los que ni el cirujano ni el patólogo sospechan que haya quedado enfermedad residual, cerca del 50% de los pacientes, que sobreviven a la operación, mueren en los dos años siguientes por recidiva tumoral o enfermedad metastásica. Este porcentaje aumenta siempre con el estadio y es peor para el adenocarcinoma con respecto al epidermoide.

De otra parte, de los pacientes operados que sobreviven cinco años, el 25% fallecen con cáncer de pulmón (25).

Por todas estas razones la cirugía tampoco ofrece las garantías suficientes de curabilidad de los carcinomas pulmonares.

#### **7.- Supervivencia global del cáncer de pulmón y progresos en el tratamiento quimioterápico**

En definitiva, el cáncer de pulmón está formado por un grupo heterogéneo de subgrupos histológicos repartidos entre un 19 a un 25 % de carcinomas anaplásicos de células pequeñas (26,27) y un 75 % restante, integrado obviamente, por los carcinomas pulmonares no de células pequeñas (epidermoides, adenocarcinomas, indiferenciados de células grandes). Como ya hemos dicho esta subdivisión es consecuencia del tratamiento específico a emplear. Para los carcinomas anaplásicos de células pequeñas la terapia de elección es la poliquimioterapia, pero a pesar de los buenos resultados iniciales con índice de respuestas en regímenes agresivos entre un 70 y un 90%, la recidiva es la norma y la supervivencia libre de enfermedad a 3 años es del 5 al 10 % (28).

Entre los fármacos más eficaces hay que señalar la ciclofosfamida, etopósido, cis-platino, adriamicina, vincrisul, con respuestas en monoterapia superiores al 30% (29).

Para el grupo de los carcinomas pulmonares no células pequeñas la elección terapéutica es la cirugía, con los índices señalados anteriormente en función de los distintos estadios. Pero este tipo de tratamiento sólo se puede ofrecer a un escaso número de pacientes, bien por contraindicaciones médicas o por el estado avanzado de la enfermedad en el momento del diagnóstico. Esta terapéutica proporciona un beneficio real en los estadio I y II, los menos, y dudoso en el III y IV.

Por estas razones son interesantes los ensayos de terapéuticas adyuvantes y neoadyuvantes a la cirugía.

Los ensayos randomizados con quimioterapia adyuvante a la cirugía en adenocarcinomas y células grandes, estadios II y III demuestran que ésta es efectiva, prolongando la supervivencia libre de enfermedad frente a la inmunoterapia sola. En carcinomas epidermoides estadios II y III que, después de ser intervenidos, son tratados con radioterapia, ésta no influye en la supervivencia, pero sí en un mayor control de la enfermedad local, disminuyendo las recidivas torácicas (30).

Aunque está controvertida la utilización adyuvante a la cirugía de quimioterapia más radioterapia, en otro nuevo ensayo

prospectivo randomizado se ha demostrado menos incidencia de recidivas locales y generales, así como menor mortalidad a favor de la modalidad combinada. Diferencias con significación que desaparecen después del primer año (31).

No son pocos los ensayos efectuados de forma neoadyuvante a la cirugía. Con quimioterapia e irradiación previa a la intervención quirúrgica, Eagan pudo conseguir resección completa en el 33 % de los pacientes que antes eran irresecables, pero no pudo obtener diferencias significativas en supervivencia entre los que fueron operados o no, persistiendo como mayor problema las metástasis a distancia (32).

Otros ensayos con quimioterapia sola son algo más optimistas, afirmando índices de respuesta alta entre un 40% y un 60%, sin embargo el impacto en la supervivencia es modesto (33).

Los agentes quimioterápicos más útiles en los carcinomas pulmonares no células pequeñas son aquellos que tienen una efectividad superior al 15%, concretamente el cis-platino, alcaloides de la vinca (Vindesina y Vinblastina), mitomicina C e Ifosfamida (34).

La radioterapia como modalidad de tratamiento del carcinoma de pulmón no células pequeñas ofrece un índice de curación bajo, del 1 al 5% a los 5 años (35). Actualmente, casi todos los

ensayos ponen en evidencia que la radioterapia pre o postoperatoria no beneficia la supervivencia, pues aunque puede aumentar el control local, en la mayoría de los casos hay un fracaso del control de las metástasis a distancia, obteniendo una supervivencia en estadio tanto I como II algo superiores a un 5% (36).

En resumen, la supervivencia global del carcinoma de pulmón, considerando todas las variedades histológicas, así como el conjunto de modalidades terapéuticas aisladas o combinadas, continúa hoy día siendo pobre, no superando en general un 5% a los 5 años después del diagnóstico (Figs. 8a y 8b) (37).

TARRAGONA 1980-1985  
INCIDENCIA Y MORTALIDAD  
ESPECIFICAS POR EDAD  
BRONQUIO. HOMBRES

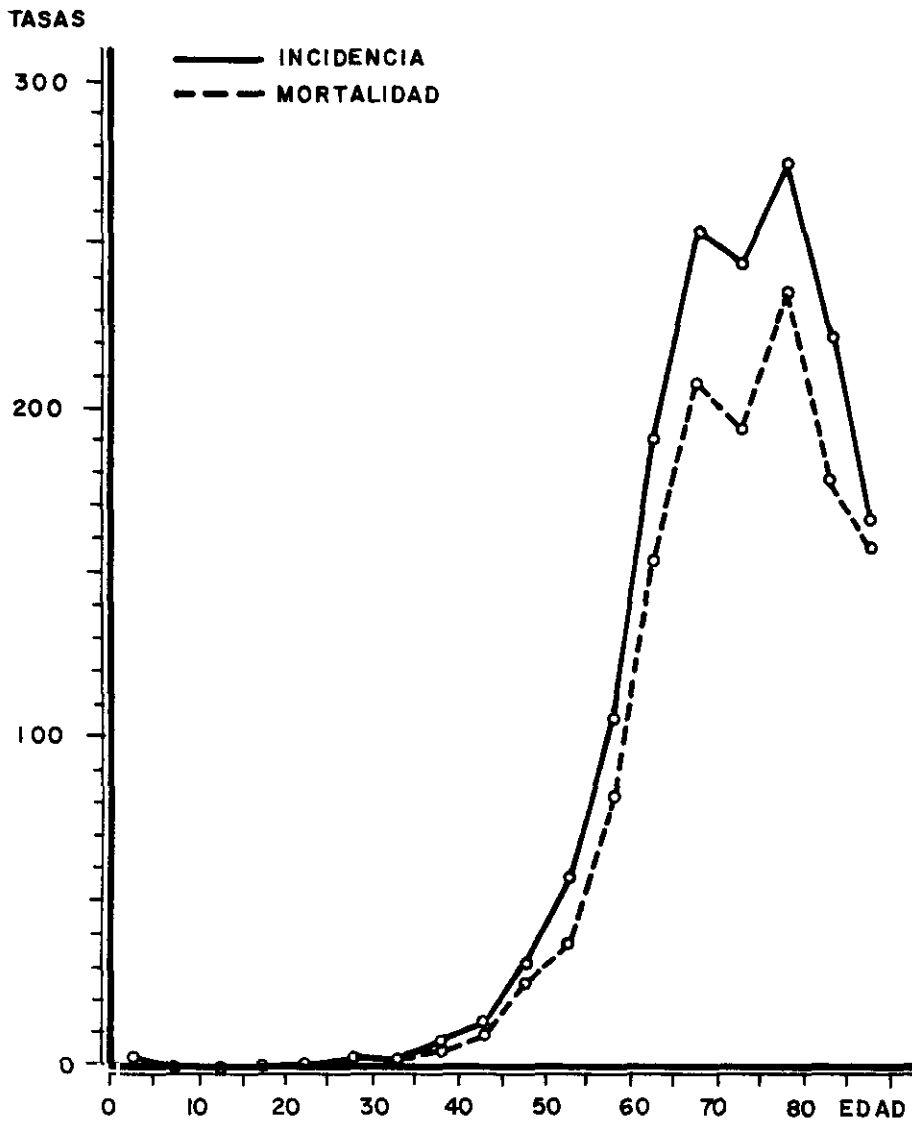


FIG. 8-A

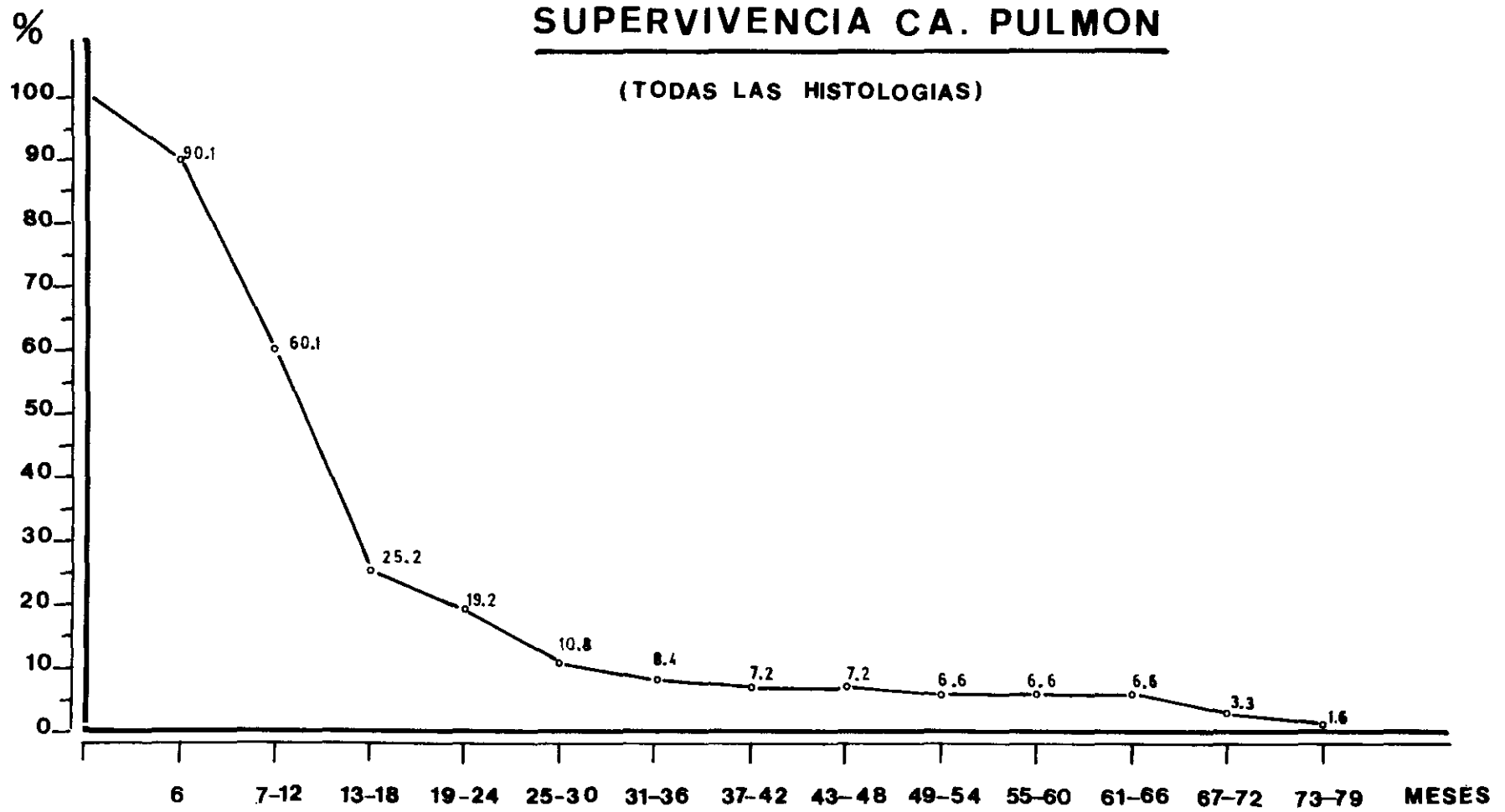


FIG. 8 - B

## **8.- Fracaso de los programas de detección precoz**

Ante un panorama como el descrito anteriormente, se han hecho intentos de controlar su evolución natural mediante el diagnóstico precoz. Puede afirmarse que estos intentos han terminado en un fracaso completo, si bien han aportando datos de gran interés para la comprensión y el conocimiento de la historia natural de la enfermedad. El proyecto más complejo y mejor conocido quizá sea el realizado por la Clínica Mayo, la John Hopkins University y el Memorial Sloan-Kettering Hospital. Los resultados pueden ser sintetizados en los siguientes puntos: los programas de screening de cáncer de pulmón basados en estudios radiológicos cada cierto tiempo de los pacientes y citología de esputo, permiten detectar un número mayor de personas portadoras de carcinomas de los que se detectan en grupos de control no sometidos a screening (5.5/1000/año frente a 4.3/1000/año en el estudio de la Mayo, probablemente el más minucioso de los tres). La resecabilidad de los casos detectados en el screening es también mayor (en el grupo de pacientes de la Mayo 46% frente al 32%) y sin embargo la tasa de mortalidad en ambos grupos fué casi idéntica (3.2/1000/año frente a 3.0/1000/año en los dos grupos respectivamente en el estudio citado) (38). La justificación de estas cifras parece encontrarse en el hecho de que la mayoría de los tumores detectados, que se siguen de supervivencias prolongadas tras de la resección quirúrgica, corresponden a carcinomas epidermoides de lento crecimiento, que probablemente hubiesen

tenido una supervivencia similar después de un diagnóstico rutinario. La conclusión general de los participantes en el estudio es que no parece justificada la realización de campañas de screening masivas con este fin, aunque no excluyen que puedan ser de utilidad en el control de grupos de pacientes de alto riesgo.

### **9.-Utilidad y aplicación de los cultivos de tumores en el cáncer de pulmón**

En las últimas décadas pocos avances notables se han efectuado en el manejo clínico de los carcinomas de pulmón, permaneciendo como hemos dicho anteriormente, bajos los índices de curación a cinco años pese a los distintos ensayos terapéuticos desarrollados. Por diferentes razones la prevención de la enfermedad, que sería un aspecto a tener muy en cuenta, ha fallado, de tal forma que en los países occidentales hemos asistido a un incremento alarmante de estos tumores malignos (fig 4 y 5) a lo largo del siglo, sin que los tratamientos hallan modificado substancialmente la historia natural de la enfermedad.

En teoría, conociendo mejor el comportamiento de estos tumores, podrían estructurarse más eficazmente una terapia, posiblemente combinando varias modalidades terapéuticas, y así conseguir una mejoría drástica de la esperanza de vida de los

pacientes. En este sentido, en los últimos años se ha progresado considerablemente en el conocimiento de la biología celular y molecular básicas, facilitado por el desarrollo tecnológico de los cultivos de cáncer de pulmón en el laboratorio.

Los distintos cultivos han permitido obtener líneas celulares que han producido gran cantidad de células malignas para estudio de la biología, bioquímica, inmunología, citogenética y quimiosensibilidad de las células tumorales.

Los cultivos de especímenes tumorales pulmonares en el laboratorio pueden ser *in vitro* e *in vivo*. En la mayoría de ellos es obligatoria una disgregación celular de los tejidos, mecánica o enzimática, que origina una disminución de la viabilidad y eficacia celulares (39). El cultivo *in vitro* puede ser en medio líquido o sólido. El índice de éxitos oscila entre el 50 y el 80 % (40). De indudable valor práctico serían los cultivos de médula ósea en pacientes con carcinoma de células pequeñas, con células tumorales ocultas, especialmente en el caso de tener que efectuar un trasplante de médula autóloga durante una combinación intensiva de quimioterapia.

El empleo de mejores técnicas ha logrado cultivos en el 10 al 20 % de los carcinomas anaplásicos de células pequeñas con un medio basal suplementado con suero bovino fetal (41). Este medio de cultivo parece hoy día vital para el logro de líneas celulares. Estudios del Instituto Nacional del Cáncer (Bethesda,

Maryland) han demostrado que el índice de crecimientos de cultivos se incrementaría al 50% por la adición de un medio "condicionado", tomado de cultivos ya establecidos (42). Lo que sugiere que las células cultivadas producen factores de crecimiento y que éstos pueden no estar presentes en el suero bovino fetal. El grupo de Carney ensaya un medio libre de suero que fué altamente selectivo para el crecimiento del carcinoma de células pequeñas, conteniendo medio RPMI-1640 suplementado con hidrocortisona, insulina, transferrina, 16-beta-estradiol y selenio (medio HITES) (43). Por el contrario, el cáncer de pulmón no células pequeñas presenta notorias dificultades para el establecimiento de líneas celulares continuas. El crecimiento de carcinomas pulmonares en cultivos in vivo se efectuó, en un principio, en localizaciones especiales como el ojo o el cerebro de animales normales con éxitos limitados (44). Más tarde, se consiguieron crecimientos de corta duración, en animales inmunodeprimidos por corticoides (45). Cuando la inmunosupresión fue prolongada con ratones timec-tomizados neonatalmente e irradiados en época adulta, éstos son capaces de tolerar el crecimiento de un carcinoma de pulmón humano algunos años (46). Actualmente el animal de laboratorio más empleado es el ratón atímico "calvo", con ausencia de linfocitos T, linfocitos B normales, altos niveles de células "killer" e incremento de la actividad macrofágica. El crecimiento xenográfico del cáncer de pulmón que se consigue con estos métodos es de un 44-78% (40).

Un método de complejidad intermedia entre cultivos in

*vitro en placa e in vivo son los esferoides, cultivo in vitro que se comportaría como un tumor in vivo, con un gradiente metabólico para oxígeno y nutrientes, así como para la penetración de un fármaco citostático (47).*

*La evaluación del efecto citotóxico depende del daño morfológico en los explantos, lo que exigiría tinciones especiales. Cole (48) ha expuesto sus resultados con colorimetría en cultivos de pulmón, con el sistema de sal de tetrazolio, que es activada y coloreada por las células viables. Las modificaciones del color pueden valorarse rápidamente siguiendo testigos con numerosos quimioterápicos. Otro procedimiento es la incorporación de radionúclidos, (uridina, timidina), al DNA celular con exposición simultánea a fármacos (49).*

*Del conjunto de células tumorales sólo un porcentaje de éstas tiene capacidad de repoblar el tumor, son las denominadas stem cells, que crecen de forma discreta en agar (50) y otros procedimientos (51,52). En estos ensayos clonogénicos se incuban células durante un tiempo limitado, que varía según la concentración del fármaco. Se valora la actividad de la droga en términos de colonias supervivientes en los explantos tratados comparados con el control. La supervivencia de colonias menor o igual a 30% en los explantos tratados, se asocia con quimiosensibilidad in vitro. Supervivencias mayores o iguales al 50% indicarían resistencia a una determinada concentración del citostático (53). Por desgracia sólo un 64 % de especímenes de carcinoma de pulmón*

producen cultivos con suficiente número de colonias (mayor de 20/500.000 células plantadas) para valoración citostática (54).

Las xenografías permiten una valoración de quimiosensibilidad *in vivo*. Los citostáticos pueden ser administrados de forma similar como en clínica humana, siendo éstos transportados por vía hematógica hasta el tumor, de este modo es relativamente fácil seguir las incidencias de los implantes tumorales tras la administración del fármaco. Una ventaja adicional es que, quimioterápicos que necesiten activación metabólica, ésta ocurriría también en el animal de igual modo que en el humano, por ejemplo la ciclofosfamida.

Desgraciadamente ningún método es definitivo para satisfacer las necesidades clínicas, unos por el bajo índice de formación de colonias, otros por el largo período de latencia desde el implante hasta poder realizar una valoración con un agente citotóxico, también por existir falsos positivos (55).

En los cultivos se han podido estudiar gran cantidad de productos biológicos, tales como la producción ectópica de polipéptidos y hormonas esteroideas (56). Se han llegado a documentar hasta catorce hormonas diferentes (57). Otros marcadores biológicos como la enolasa neuronal específica (58), la bombesina y la isoenzima de la creatin-kinasa (59) han sido descritas, cuyos niveles sanguíneos tienen relación con la extensión de la enfermedad.

También en cultivos se han efectuado estudios citogenéticos de los cánceres pulmonares. Así se han demostrado aberraciones en el número de cromosomas (60) y anormalidades como delección del brazo corto de cromosoma 3 (61) en el carcinoma microcítico. También amplificaciones y expresiones de ciertos oncogenes (*c-myc*, etc) (62).

La adquisición de resistencia a la quimioterapia en el carcinoma de células pequeñas está relacionada con la heterogeneidad celular y su inestabilidad genética (63). Estudiando aspectos genéticos de las líneas celulares podrían en parte explicarse estos problemas, y, con el tiempo, superarse.

En definitiva, los cultivos de tumores pulmonares aportan gran cantidad de información de aspectos que nos pueden ayudar a la mejor comprensión de la enfermedad, y a descubrir modalidades terapéuticas que permitan mejorar los actuales índices de curación.

#### **10.- Importancia del cultivo de tejidos en la clasificación de las neoplasias pulmonares**

La importancia del cultivo de neoplasias del área torácica se puede concretar en tres aspectos diferentes:

1.- La tipificación correcta de las tumoraciones compuestas exclusiva o predominantemente por células fusocelulares. El ejemplo más claro de esta situación son los mesoteliomas o los carcinomas fusocelulares.

2.- El estudio de los datos que puede aportar el cultivo de tejidos para comprender la histogénesis de determinados procesos neoformativos pulmonares de origen incierto. Los ejemplos más relevantes de esta última posibilidad son el angioma esclerosante, el granuloma de células plasmáticas y el mioblastoma de células granulosas pulmonares.

3.- La posibilidad de que en cultivos a corto plazo, la diferenciación in vitro de algunos tumores permita una clasificación más exacta de los mismos, cuando su imagen histológica no lo permite, con evidentes consecuencias inmediatas desde el punto de vista terapéutico, pronóstico y de repercusión epidemiológica.

El primer problema no es exclusivo del área torácica. En los tumores de partes blandas, cabeza y cuello, aparato genitourinario, piel etc., se plantea con gran frecuencia el diagnóstico diferencial de las proliferaciones neoplásicas o pseudoneoplásicas de conformación fusocelular. Estas proliferaciones pueden corresponder a un amplio abanico de variedades histogénéticas, desde los carcinomas fusocelulares de la laringe y el esófago, los carcinomas renales desdiferenciados, los sarcomas

renales, los diferentes sarcomas y proliferaciones pseudo-tumorales (fibrohistiocitomas malignos, leiomiosarcomas, melanomas, fibromatosis, fibrosarcomas, sarcomas sinoviales, liposarcomas) de morfología fusiforme, que pueden aparecer en la piel o en las partes blandas, a algunas lesiones de pronóstico y tratamiento completamente diferente como las lesiones proliferativas fusocelulares postquirúrgicas de la vejiga urinaria o el pseudoxantoma de Helwig cutáneo. Todos ellos son procesos que, con una morfología muy similar, especialmente cuando la biopsia es pequeña o el material aparece mal preservado, obligan a hacer un diagnóstico diferencial delicado, ya que el pronóstico y tratamiento suele ser muy diferente (64,65).

Especial importancia dentro del grupo tienen en el área torácica éstas formas de neoplasias. Desde el trabajo inicial de Murray y Stout (66), se admite que en el tórax existen una serie de tumores que, remediando un fibro o leiomiosarcoma, sin embargo tienen la capacidad de crecer *in vitro* en parte como elementos fusiformes similares a los del tumor originario, en parte como células de citoplasma expandido más amplio y de forma poligonal, que se adosan como el epitelio en las mismas circunstancias. Este crecimiento es similar al de los elementos mesoteliales normales cultivados *in vitro*, y se interpretó como expresión de la génesis mesotelial de dichos tumores, con las consecuencias de tipo terapéutico y epidemiológico consiguientes. Es evidente, que habiendo permitido el cultivo la identificación de tales tumores, cuya existencia no hubiera sido sospechada por otras técnicas, en estos momentos su realidad como entidad nosológica debe ser

replanteada en base a dos criterios distintos 1) la comparación de su patrón de crecimiento con el de otras neoplasias fusocelulares intrapulmonares, de la pared torácica o de las partes blandas somáticas, especialmente en algunas de sus variantes como los sarcomas sinoviales monofásicos y bifásicos, 2) la aplicación a su estudio de técnicas desarrolladas con posterioridad a la del cultivo tisular, como la microscopía electrónica y la inmunohistoquímica.

Asimismo cabe la posibilidad, que el cultivo tisular proporcione datos que faciliten en mayor o menor grado la comprensión de la histogénesis de algunos grupos de tumores, unos específicos del área, como el angioma esclerosante pulmonar, otros, aunque no específicos, sí muy característicos, como el llamado granuloma de células plasmáticas, y otros excepcionales, como el mioblastoma de células granulosas (67).

Finalmente se plantea la posibilidad, al menos desde un punto de vista teórico, que el cultivo de tejidos permita obtener una maduración histológica clara en aquellos carcinomas de baja madurez, de morfología no microcítica, que solamente mediante técnicas más complejas y costosas en tiempo y en material, como la microscopía electrónica o las técnicas inmunohistoquímicas, serían tipificables como adenocarcinomas o carcinomas epidermoides.

11.- Sobre esta base se plantean como **OBJETIVOS** de la presente **TESIS** los siguientes:

1.- Esclarecer si el método de cultivo a corto plazo de Kersting, es un procedimiento útil para el estudio in vitro de las características biológicas y bioquímicas de los carcinomas pulmonares, y si de él se puede derivar el establecimiento de un modelo que permita abordar in vitro los problemas de estudio de quimiosensibilidad.

2.- Valorar si el método citado constituye una herramienta útil para obtener una clasificación más correcta de los carcinomas pulmonares, que permita en biopsias en las que se obtiene escaso material o éste es de pobre calidad, una tipificación exacta de su subtipo histológico, con las consiguientes consecuencias pronósticas, terapéuticas y estadísticas.

3.- Comprobar los escasos datos publicados referentes al comportamiento in vitro de tumores fusocelulares malignos torácicos mesoteliales, la relación mutua entre éstos y los mesoteliomas fibrosos benignos, sus rasgos diferenciales in vitro con otros sarcomas intrapulmonares o superficiales y la correlación de dichos datos con la microscopía electrónica y la inmunohistoquímica.

*4.- Establecer los rasgos morfológicos in vitro de algunas variedades de tumores pulmonares de observación infrecuente, así como correlacionar los hallazgos con las hipótesis histogenéticas más comunmente manejadas.*

**material y métodos**

## MATERIAL Y METODOS

### 1.-OBTENCION DEL MATERIAL.-

Se han estudiado un total de 112 neoplasias primitivas del pulmón. La totalidad de los casos incluidos en el presente trabajo fueron intervenidos quirúrgicamente. De los 112 casos, casi un 75 % correspondieron a carcinomas (82/112), en tanto que, aproximadamente, uno de cada cuatro casos (30/112) correspondió a una neoplasia no epitelial (Tabla III, pag. 60). Dentro de estas últimas, se ha hecho referencia a algunas que han sido objeto de estudios ultraestructurales, histoquímicos e in vitro previamente (angiomas esclerosantes, tumores de células granulosas), con el fin de servir de patrón de comparación con los otros grupos. Se añaden nuevos casos, de otras variantes histológicas (sarcomas fusocelulares intrapulmo-nares), en los que se completa su estudio con datos ultraestructurales e inmunohistoquímicos.

Se intentó incluir en el estudio aquellos tumores en los que al disponerse de piezas de resección amplias, existía material suficiente para realizar una tipificación histológica correcta de los mismos, de tal manera, que en los casos de tumores epiteliales malignos se dispuso de 28 neumonectomía (34.2%), y de 34 lobectomías(41.5%). En este grupo de carcinomas se incluyeron, sin embargo, trece casos (15.8%) de tumores obtenidos de piezas de resección atípica pulmonar, y 7 casos (8.5%) más de pequeñas biopsias de tejido pulmonar. En el grupo de neoplasias no epiteliales, dadas las especiales características de las mismas, se dispuso de una mayoría de neoplasias obtenidas por resección pulmonar atípica, 16 casos (52,8%), o por biopsia, 11 casos (36,3%), frente a un sola neumonectomía (3,3%) y dos lobectomías (6,6%). Los resultados aparecen resumidos en la Tabla IV (pag.61)

## **2.-TRATAMIENTO DEL MATERIAL.-**

Las piezas de resección y las biopsias fueron recibidas en el laboratorio rápidamente y en condiciones estériles. De ellas se procedió a separar el material para explantación en cultivo de tejidos y para estudio ultraestructural, según los procedimientos que se detallan más adelante. Al mismo tiempo se procedió a congelar material en isopentano enfriado en nitrógeno líquido para realizar estudio

histoquímico.

Las piezas de pequeño tamaño fueron fijadas en formaldehído al 4% y en líquido de Bouin. Las piezas de lobectomía y neumonectomía fueron insufladas con formaldehído al 4% por vía endobronquial, y dejadas fijar durante 24 horas. Posteriormente fueron loncheadas en secciones perpendiculares al hilio y procesadas como las biopsias de menor tamaño para su inclusión en parafina. Los tumores fueron teñidos habitualmente con hematoxilina eosina, utilizándose en los casos indicados tinciones para la demostración de mucosubstancias (PAS, Alcian Blue a pH 2,5).

#### 2.A.-Tratamiento de las piezas para cultivo de tejidos.-

Para explantación *in vitro* se tallaron fragmentos de tejido de aproximadamente 1 mm<sup>3</sup>, evitando en lo posible la contaminación sanguínea y la desecación de los mismos durante el procedimiento. Los fragmentos se tomaron de los márgenes de crecimiento de los tumores en un intento de evitar las zonas de fibrosis y/o necrosis centrales, y las áreas de infección y/o fibrosis de la periferia de los mismos, así como los tejidos pulmonares normales.

Los fragmentos de tejido así tallados se explantaron en tubos rotatorios según la técnica de Gey modificada por Kersting (68,69). Para ello los fragmentos tallados fueron recogidos en

líquido de cultivo TC-199, realizándose un "lavado" de los mismos por decantación del sobrenadante y añadiendo nuevo medio de cultivo. Con este lavado se pretendió eliminar los restos de sangre, moco bronquial, o material necrótico que hubieran podido contaminarlos durante la fase de tallado.

Una vez terminado el lavado se aspiraron los fragmentos con una pipeta Pasteur de punta curva, y se depositaron formando una línea de 4 a 6 explantos sobre un cubreobjetos de 60x5 mms convenientemente preparados. La preparación consistió en verter en la superficie de los cubreobjetos una gota de plasma de pollo heparinizado y dejarla secar. Dicha preparación proporciona, por una parte, aporte nutritivo al cultivo, y por otra facilita una mayor adhesividad de las células. A continuación, se añadió sobre cada uno de los explantos, de manera que lo bañara completamente, una gota de extracto de embrión de pollo de 11 días, tras de lo cual se cerraron herméticamente los tubos con un tapón de goma y se incubaron a 37º centígrados hasta que el plasma se coaguló. Una vez que el coágulo fijó el explanto al cubreobjetos, se añadieron al tubo 2 ml de medio de cultivo 199 modificado, (45% de líquido amniótico bovino, 45% de medio de Morgan. Morton y Parker o solución de albúmina hidrolizada al 0.5%, 10% de suero de ternera y como indicador del pH rojo fenol) (69).

Los tubos se colocaron en un rotor de baja velocidad, de entre 6 y 15 vueltas por hora, dentro de una cámara caliente de 36º centígrados. La actividad metabólica de las células produce

una modificación del pH del medio de cultivo, que se traduce en una variación del color del indicador, el cual de rojo pasa a ser amarillento ámbar. Esta variación debe ser observada al mismo tiempo que el crecimiento de los explantos, el cual se analizó en todos y cada uno de ellos de cada tubo, cada tres días. La observación se realizó bien en un microscopio común o en un microscopio invertido, valorando el margen periférico de cada explanto tumoral, para buscar el halo de crecimiento de los elementos neoplásicos.

Una vez separados los tubos que contenían explantos con crecimiento, éstos se fijaron en alcohol de 70º durante 20 minutos, en alcohol de 90º durante 20 minutos y en formaldehído al 4% durante 24 horas. Posteriormente, los cubreobjetos de los explantos ya fijados fueron teñidos con hematoxilina eosina y ocasionalmente con PAS. Los explantos, así teñidos, fueron deshidratados y montados, invirtiendo el cubreobjetos que soporta el crecimiento sobre el portaobjetos con un exceso de medio de montaje.

#### **2.B.- Tratamiento de las piezas para microscopia electronica.-**

Los fragmentos de tejido para estudio ultraestructural fueron tallados en cubos de 1 mm<sup>3</sup> de lado, en gotas de glutaraldehído al 2,5 % en buffer según Milloning. A las 24 horas fueron

sumergidas en solución de ácido ósmico al 1%, deshidratados en alcoholes de graduación progresiva e incluidos en Epon. De los bloques de material incluido en resina se obtuvieron cortes de una micra, tras de lo cual se seleccionaron campos adecuados para la realización de los cortes ultrafinos. Estos fueron teñidos con acetato de uranilo y citrato de plomo y observados en un microscopio electrónico.

### 2.C.- Tratamiento de las piezas para estudio histoquímico.-

Los

fragmentos para estudio histoquímico se congelaron en nitrógeno líquido y fueron seccionados en criostato. Tras del estudio de cortes de control teñidos con azul de metileno al 0.5%, se procesaron para la demostración de fosfatasa alcalina y adenosín trifosfatasa.

Para la demostración de la actividad de la fosfatasa alcalina se utilizó la técnica de Lillie (70). En ella, los cortes de tejido fresco congelado se incubaron, tras un baño en agua destilada, durante una hora a 37 °, en una solución de substrato obtenida por la mezcla de dos diferentes soluciones A.- (50 cc) y B.- (30 cc). la solución A se compone de barbitona sódica (6.1 gramos), cloruro cálcico (1.2 gramos), sulfato magnésico ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.5 gramos) y agua destilada (1000 cc). La solución B es una solución al 1% de beta glicerofosfato sódico. Después de la incubación, los cortes se lavaron tres veces en agua destilada, tras

de lo cual fueron sumergidos en solución acuosa de nitrato de cobalto al 2% durante 5 minutos. A continuación, los cortes fueron lavados nuevamente tres veces en agua destilada y transferidos durante un minuto a una solución de sulfuro amónico al 1%. Después de este último paso, fueron contrastados ligeramente con hematoxilina y montados.

Para la demostración de la ATP-asa, se siguió la técnica de Dubowitz y Brooke (71). Los cortes de criostato se sumergieron en buffer acetato 0.2 M a pH 4.3 y 4.6, durante 30 minutos a temperatura ambiente. Tras varios lavados en agua destilada, se incubaron en un medio compuesto por ATP (sal disódica 30 miligramos), disuelto en 20 mililitros de buffer HCl-Tris 0.1M ajustando el pH a 9.5. Tras de la incubación se lavaron dos veces en cloruro cálcico al 1%. Después de tres nuevos lavados en agua destilada, se sumergieron en solución al 3% de nitrato de cobalto durante tres minutos. Los cortes fueron nuevamente lavados en agua destilada tres veces y sumergidos en solución acuosa al 0.5 % de sulfuro amónico. Finalmente, se lavaron tres veces más en agua y se contrastaron los núcleos con hematoxilina.

#### 2.D.- Tratamiento de las piezas para inmunohistoquímica.-

Los cortes para inmunohistoquímica correspondientes a los casos de mioblastoma de células granulosas, angioma esclerosante pulmonar, fibrohistiocitoma maligno pulmonar, y mesoteliomas fibrosarco-

matosos, fueron desparafinados, lavados en PBS e incubados con anticuerpos monoclonales anti antígeno de la membrana epitelial (EMA), antígeno carcinoembrionario (CEA), antiqueratinas (AE-1, AE-3) y antivimentina, a unas diluciones de 1/200, 1/250, 1/250, 1/250, y 1/5, respectivamente. Posteriormente la demostración de la fijación del anticuerpo se realizó mediante el empleo del complejo peroxidasa-antiperoxidasa. Los anticuerpos primarios se obtuvieron de las casas Dako (Dakopatts. Denmark, EMA, CEA, CAM 5.2 y vimentina) e Hibry-Tech ( AE-1, AE-3). Los anticuerpos demuestran respectivamente el antígeno de la membrana epitelial (EMA), el antígeno carcinoembrionario (CEA), la presencia de filamentos intermedios tipo vimentina, característicos de las células mesenquimales, y los filamentos intermedios tipo queratina. El anticuerpo monoclonal AE-1 demuestra los polipéptidos queráticos de bajo peso molecular, en tanto el anticuerpo AE-3 demuestra los péptidos queráticos de alto peso molecular.

### **3.- INTERPRETACION Y VALORACION DE LOS RESULTADOS.-**

#### **3.A.- Clasificación histológica convencional de los tumores.-**

Los

tumores fueron clasificados de acuerdo con los criterios utilizados en la última clasificación de las neoplasias pulmonares pro-

puesta por la OMS (72).

Dentro de los carcinomas incluidos en el estudio, se consideraron carcinomas epidermoides, aquellos que mostraron en microscopía óptica fenómenos de queratinización o células con "puentes intercelulares". Como adenocarcinomas, se consideraron todas aquellas neoplasias que constituían acinos o papilas, o que mostraban presencia extra o intracelular de material mucoide. Como carcinomas anaplásicos de células pequeñas, se consideraron todos aquellos que se conformaban a la descripción habitual del carcinoma microcítico, con núcleos ovoides hipercromáticos, escaso citoplasma, elevada tasa mitótica y agrupación ocasional de las células en estructuras trabeculares o rosetoides. Como carcinomas anaplásicos de células grandes, se incluyeron aquellos en los que no se podían identificar los criterios ya citados de diferenciación escamosa o glandular. Finalmente, se discriminó un grupo de "carcinomas no diferenciados", cuyo material procedía de biopsias o piezas de resección atípica, con extensas zonas de necrosis o fibrosis, en las que el estudio histológico no permitió una tipificación de absoluta garantía y en los que, si bien la imagen microscópica convencional no correspondía a la del carcinoma anaplásico de células pequeñas, ni estaban presentes los signos genéricos de diferenciación en sentido pavimentoso o glandular, existían ciertos signos indirectos de estirpe epidermoide (estratificación, banda periférica en empalizada no muy bien definida) o glandular (células claras poligonales, baja cohesividad). Este grupo se incluyó en el estudio con el fin de

valorar la utilidad del cultivo tisular, por sí mismo, en su tipificación histológica exacta.

Las neoplasias no epiteliales se clasificaron de acuerdo con los criterios habituales (mioblastomas de células granulosas, hamartomas, angiomas esclerosantes y mesoteliomas fibrosos). Cuatro casos de sarcoma fusocelular primario en el pulmón, dos de localización superficial y dos de situación profunda en el parénquima, se incluyeron en el estudio. Los cuatro casos mostraron una constitución a expensas de elementos fusocelulares sin signos de diferenciación específica en ningún sentido. La inclusión se hizo de manera provisional a la espera de una catalogación más exacta mediante el cultivo de tejidos. Los mesoteliomas epiteliales se tipificaron a expensas de su localización anatómica, contexto clínico y ultraestructura.

### 3.B.- Valoración de los resultados del estudio ultraestructural.-

En el presente estudio no se han utilizado, ni se discuten, los hallazgos derivados del estudio ultraestructural de los carcinomas pulmonares ya que no se han considerado absolutamente imprescindibles para los objetivos pretendidos en el estudio de estos tumores.

Sin embargo, se ha considerado de la máxima utilidad y se

han valorado con la mayor precisión posible, los hallazgos ultraestructurales en las neoplasias no epiteliales, muy especialmente en los sarcomas intrapulmonares. En ellas, se ha valorado la existencia de uniones intercelulares, presencia y distribución de filamentos intermedios, de lámina basal y las características de los elementos que limitan las cavidades epiteliales incluidas en los mismos.

### 3.C.- Valoración de los resultados de la histoquímica enzimática.-

La utilidad de las técnicas de histoquímica enzimática utilizadas es la de diferenciar el endotelio vascular de otras estructuras, por su positividad para la fosfatasa alcalina y para la ATP asa, y la de identificar el epitelio bronquiolar no ciliado y los neumocitos tipo II incluidos en el seno de neoplasias de diferente tipo, por su positividad para la fosfatasa alcalina. Esta aplicación de la fosfatasa alcalina tiene importancia en las siguientes situaciones: 1) Detectar los neumocitos tipo II aislados o, más frecuentemente, limitando cavidades alveolares que se incorporan a los cordones de los carcinomas epidermoides, pudiendo dar lugar a una falsa clasificación de los mismos como carcinomas adenoescamosos, 2) Identificar las cavidades incluidas en el seno de sarcomas intrapulmonares, como alvéolos o bronquiolos preexistente, permitiendo la exclusión de una doble diferenciación epitelial-mesenquimal simultáneas. 3) Finalmente, lograr

una identificación más correcta de los elementos de morfología epitelial constitutivos del angioma esclerosante pulmonar.

### 3.D.- Valoración de los resultados del cultivo de tejidos.-

Se

analizaran separadamente los resultados obtenidos en el cultivo de las neoplasias epiteliales, de los registrados en los neoplasias no epiteliales.

#### 3.D.1.- Neoplasias epiteliales.-

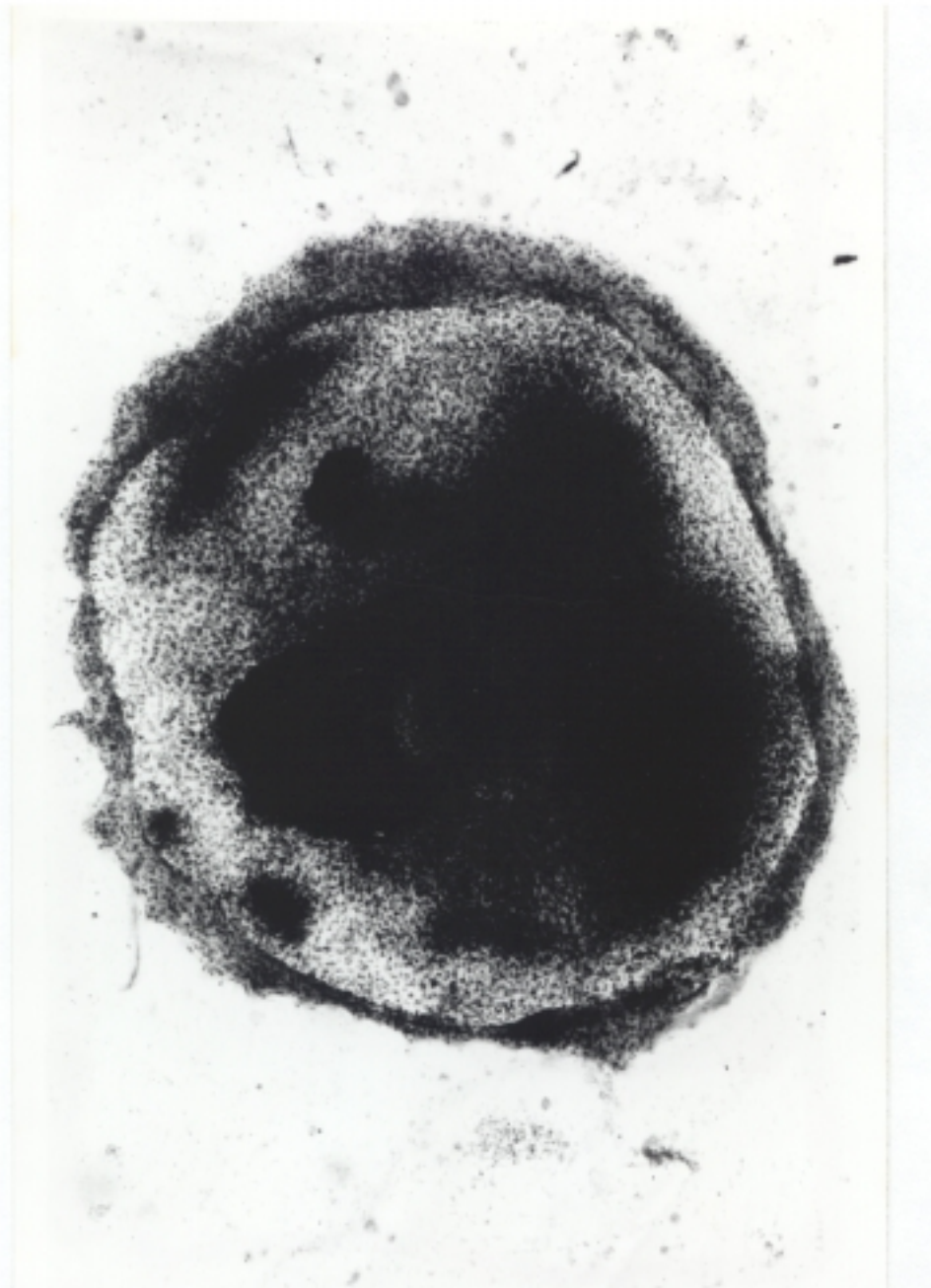
En cada caso se valoró la presencia de crecimiento celular, discriminando en el mismo: 1) Si éste era de células neoplásicas aisladas, 2) de células neoplásicas asociadas a elementos no tumorales o 3) de células normales (fibroblastos, histiocitos). Estos datos se consignaron por separado para cada explanto, en todos y cada uno de los tubos.

Además, en cada caso, se anotó el número total de explantos y tubos, el día de comienzo del crecimiento y la intensidad del mismo.

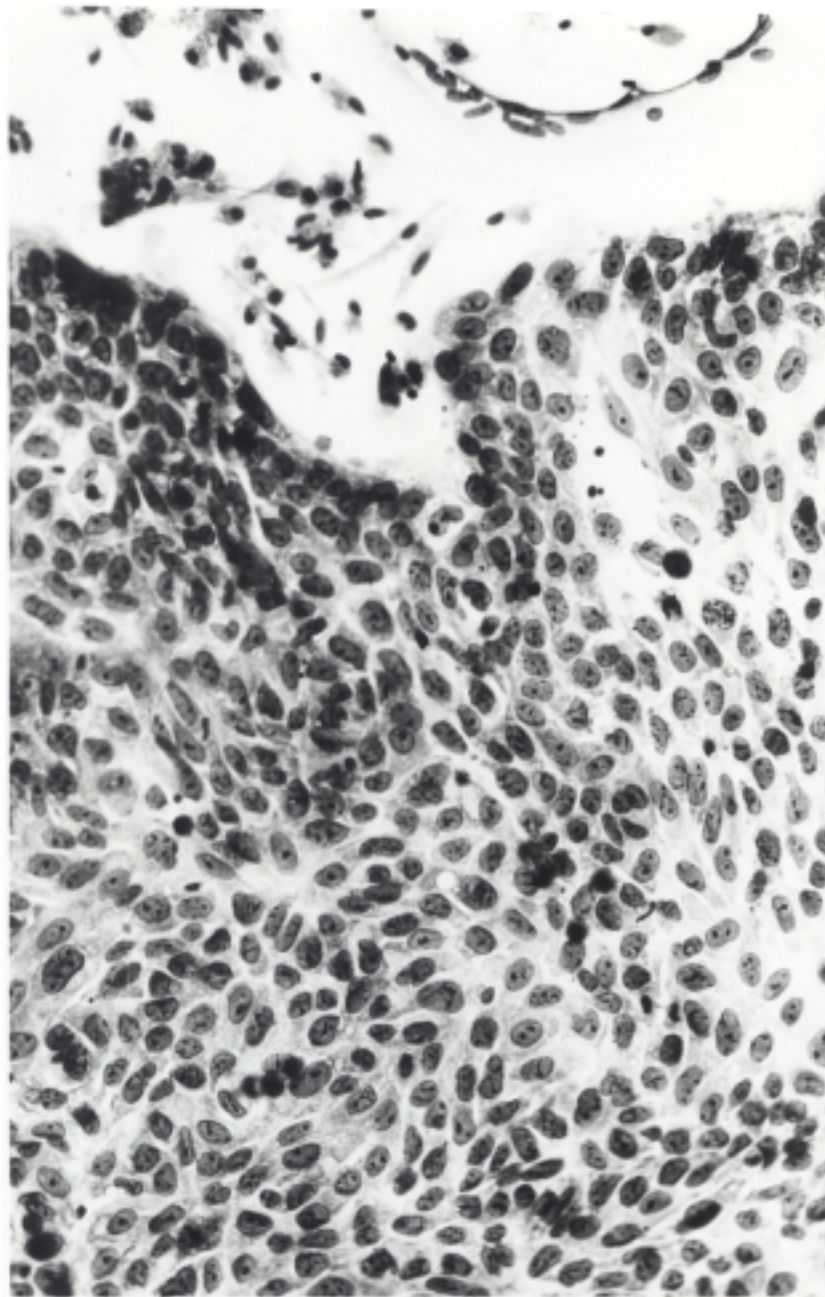
Estos datos, de carácter fundamentalmente cuantitativo, fueron sometidos a estudio estadístico, comparando las distintas subvariantes histológicas de carcinomas, a efectos de comprobar eventuales diferencias en el comportamiento in vitro de cada una de ellas. Se empleó el test de Chi cuadrado para comparación de

porcentajes, el test de Student, en muestras independientes, para comparación de medias, y la U de Mann-Whitney para comparación de porcentajes de intensidades. Se consideraron diferencias significativas con un  $p < 0.05$ .

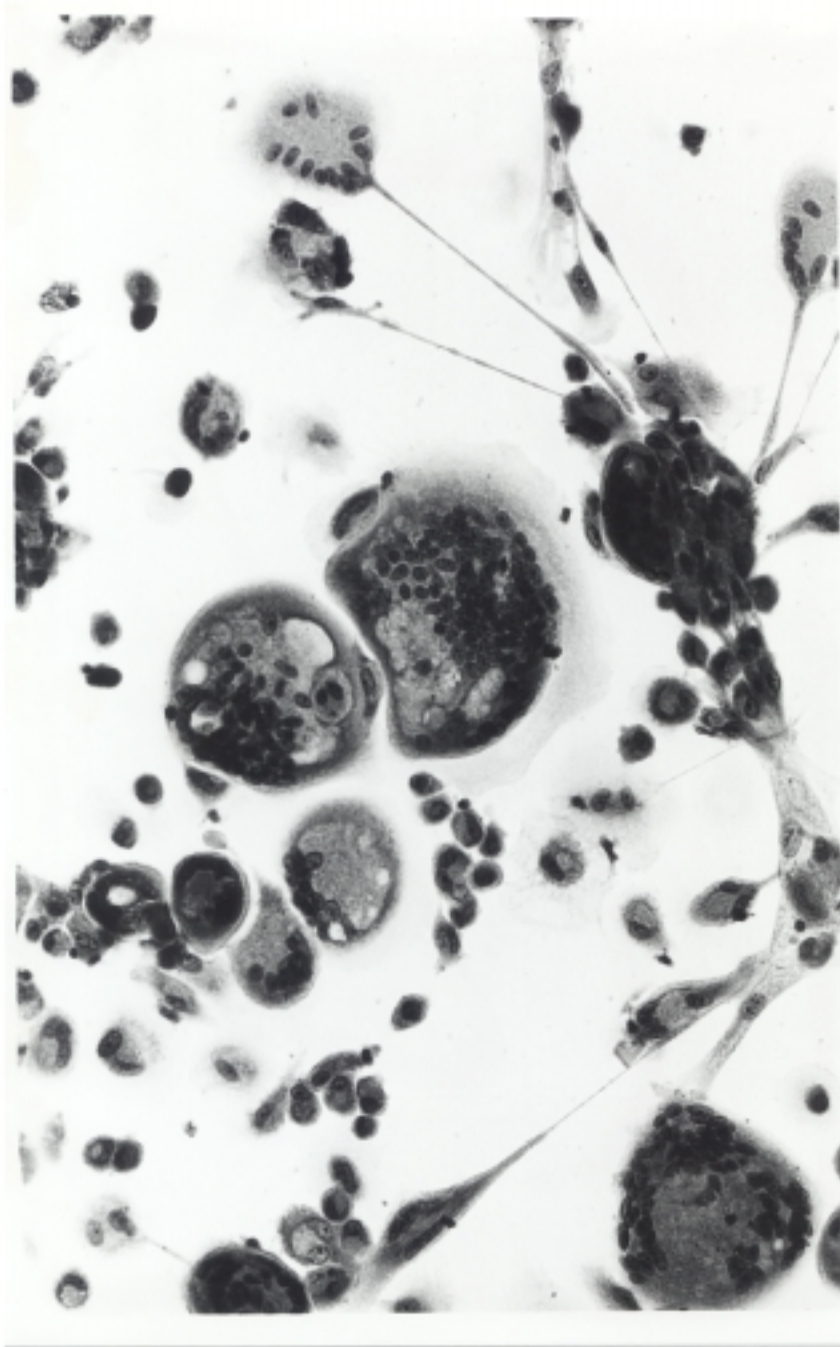
Además de las valoraciones citadas, se realizaron otras de carácter puramente morfológico, en las que se tendía a analizar cuál era la morfología de las células individuales, su agrupación recíproca y la tendencia diferenciativa general de las neoplasias, utilizando los criterios de Willmer (73). Este autor, basado en criterios puramente microscópicos, distingue los siguientes patrones de crecimiento celular *in vitro*: 1.- Patrón mecanocítico, propio de las células epiteliales, que muestran una tendencia a adoptar una morfología poligonal y a asociarse formando placas, (Figuras 9, A y B). 2.- Patrón amebocítico, propio de los elementos histiocitarios, que crecen en general como elementos redondeados de membrana ondulante (Figura 10 A y B). 3.- Patrón fibroblástico, consistente en la aparición de células fusiformes con dos extremos citoplásmicos en punta, o con uno de ellos bifurcado y núcleo oval, característicos de los fibroblastos (Figura 11 A y B).



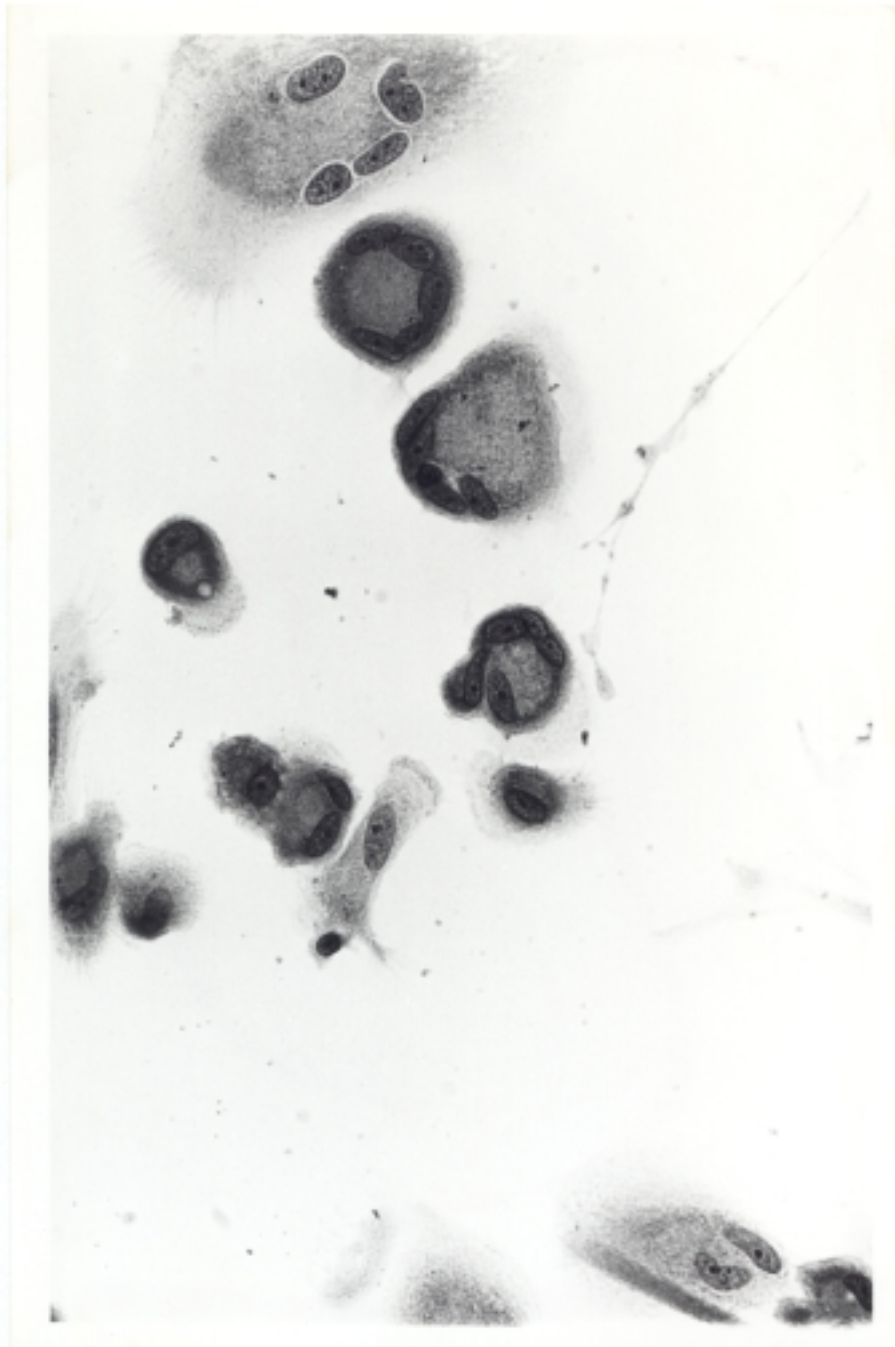
*Figura 9.A.- Crecimiento epitelial. El explanto que corresponde a la zona densa central, aparece marginado por una placa continua de células cultivadas fuertemente cohesiva. H. E. 40x.*



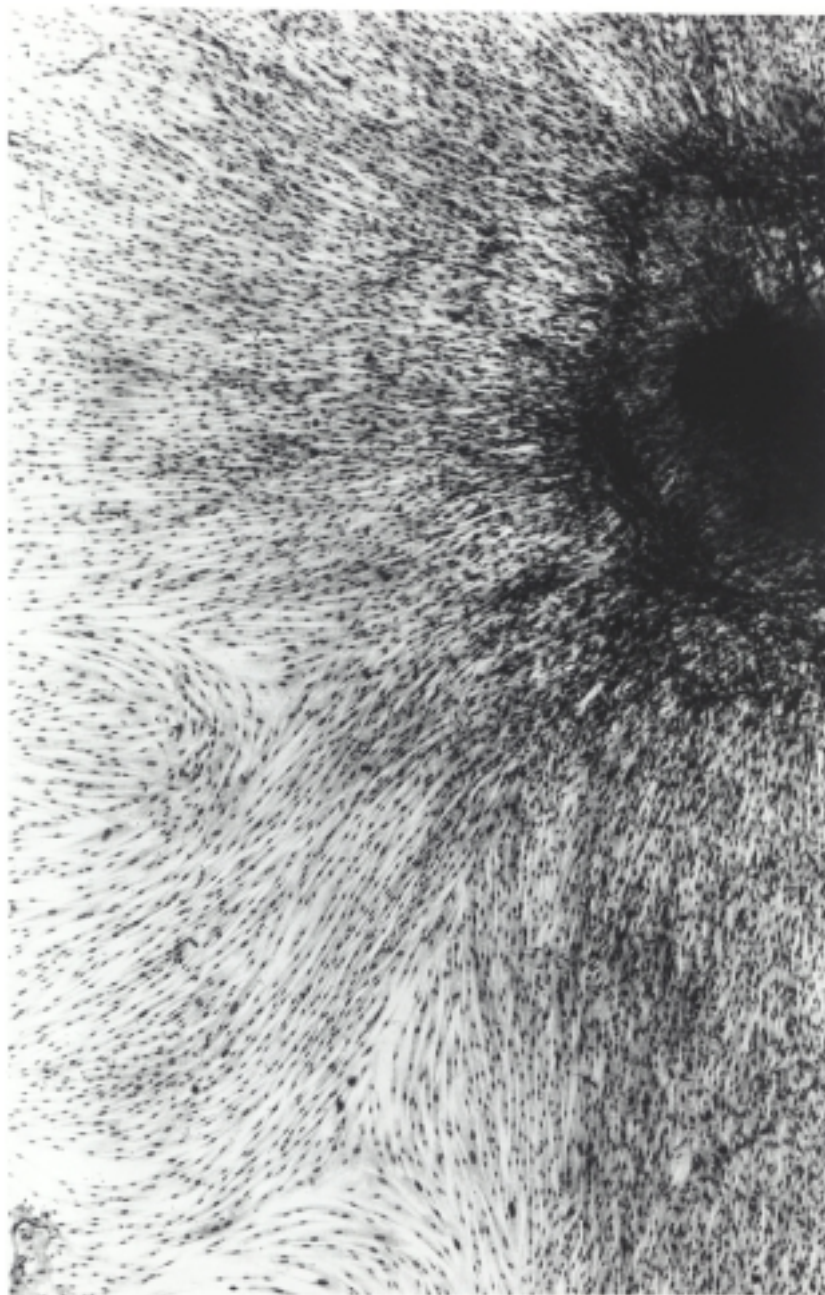
*Figura 9.B.- Detalle a mayor aumento de la placa epitelial anterior . Las células adoptan una morfología poligonal, con límites muy netos y citoplasma abundante, adosándose unas a otras hasta constituir un a modo de mosaico o placa. H.E. 200x.*



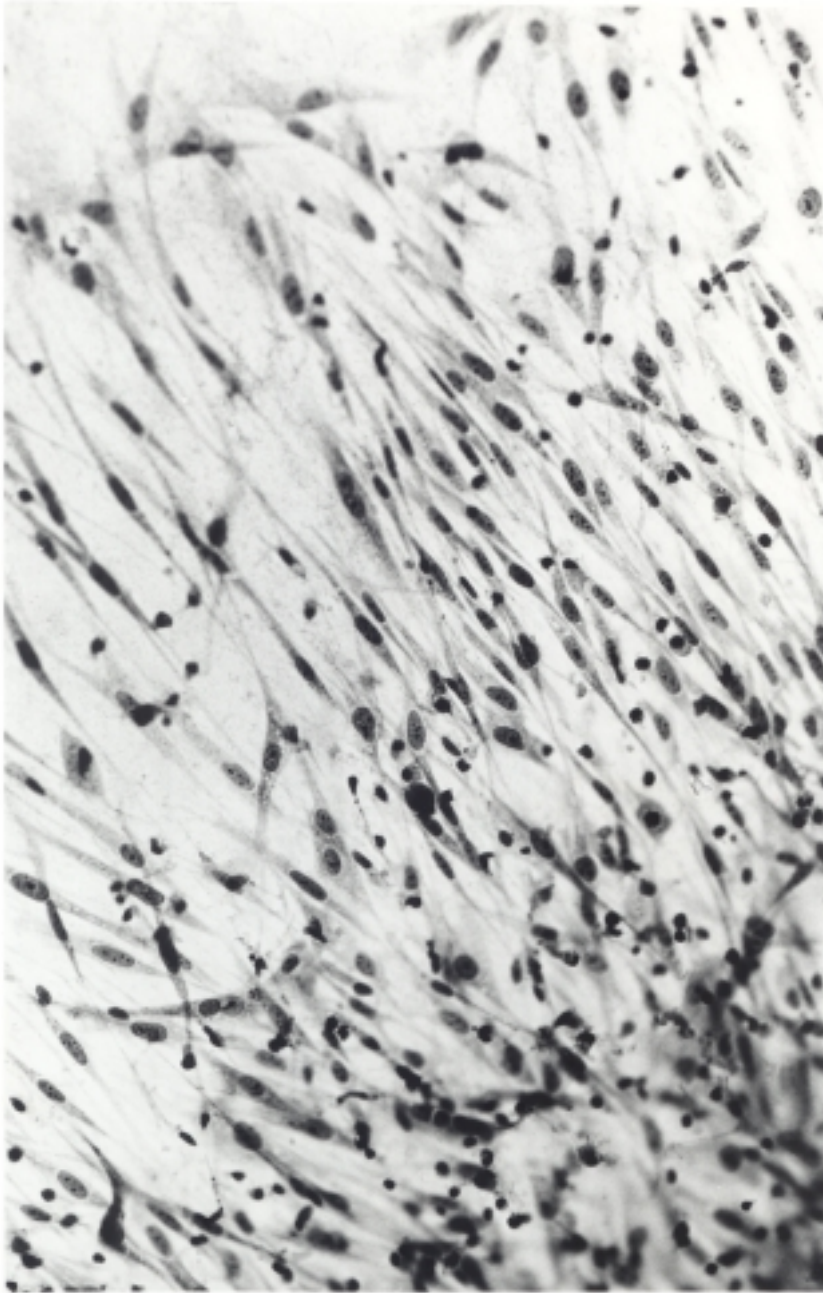
*Figura 10 A.- Crecimiento de elementos histiocitarios prácticamente puro. Las células adoptan una morfología esférica o ameboide, con núcleos arrifionados y citoplasma vacuolado. Probablemente, por fusión, se originan células gigantes multinucleadas de las mismas características pero de mayor diámetro. H.E. 100x.*



*Figura 10.B.- Detalle a mayor aumento de las células anteriormente descritas. H.E. 400x.*



*Figura 11.A. - Crecimiento fibroblástico puro. El explanto aparece marginado por un crecimiento radial de elementos fusiformes, de morfología muy regular y gran densidad. H.E. 40x.*



*Figura 11.B.- Detalle a mayor aumento de un explanto, en el que se observa la emigración de células fusiformes, de núcleo oval, con el citoplasma dispuesto en ambos polos del mismo H.E. 200x.*

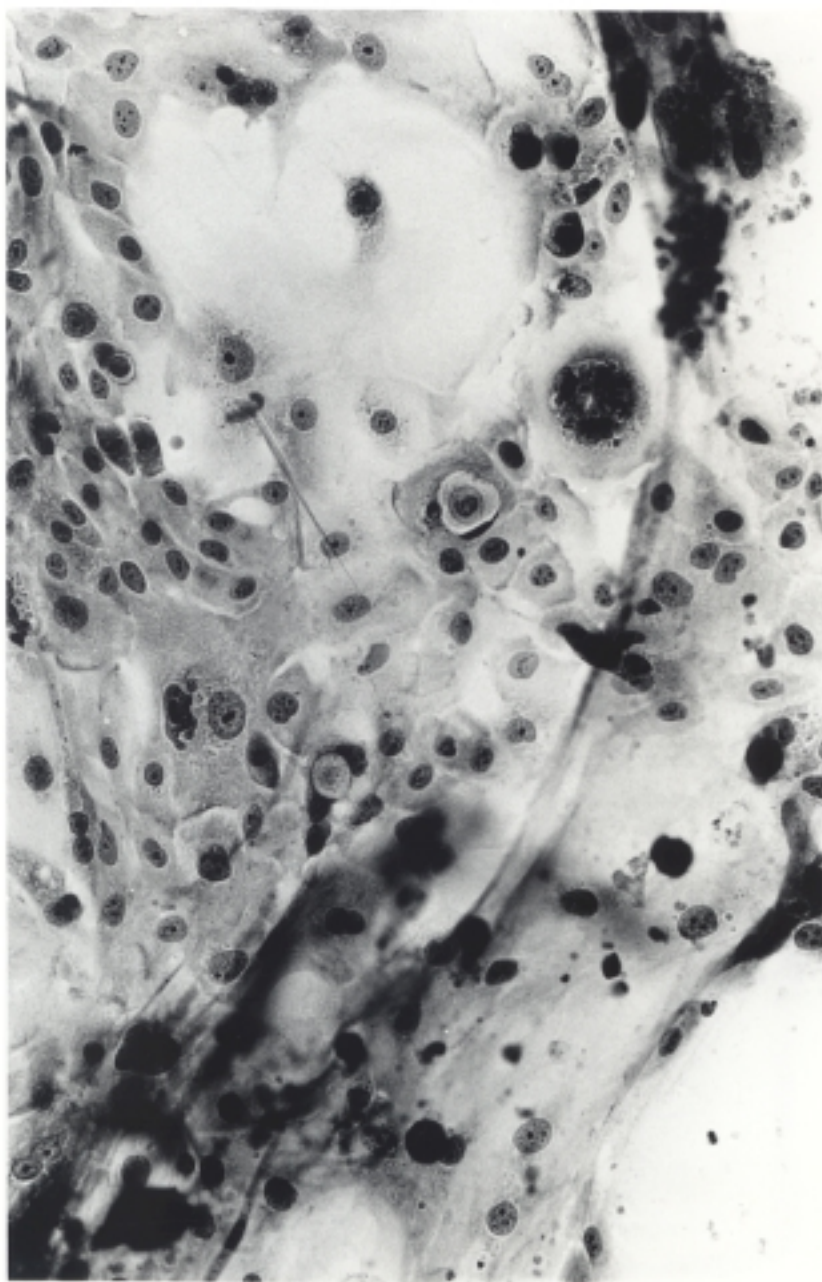
Como test de valoración de la utilidad del método del cultivo, para obtener la "rediferenciación" tumoral o el mantenimiento de su maduración originaria, se consideró que el tumor mostraba diferenciación pavimentosa, cuando existía tendencia a la agrupación en formaciones circulares concéntricas alrededor de un elemento celular central, o formación de queratina (Fig. 12). Como expresión de maduración glandular, se consideró la presencia de vacuolas intracelulares ocupadas por material mucoide Alcian blue positivo (Fig. 13), o el desarrollo de auténticas cavidades acinares bidimensionales limitadas por células tumorales (Fig. 14). Los tumores que no mostraron ninguno de los criterios señalados, fueron considerados como indiferenciados en el cultivo, discriminándose en ellos si mantenían la morfología de células pequeñas o grandes, observable en el fragmento tisular.

De acuerdo con los criterios señalados y como síntesis de todos ellos, se definieron los siguientes parámetros:

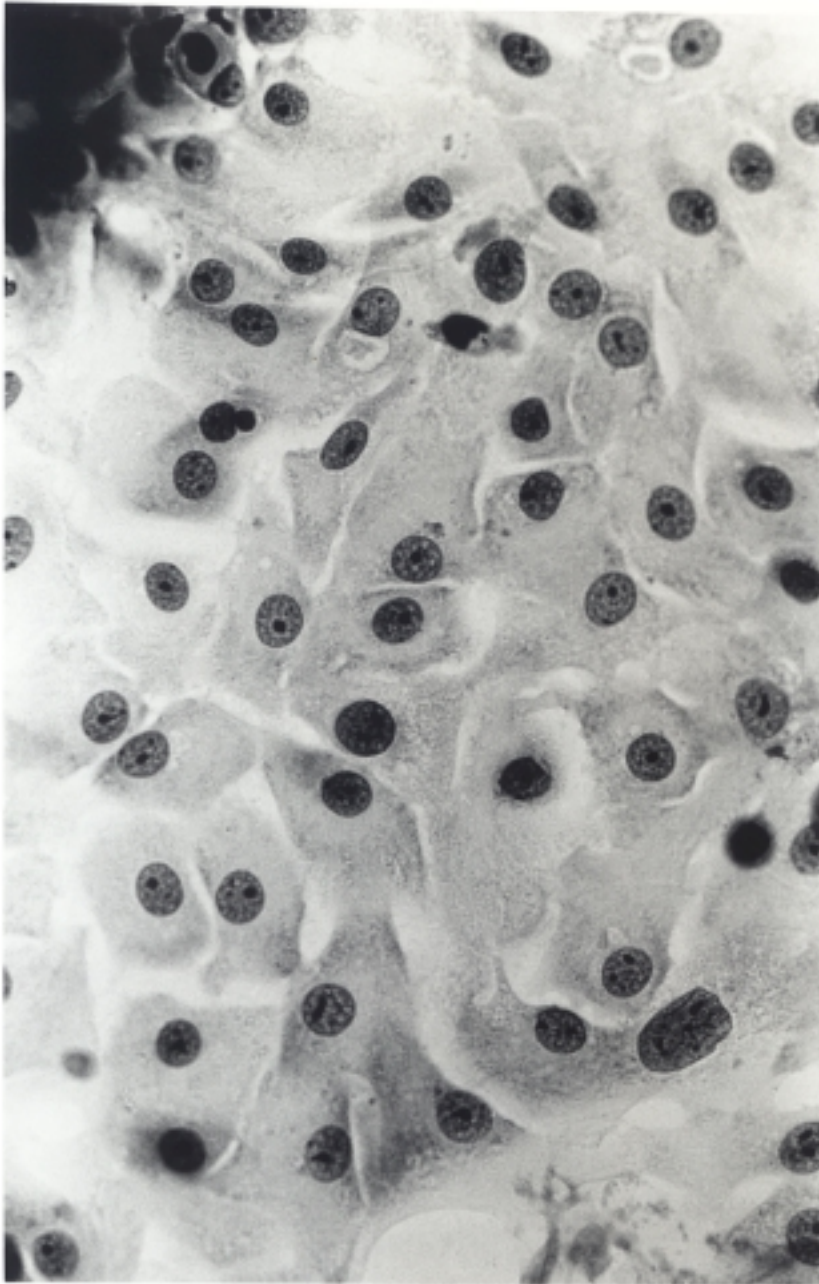
**A.- SENSIBILIDAD DEL METODO.-** Definida como el porcentaje de explantos en el que se obtuvo crecimiento celular tumoral.

**B.- SELECTIVIDAD DEL CRECIMIENTO.-** Definida como la razón existente entre el crecimiento obtenido de células tumorales y de células no tumorales (histiocitos, fibroblastos y otros).

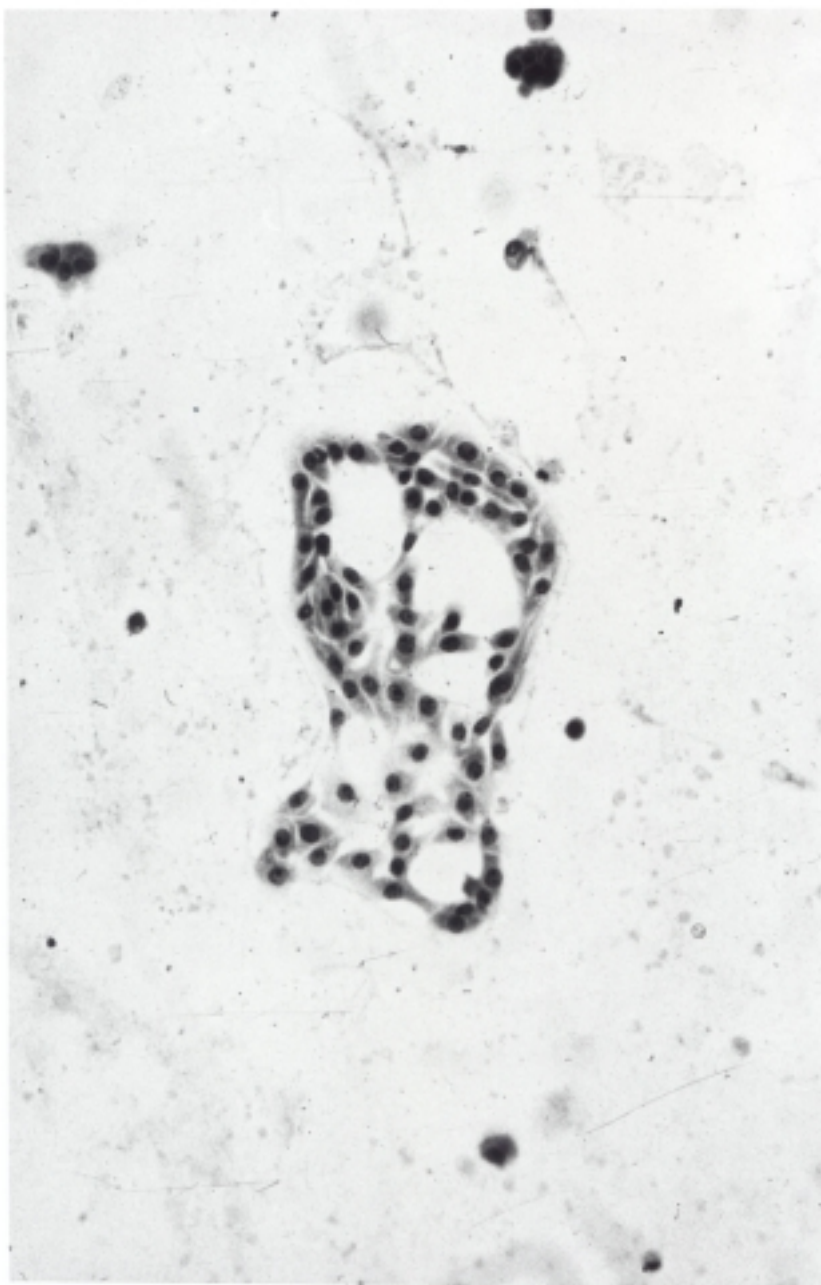
**C.- FIDELIDAD DEL CRECIMIENTO.-** Posibilidad de identificación cierta de las células neoplásicas crecidas como tales en el cultivo.



*Figura 12.- Explanto de carcinoma epidermoide. El tumor crece formando una placa de células adosadas, que en su porción central dan lugar a una agrupación circular concéntrica, alrededor de un elemento en vías de queratinización. H. E. 200x.*



*Figura 13.- Explanto de adenocarcinoma. Las células del crecimiento muestran numerosas vacuolas de carácter no degenerativo, sino ocupadas por material secretorio PAS y Alcian blue positivo. H. E. 200x.*



*Figura 14.- Explanto de adenocarcinoma. Las células neoplásicas forman numerosas cavidades acinares de paredes compartidas. H.E.100x.*

**D.- INTENSIDAD DEL CRECIMIENTO.-** Definida como el volumen de crecimiento de células neoplásicas, evaluado mediante estimación.

**E.- PRECOCIDAD DEL CRECIMIENTO.-** Definida como el momento (día), en que comienza a observarse crecimiento de elementos neoplásicos.

**F.- DURACION DEL CRECIMIENTO (PERSISTENCIA).-** Definida como el porcentaje de tubos que mantienen crecimiento tumoral en la última observación a los 30 días.

**G.- COSTO DEL METODO.-** Evaluación no numérica de los gastos de mantenimiento de la técnica.

### **3.D.2.- Neoplasias no epiteliales.-**

En los tumores no epiteliales, dado que los objetivos pretendidos no son exactamente los mismos que en los carcinomas, se obviaron las evaluaciones anteriormente expresadas, estableciéndose simplemente el tipo de célula presente y su comportamiento en cuanto a su tendencia asociativa en placas, fascículos, etc. Los tipos celulares presentes y los patrones de agrupamiento, se compararon con los obtenidos en el cultivo de otras neoplasias de localización extratorácica.

## TABLA III

DISTRIBUCION SEGUN LOS TIPOS HISTOLOGICOS DEL MATERIAL UTILIZADO

## A.- NEOPLASIAS EPITELIALES MALIGNAS (73,3%) :

- Epidermoides.....50 casos (60.9%)
- Adenocarcinomas.....16 casos (19.5%)
- Anaplásicos de células pequeñas...2 casos (2.4%)
- Anaplásicos de células grandes....4 casos (4.9%)
- Carcinomas "no diferenciados"....10 casos (12.2%)

## B.- NEOPLASIAS NO EPITELIALES (26.7%) :

## Benignas ( 20 casos) :

- Mioblastomas de células granulosas...2 casos (6,6%)
- Angiomas esclerosantes.....2 casos (6,6%)
- Hamartomas.....11 casos (36,3%)
- "Mesoteliomas fibrosos".....3 casos (9,9%)
- Leiomioma pulmonar.....1 caso (3,3%)
- Granuloma de células plasmáticas.....1 caso (3,3%)

## Malignas (10 casos) :

- Mesoteliomas fibrosarcomatosos.....4 casos (13,2%)
- Mesoteliomas epiteliales.....4 casos (13,2%)
- Leiomiosarcoma primario.....1 caso (3,3%)
- Fibrohistiocitoma maligno.....1 caso (3,3%)

**TABLA IV**

**DISTRIBUCION DEL MATERIAL SEGUN EL TIPO TUMORAL**

**A.- NEOPLASIAS EPITELIALES MALIGNAS :**

- Neumonectomías.....	28	(34.2%)
- Lobectomías.....	34	(41.5%)
- Resecciones atípicas.....	13	(15.87%)
- Biopsias pulmonares.....	7	(8.5%)

*TOTAL...82 casos*

**B.- NEOPLASIAS NO EPITELIALES :**

- Neumonectomías.....	1	(3.3%)
- Lobectomías.....	2	(6.6%)
- Resecciones atípicas.....	16	(52.8%)
- Biopsias pulmonares.....	11	(36.3%)

*TOTAL...30 casos*

**hallazgos**

## HALLAZGOS

### I.- NEOPLASIAS EPITELIALES MALIGNAS.-

El método de cultivo de tejidos de Gey modificado por Kersting (68,69), aplicado al crecimiento in vitro de neoplasias epiteliales pulmonares, consigue una rentabilidad del crecimiento discreta, con una media del 58,5 %.

### I.A.- Análisis global del crecimiento en los carcinomas.-

En el cuadro 1 se resumen de manera independiente el total de neoplasias epiteliales cultivadas (N), el número total de neoplasias cultivadas de cada tipo histológico (n) y el total de cultivos de tejidos efectuados (T=112). Representando C, los tumores que crecieron, según el tipo histológico.

De los cincuenta carcinomas epidermoides, se obtuvo crecimiento neoplásico en treinta y uno (62%). De los diez y seis adenocarcinomas, crecieron once casos (68.7%). En los dos grupos de carcinomas anaplásicos de células grandes y de células pequeñas, integrados cada uno por cuatro y dos tumores respectivamente, se obtuvo crecimiento, a su vez, en dos y uno de cada grupo

		<b>n</b>	<b>n/N</b>	<b>n/T</b>	<b>C</b>	<b>C/n</b>	<b>C/N</b>	<b>C/T</b>
<b>87.8</b>	<b>EPIDERMOIDE</b>	<b>50</b>	<b>60.9</b>	<b>44.6</b>	<b>31</b>	<b>62</b>	<b>37.8</b>	<b>27.7</b>
	<b>ADENOCARCINOMA</b>	<b>16</b>	<b>19.5</b>	<b>14.3</b>	<b>11</b>	<b>68.7</b>	<b>13.4</b>	<b>9.8</b>
	<b>ANAPLASICO CEL. GRANDES</b>	<b>4</b>	<b>4.9</b>	<b>3.6</b>	<b>2</b>	<b>50</b>	<b>2.4</b>	<b>1.8</b>
	<b>ANAPLASICO CEL. PEQUEÑAS</b>	<b>2</b>	<b>2.4</b>	<b>1.8</b>	<b>1</b>	<b>50</b>	<b>1.2</b>	<b>0.9</b>
<b>12.2</b>	<b>NO DIFERENCIADO</b>	<b>10</b>	<b>12.2</b>	<b>8.9</b>	<b>3</b>	<b>30</b>	<b>12.1</b>	<b>2.7</b>

**N** = N°total de neoplasias pulmonares epiteliales cultivados (82)

**n** = N°de neoplasias pulmonares epiteliales según histología

**T** = N°total de cultivos de tejidos efectuados (112)

(50%). En contraste con las cuatro variedades histológicas anteriores, los carcinomas no tipificados, utilizados como control de la utilidad del método, han crecido sólo tres casos (30%), el porcentaje más bajo de toda la serie. Tomando en conjunto los resultados, se puede afirmar que el crecimiento tumoral obtenido por este método se aproxima, en algún subgrupo histológico, al límite inferior admitido como aceptable en otros métodos (40), lo que permite aseverar que se trata de un método poco sensible para el estudio de las propiedades biológicas de los carcinomas pulmonares *in vitro*.

En las figuras 15 y 16, hemos representado el crecimiento tumoral de las neoplasias epiteliales pulmonares cultivadas. En ordenadas, los números asignados al orden cronológico en que se efectuó el cultivo. En abscisas, se registran simultáneamente el crecimiento tumoral y el de otras células contaminantes (fibroblastos, histiocitos y otras). El inicio y final de cada línea significan, respectivamente, el día en que se observa crecimiento y la finalización del mismo. Cuando es un punto, quiere decir que el éste sólo se apreció aquel día. Así en la figura 15 se representan los 31 carcinomas epidermoides. En la figura 16 los adenocarcinomas, carcinomas anaplásicos de células pequeñas, grandes, y los carcinomas indiferenciados.

En las figuras 17 y 18, siguiendo el mismo desarrollo que las dos anteriores, hemos representado el crecimiento fibroblástico, elemento contaminador de los cultivos. De nuevo en

# CRECIMIENTO TUMORAL EN CULTIVOS DE NEOPLASIAS EPITELIALES PULMONARES

## EPIDERMOIDE

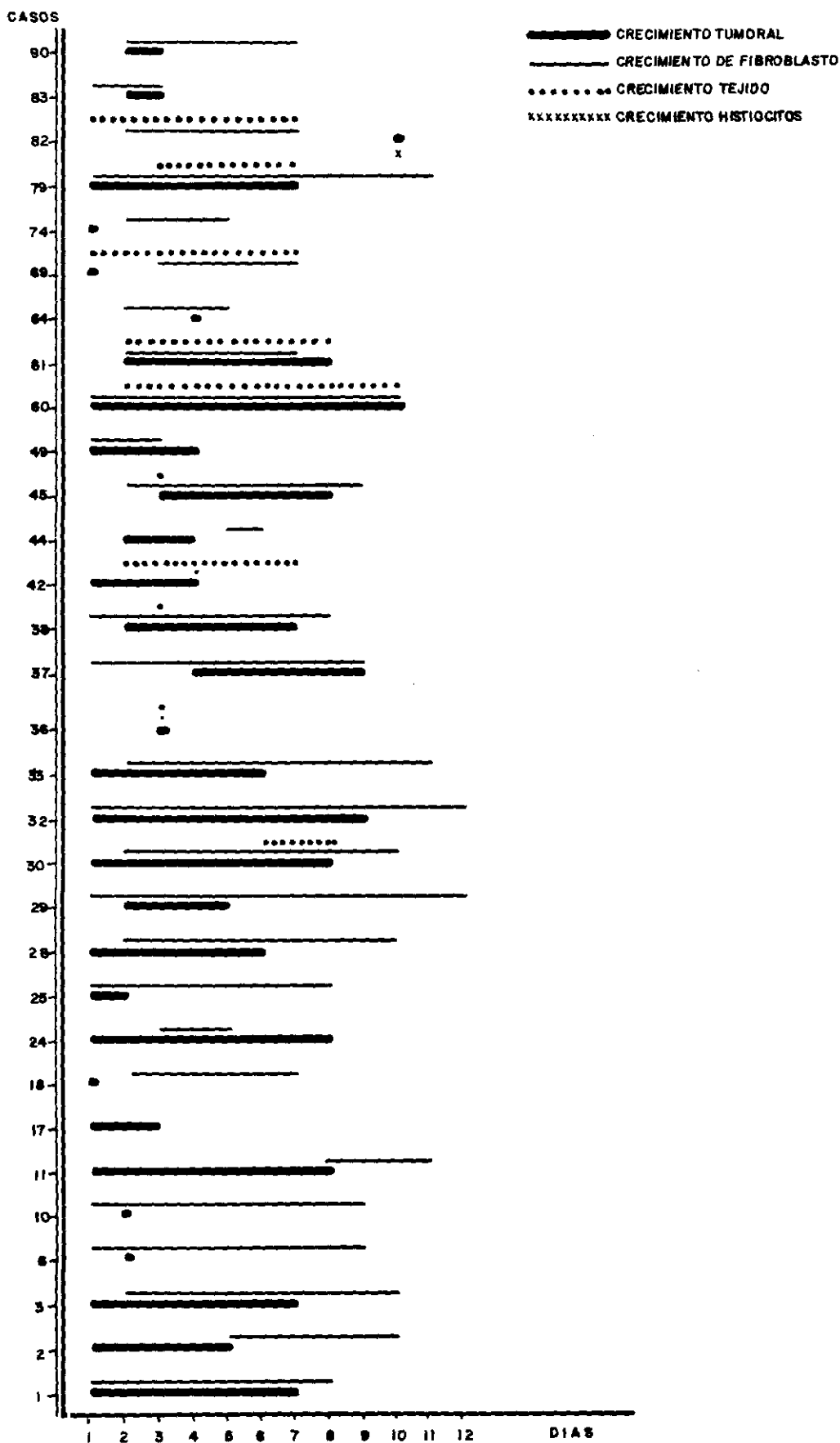


FIG.15

# CRECIMIENTO TUMORAL EN CULTIVO DE NEOPLASIAS EPITELIALES PULMONARES.

██████████ CRECIMIENTO TUMORAL  
 \_\_\_\_\_ CRECIMIENTO DE FIBROBLASTOS  
 ..... CRECIMIENTO DE TEJIDO  
 xxxxxxxxxxxx CRECIMIENTO DE HISTIOCITOS

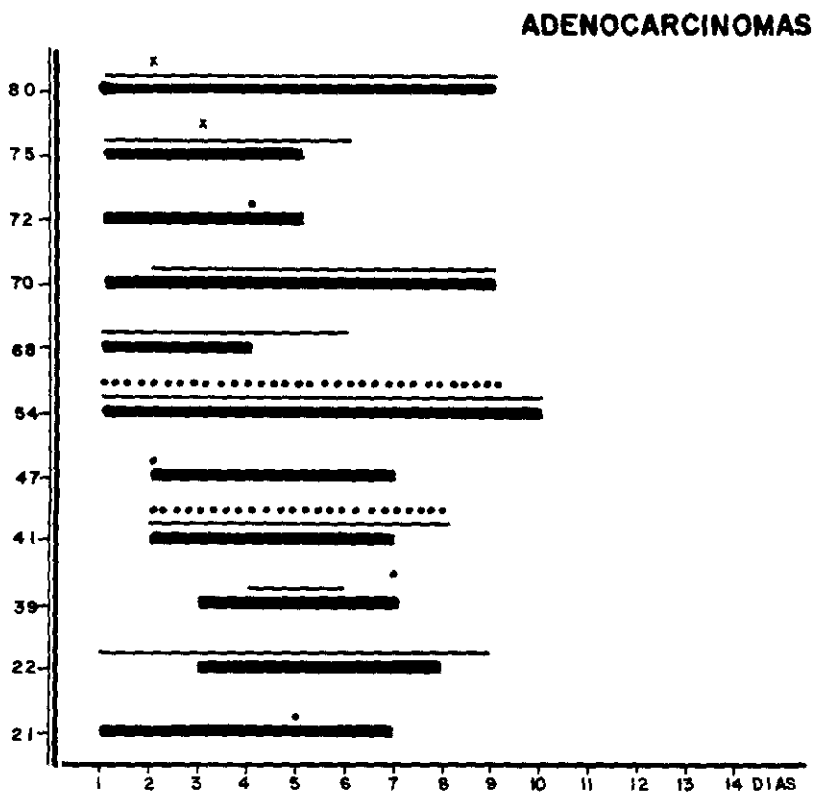
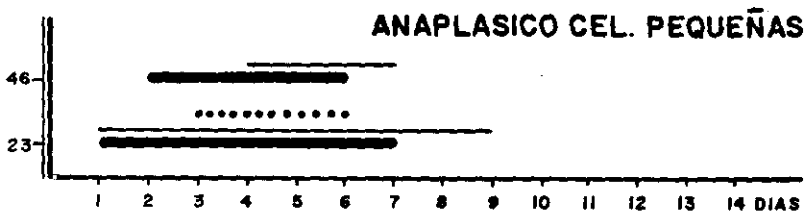
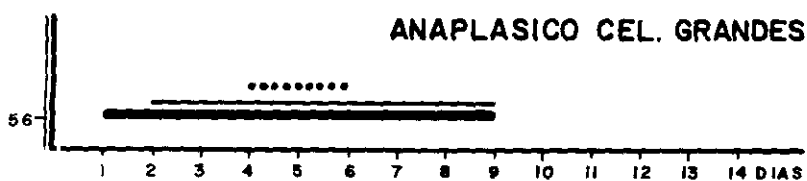
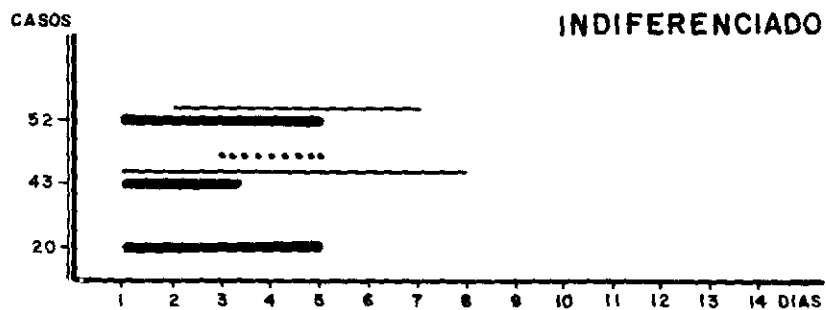


FIG.16

# EPITELIALES PULMONARES

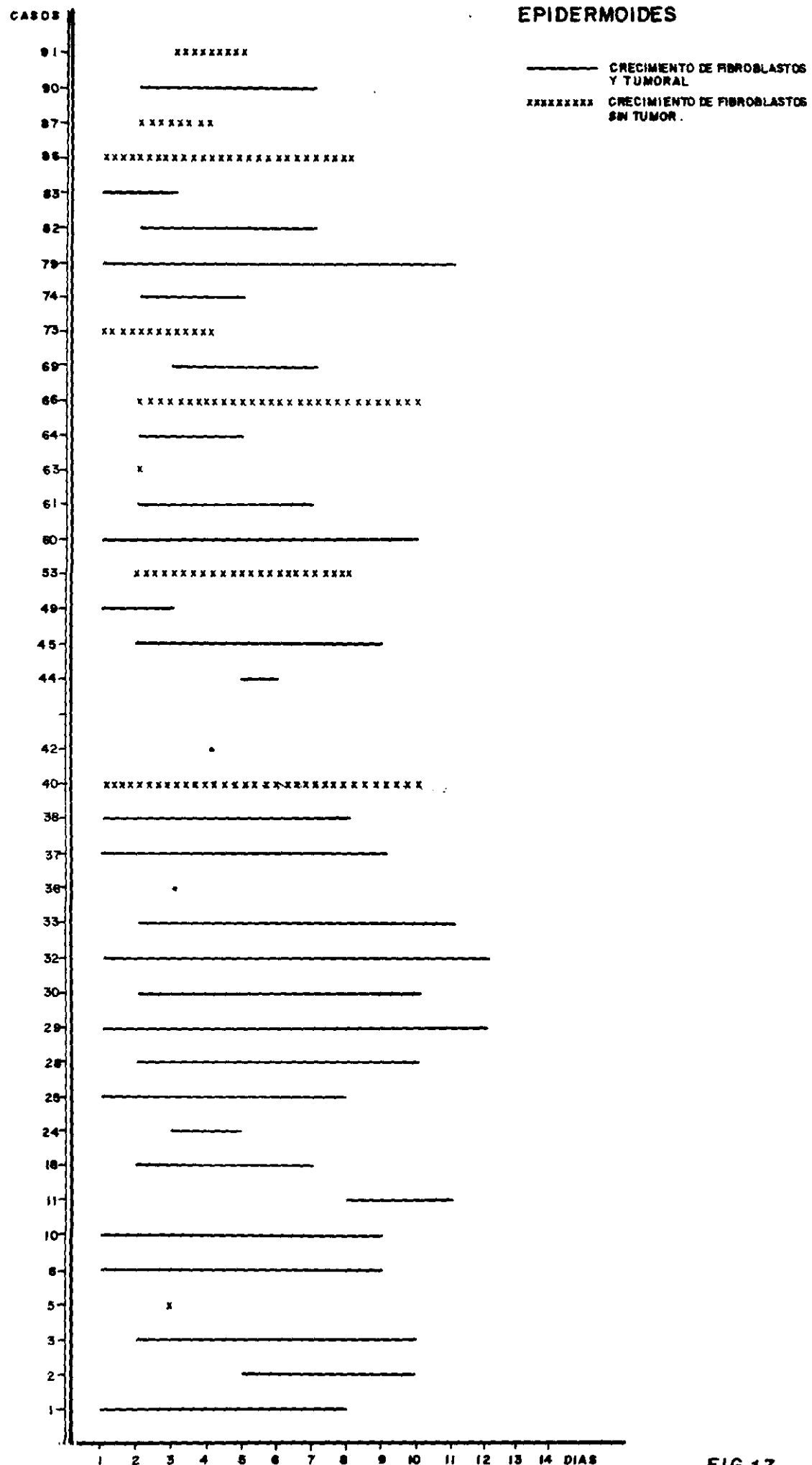


FIG.17

# CRECIMIENTO DE FIBROBLASTOS EN CULTIVOS DE NEOPLASIAS EPITELIALES PULMONARES.

————— CRECIMIENTO DE FIBROBLASTO Y TUMORAL  
XXXXXXXXXX CRECIMIENTO DE FIBROBLASTO SIN TUMOR

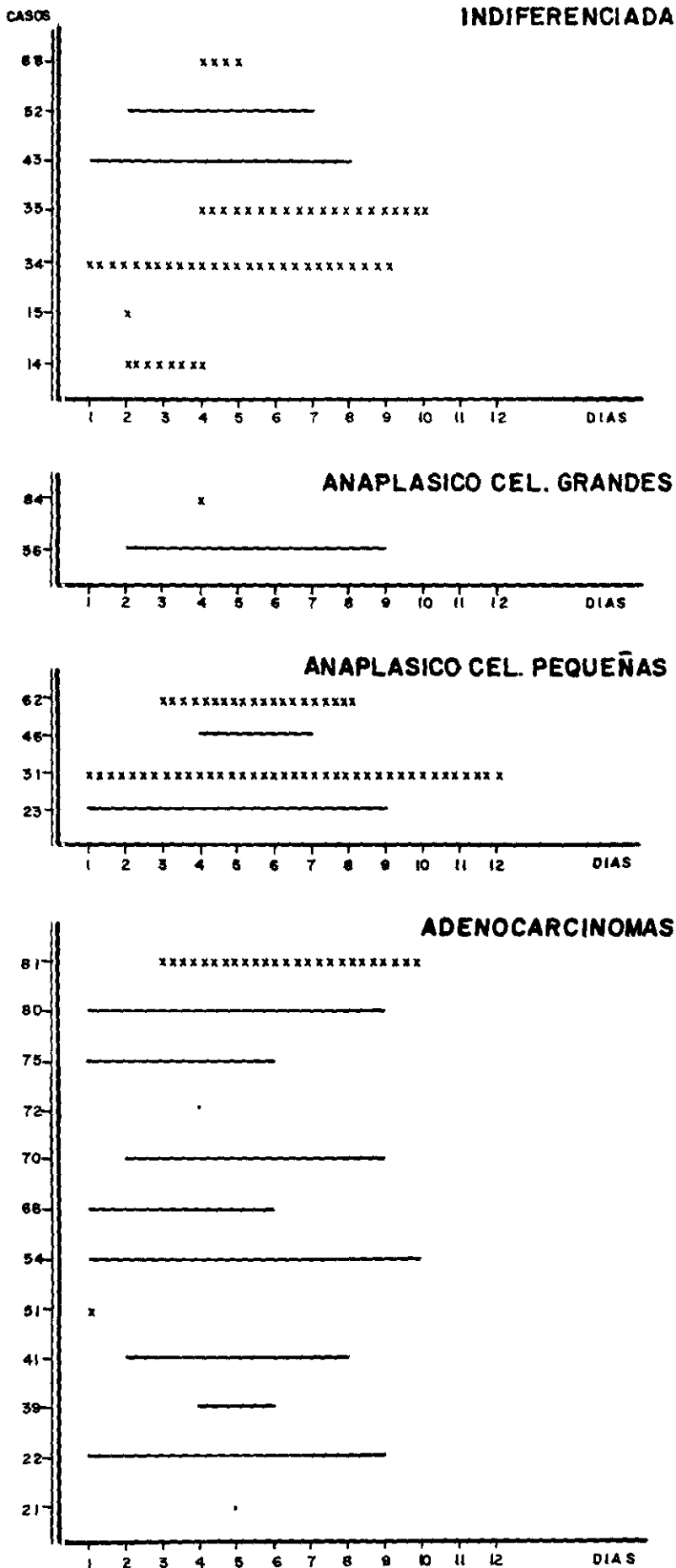


FIG.18

ordenadas, el número asignado corresponde al orden cronológico del cultivo. En abscisas, el inicio y finalización del desarrollo fibroblástico. La línea continua representa los casos en que crecen fibroblastos junto con el tumor. La línea de aspás señala los casos de proliferación fibroblástica sin tumor. En definitiva, como más adelante se verá, la presencia de fibroblastos en los cultivos de neoplasias epiteliales por el método de Kersting es muy frecuente. Representa, por desgracia, una contaminación indeseable y convierte el método en no selectivo para el desarrollo de estas neoplasias.

La figura 19, resume el crecimiento exclusivamente de los elementos que contaminan el método adaptado para neoplasias pulmonares. Se representan en una línea continua fibroblastos, en aspás los histiocitos y en puntos gruesos otros elementos. Supone una aclaración y ampliación de las cuatro figuras anteriores.

El crecimiento medio de explantos, según los distintos grupos histológicos cultivados, se resume en la figura 20. En todos los casos, es inferior al 25%. Por esta razón, y otras que se comentarán más adelante, este método es poco fiel y poco intenso.

# CRECIMIENTO NO TUMORAL EN CULTIVO DE NEOPLASIAS EPITELIALES PULMONARES.

\_\_\_\_\_ FIBROBLASTOS  
 x x x x x x x x x x HISTIOCITOS  
 . . . . . TEJIDO

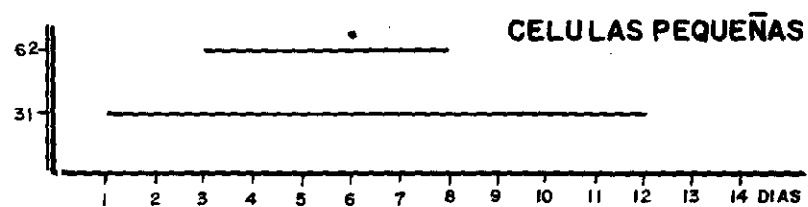
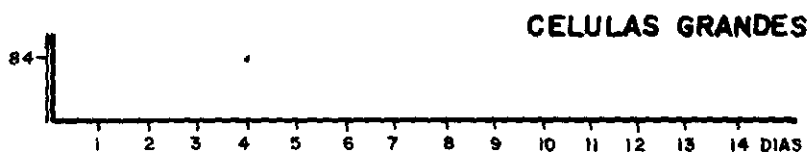
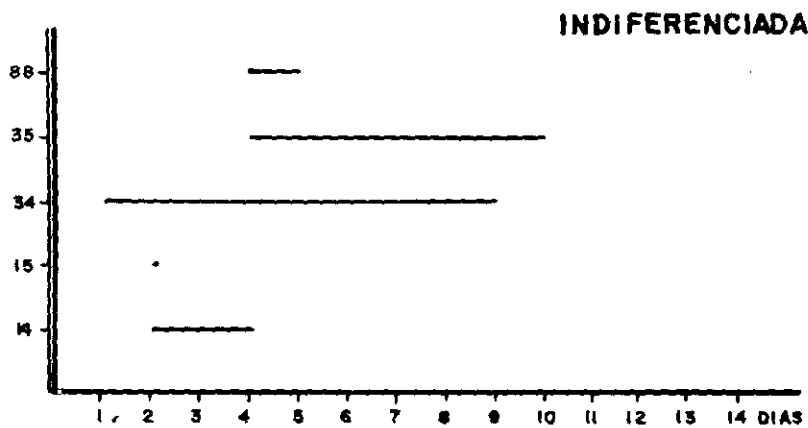
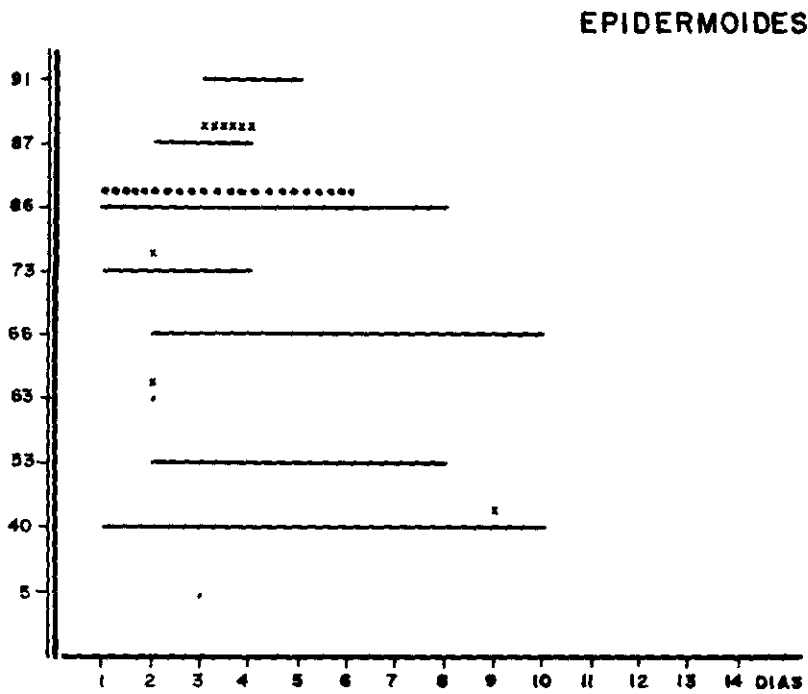
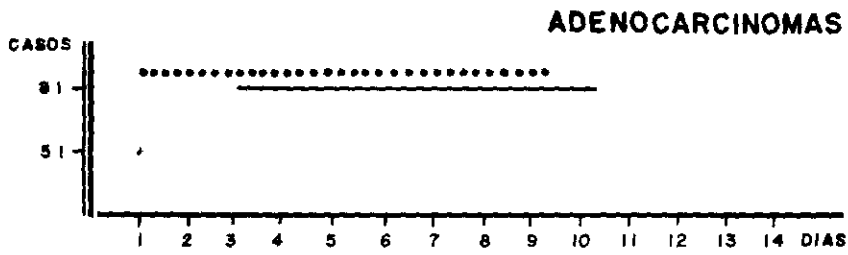


FIG.19

CRECIMIENTO MEDIO DE EXPLANTOS EN CULTIVOS DE  
NEOPLASIAS PULMONARES.

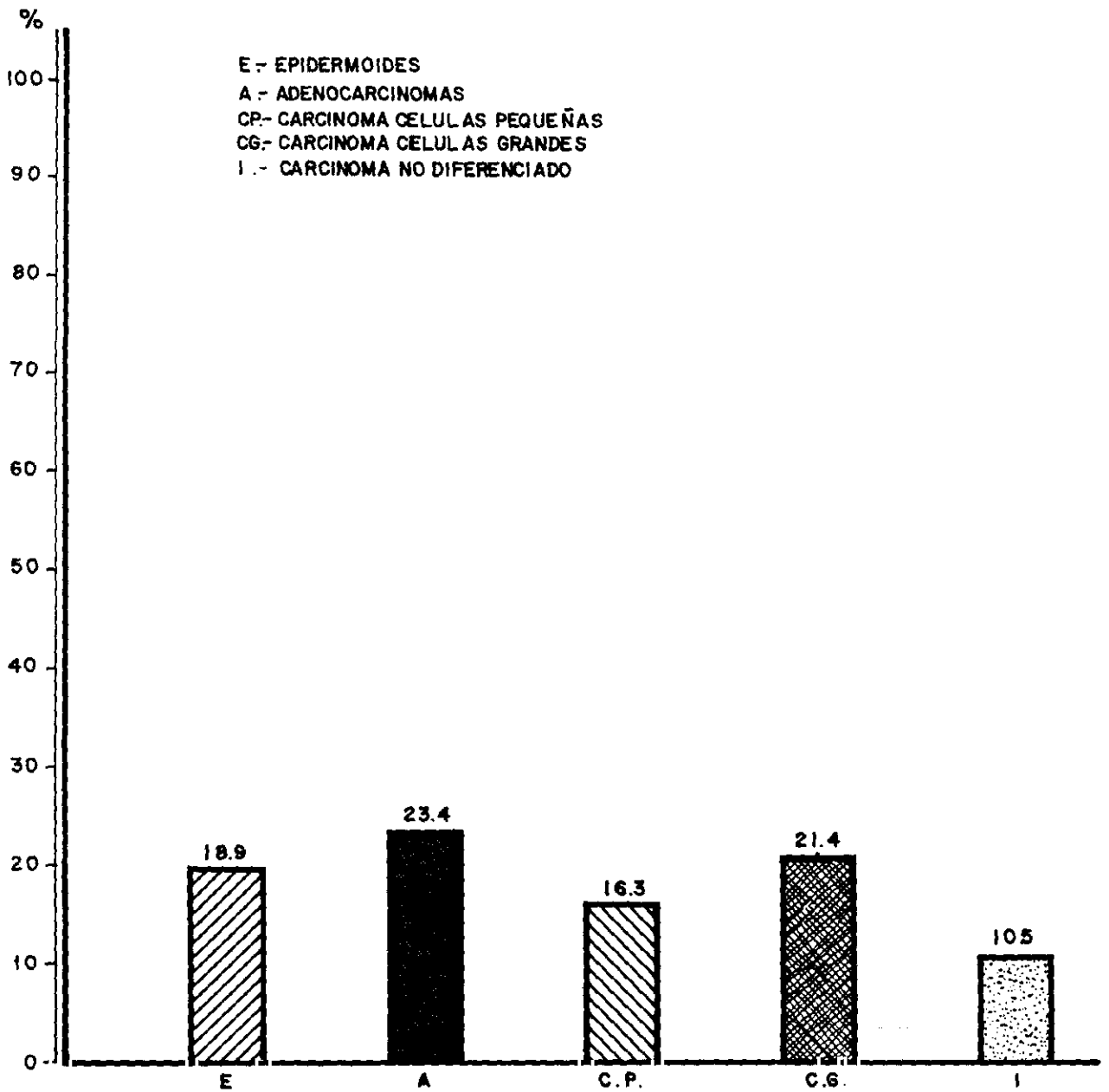


FIG. 20

## I.B.- Análisis del crecimiento según el tipo histológico de los carcinomas.-

### I.B.1.- Carcinomas epidermoides.-

En este grupo tumoral el promedio de tubos utilizados para el estudio fue de 8,6. La media de explantos por caso fue de 18,9. El análisis particular de los carcinomas epidermoides ofrece los siguientes resultados. La intensidad de crecimiento de células neoplásicas fue escasa (+ en el 77.4 de los casos, ++ en el 16.1%, +++ en el 6.5 %) (Fig. 21). El crecimiento fue en general precoz, (61.2% en explantos del primer tubo, 25.8% en explantos del segundo tubo, 13% en explantos del tercer tubo). Su finalización se observó en un porcentaje equivalente entre los tubos segundo al cuarto, quinto al séptimo y después del octavo.

Las células tumorales cultivadas aparecieron agrupadas en placas que tomaban su origen en el explanto de manera focal, de modo que extensas zonas del litoral del mismo, no presentaban ningún tipo de crecimiento neoplásico o de elementos celulares normales. Asociados o no a los fibroblastos se observaron placas de elementos tumorales carentes de rasgos morfológicos significativos, a excepción de una cierta tendencia, expresada de forma muy aislada, a agruparse de manera concéntrica alrededor de un elemento central. En ningún punto se encontraron, ni siquiera en esos campos, hallazgos sugestivos de diferenciación querática.

### I.B.2.- Adenocarcinomas.-

El promedio de tubos utilizados para el estudio fue de 9.2.

# CRECIMIENTO MEDIO DE EXPLANTOS EN TUMORES EPIDERMOIDES PULMONARES

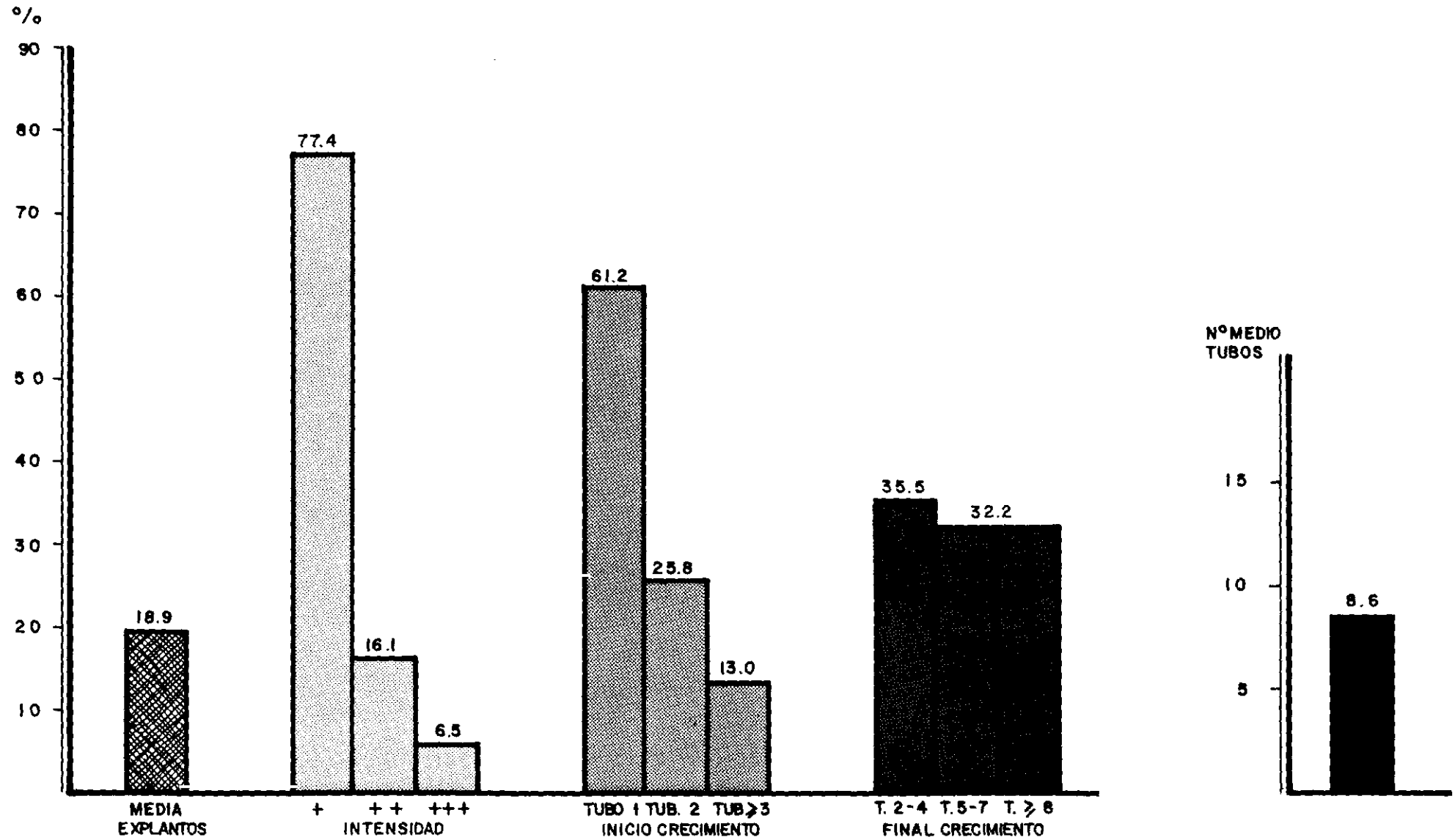


FIG. 21

La media de explantos por caso fue de 23.4. El análisis particular de los adenocarcinomas ofrece los siguientes resultados. La intensidad de crecimiento de las células neoplásicas no fué muy alta, pero si más que en el caso de los carcinomas epidermoides (+ en el 45.5% de los casos, ++ en el 45.5 % y +++ en el 9%). El comienzo del crecimiento fue muy precoz (en un 63.6% de los casos en el primer tubo, en un 18.2% en el tubo segundo, y en otro 18.2% en el tubo tercero o siguientes). Su finalización fue muy tardía, de manera que en un 27% de los casos se realizó a partir del quinto al séptimo tubo estudiado, y en un 73% a este último (Fig. 22).

Microscópicamente, los adenocarcinomas mostraron un crecimiento en parte similar al de los carcinomas epidermoides, en parte diferente. En los tumores de más baja madurez, las células tumorales crecieron también como placas apoyadas en el explanto, asociadas o no, o en proximidad a elementos fibroblásticos. Los tumores de mayor madurez tendieron a crecer a partir de "micro-explantos", agregados de pequeño tamaño de células neoplásicas, que mostraban una neta tendencia a la formación bidimensional de pequeñas cavidades acinares. Estas células presentaban asimismo producción de moco en vacuolas intracelulares, observables también en los carcinomas de más baja diferenciación. En un caso de tumor de células de tipo Clara, se demostró abundante glucógeno intracitoplásmico.

# CRECIMIENTO MEDIO DE EXPLANTOS EN TUMORES - ADENOCARCINOMAS PULMONARES

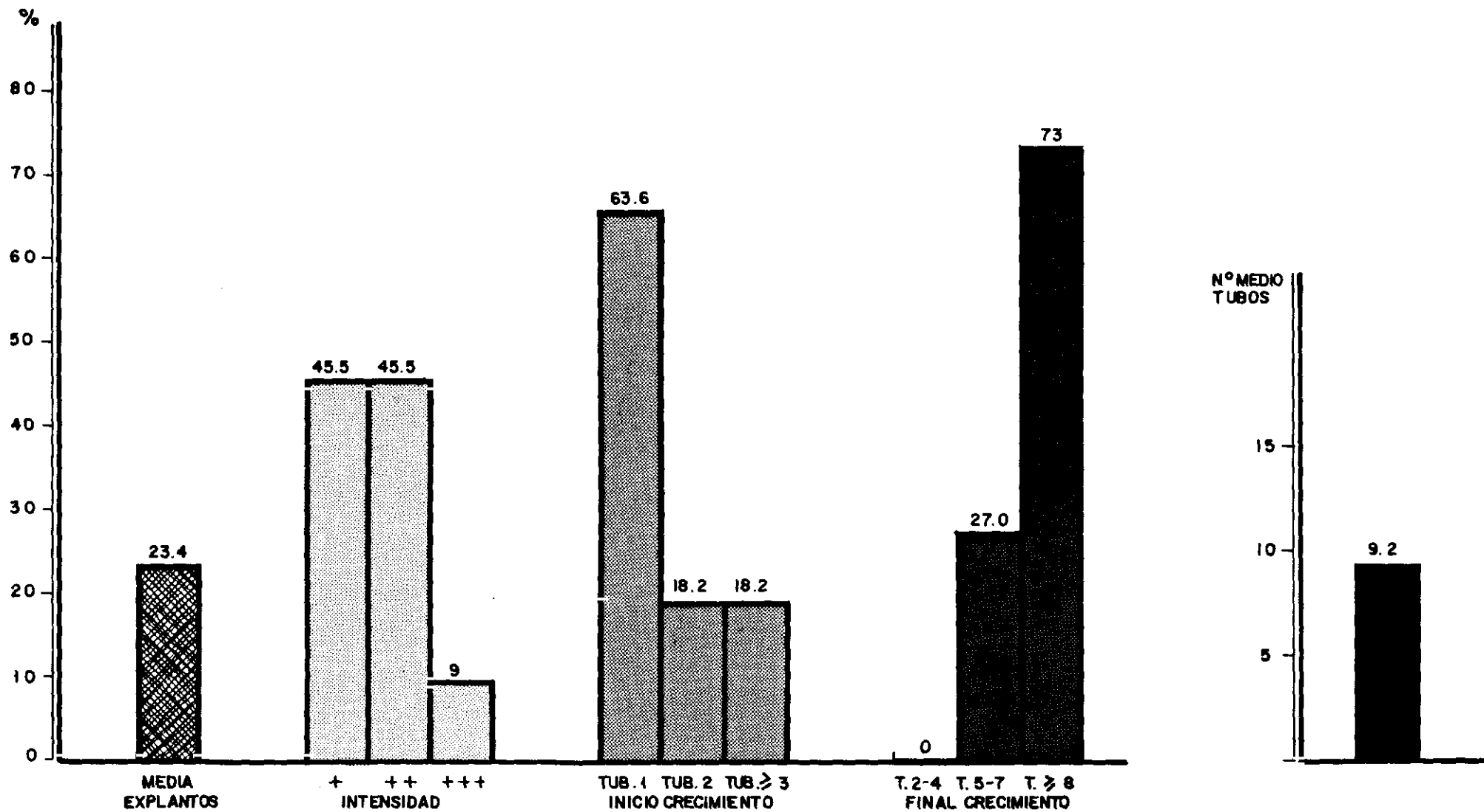


FIG.22

### I.B.3.- Carcinomas anaplásicos de células pequeñas.-

De ellos se estudiaron un promedio de 8 tubos y de 16.3 explantos por caso. El cultivo de los carcinomas anaplásicos de células pequeñas ofrece los siguientes rasgos. La intensidad fue variable, con un amplio rango de variación (+ un 50% de tumores, +++ el restante 50%). El inicio del crecimiento fue precoz, prácticamente el 100% de los tumores crecieron a partir de los tubos primero y segundo. El final de la proliferación tumoral fue también relativamente tardío, prácticamente el 100% de los casos a partir del quinto tubo (Fig. 23).

Morfológicamente, los tumores mostraron un crecimiento a expensas de elementos similares a los componentes del tumor originario, con baja cohesividad, distribuidos alrededor del explanto. En ellos, el rasgo más característico lo constituían su aspecto citológico, siempre similar al hallado en el tumor originario, con una tendencia mínima o inexistente a la asociación en placa.

### I.B.4.- Carcinoma anaplásico de células grandes.-

Tiene una media de explantos crecidos del 21,4%. La media de tubos fue de 9 (Fig 24). El crecimiento fue precoz y persistente, microscópicamente las células se agruparon en placas focalmente en los explantos sin signos de diferenciación alguna.

# CRECIMIENTO MEDIO DE EXPLANTOS EN TUMORES - CARCINOMAS DE CELULAS PEQUEÑAS PULMONARES

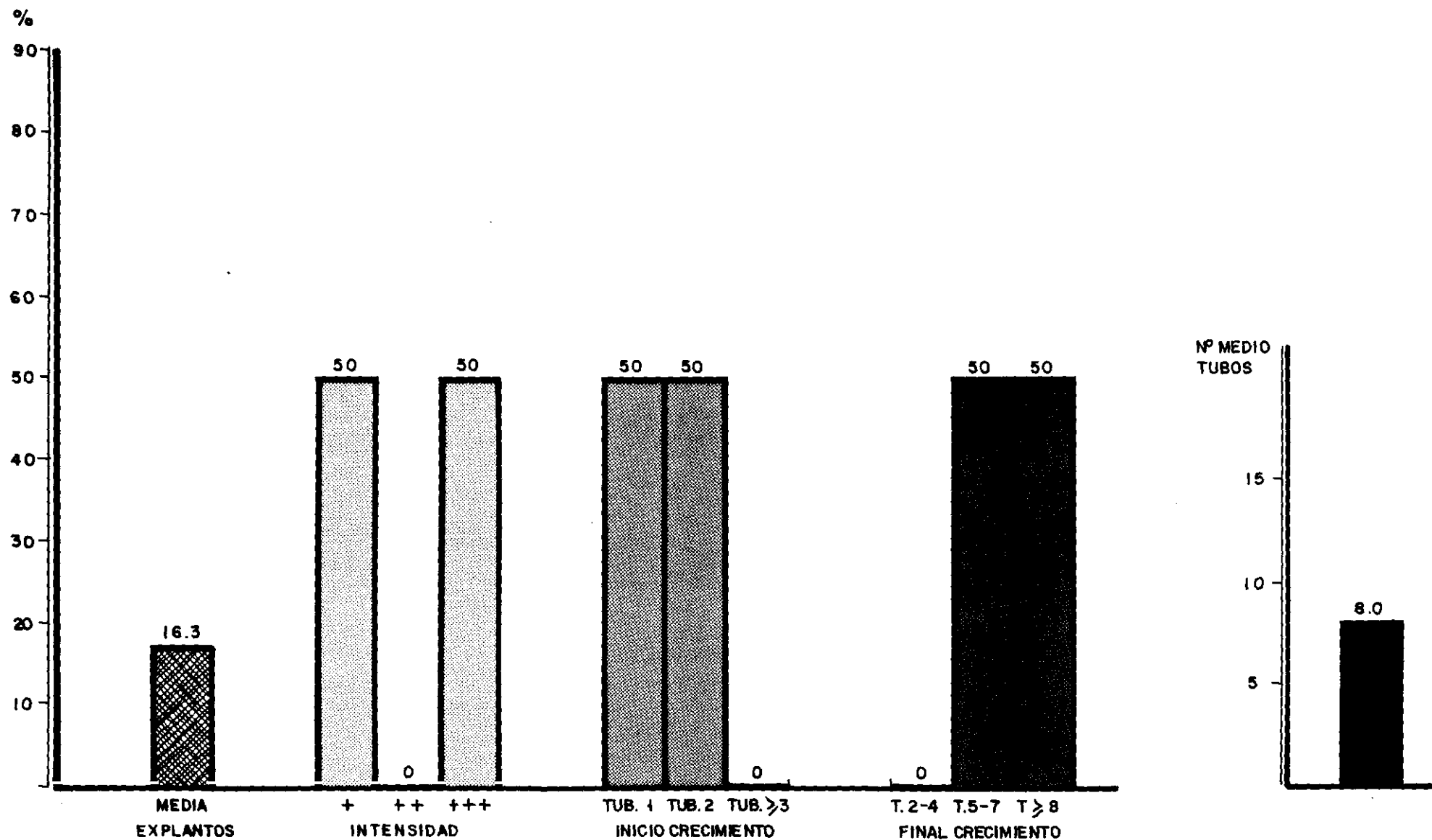


FIG. 23

**CRECIMIENTO MEDIO DE EXPLANTOS EN TUMORES- CARCINOMAS CELULAS GRANDES PULMONARES**

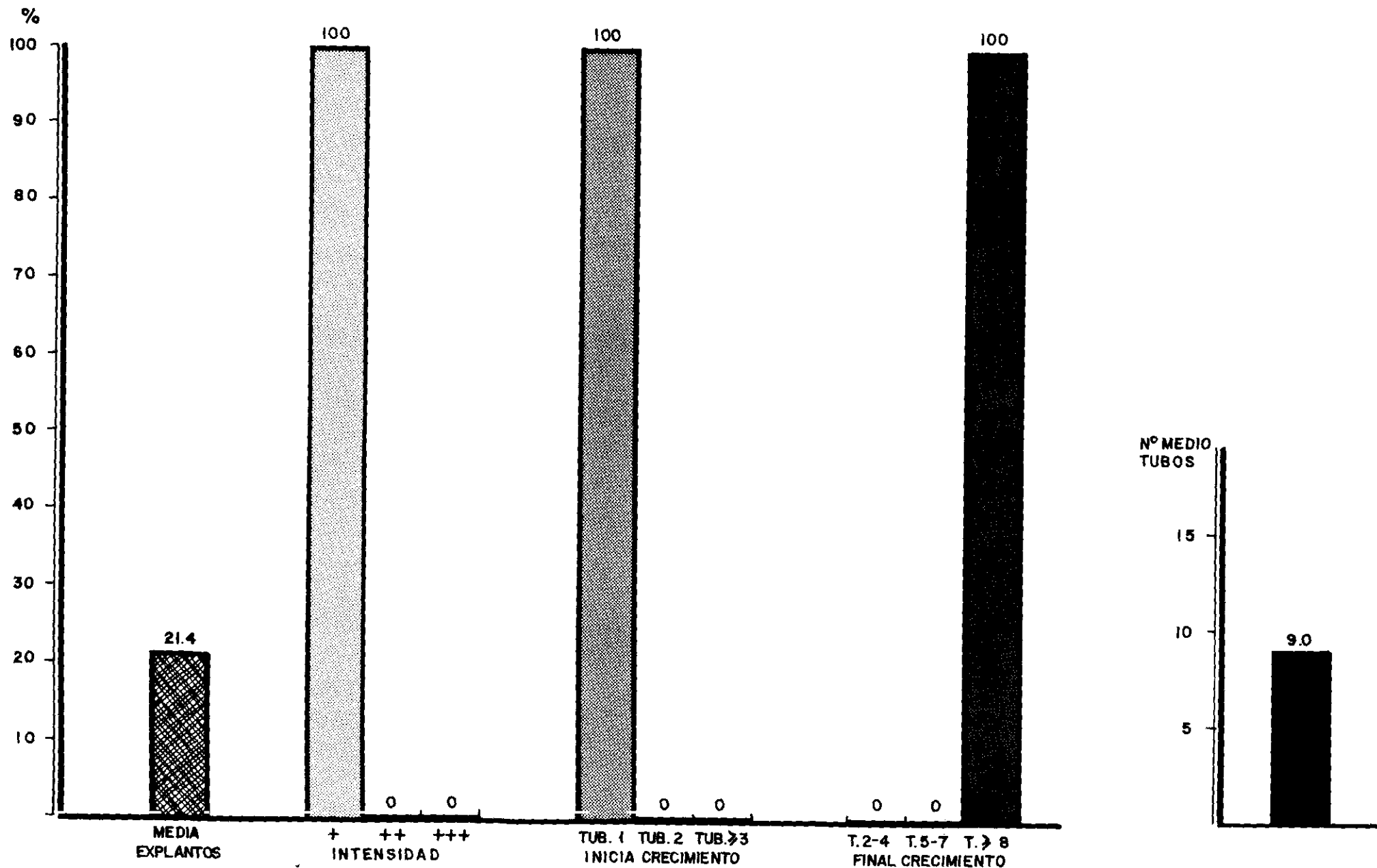


FIG. 24

I.B.5.- Carcinomas "indiferenciados".-

De ellos se estudiaron un promedio de 10 tubos con una media de 10.5 explantos por caso. La intensidad del crecimiento fue en general baja (66.6% +, 33.3% ++). Este fue precoz (el 100% de los casos crecieron en el primer tubo), y el final del mismo se alcanzó, en un 33% de los casos, entre los tubos segundo al cuarto, y en un 66%, de casos en los tubos quinto al séptimo (Fig. 25).

Morfológicamente, el crecimiento consistió en la aparición de placas o estructuras hemisféricas de manera focal, en el borde de los explantos, compuestas por células poligonales agrupadas formando un a modo de mosaico. En ninguno de los casos se encontraron indicios de diferenciación glandular o epidermoide, tampoco una modificación de la morfología celular que se asemejara en el explanto a los elementos tumorales de las células del carcinoma microcítico pulmonar. En definitiva, en ningún caso el cultivo tisular permitió una mejor subclasificación, por tanto, de la neoplasia.

# CRECIMIENTO MEDIO DE EXPLANTOS EN TUMORES-CARCINOMAS NO DIFERENCIADOS PULMONARES

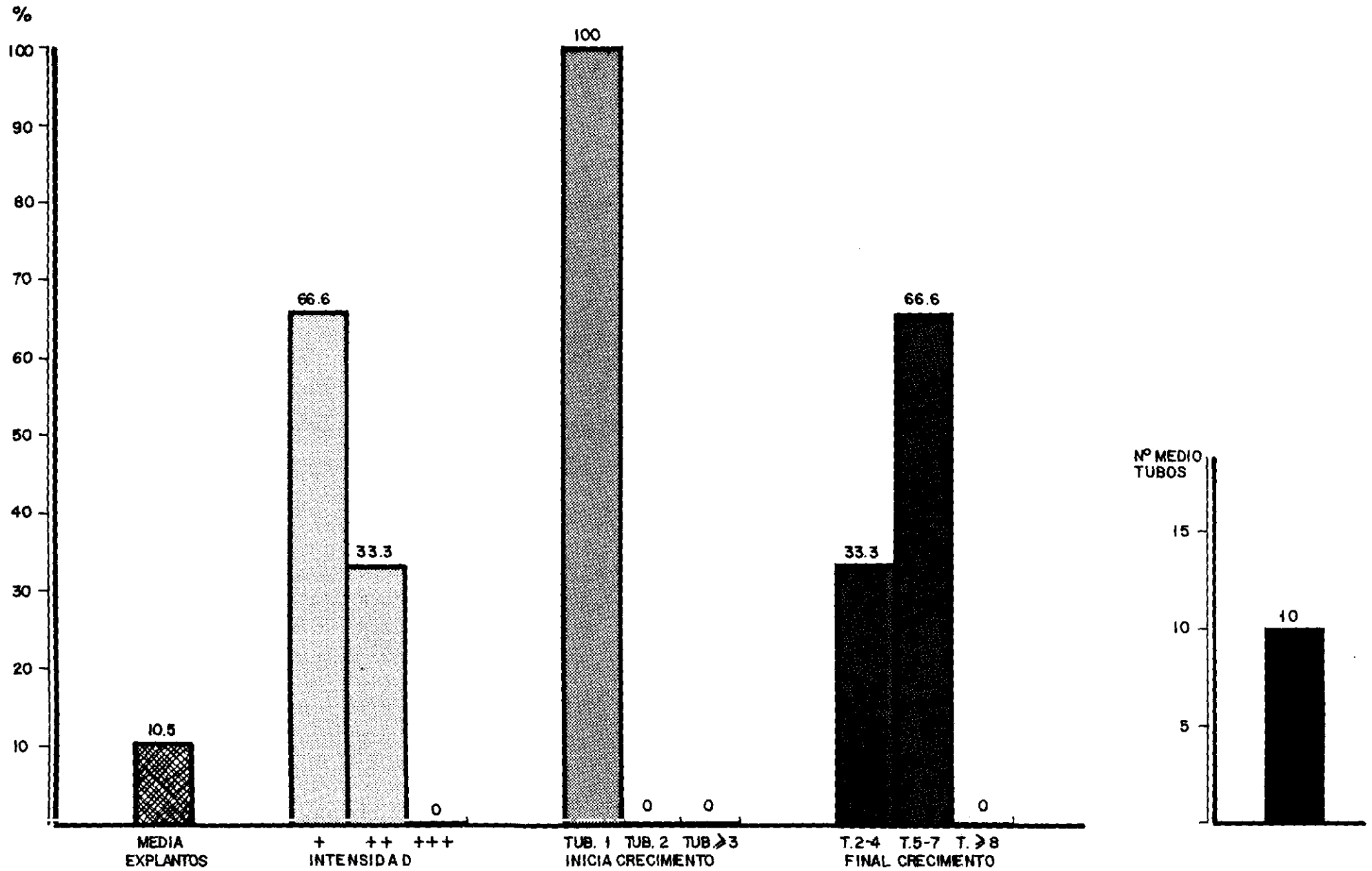


FIG. 25

I.B.6.- Crecimiento de elementos no neoplásicos.-

El

crecimiento comparativo de elementos tumorales y células normales aparece resumido en la figura 26. En ella puede apreciarse como en la mayoría del tumores se observa crecimiento de otros tejidos o células normales, asociado al tumoral en el 68.7% de adenocarcinomas, el 62% de epidermoides, el 50% de carcinomas anaplásicos de células grandes y de pequeñas células y en un 30% de carcinomas "indiferenciados" no tipificados. Sólomente en un 10% de estos últimos tumores, un 6.3% de adenocarcinomas y un 2% de epidermoides, tuvieron en los explantos un crecimiento de elementos tumorales exclusivos.

De los elementos celulares normales que más comúnmente han contaminado los cultivos, el más frecuente es el fibroblasto, presente en 100% de los carcinomas anaplásicos de células pequeñas y grandes, en un 80% de epidermoides, en un 75% de adenocarcinomas, y en un 70% de carcinomas "indiferenciados".

El análisis comparativo del crecimiento fibroblástico en los diferentes tipos de tumores, representado en las figuras 17,18 y 27, no demuestra ningún tipo de relación entre el desarrollo de elementos no tumorales y el del propio tumor, así como tampoco ningún perfil distintivo entre las distintas variantes de carcinomas y su acompañamiento de células normales.

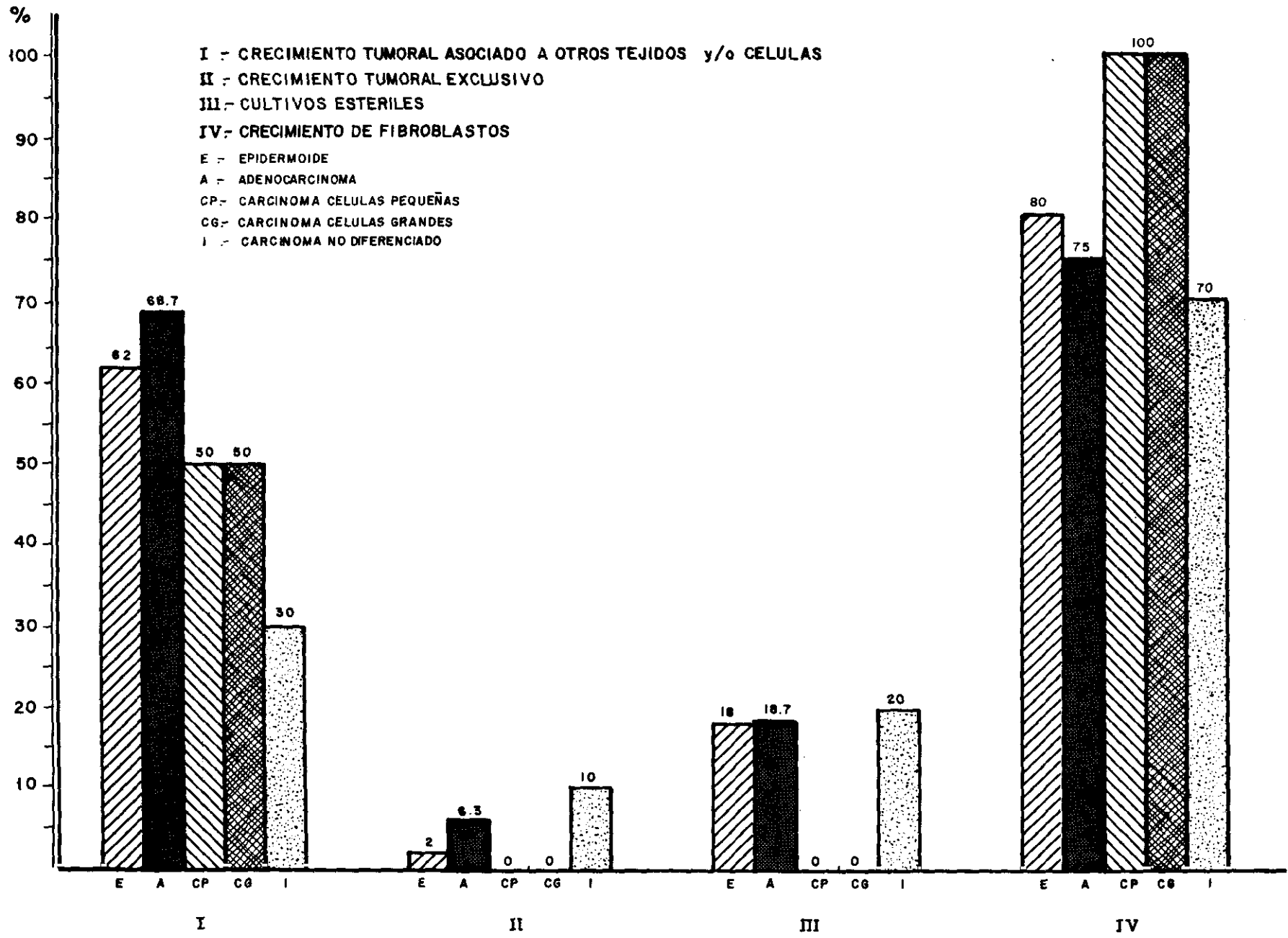


FIG. 26

# CRECIMIENTO DE FIBROBLASTOS EN CULTIVO DE NEOPLASIAS PULMONARES

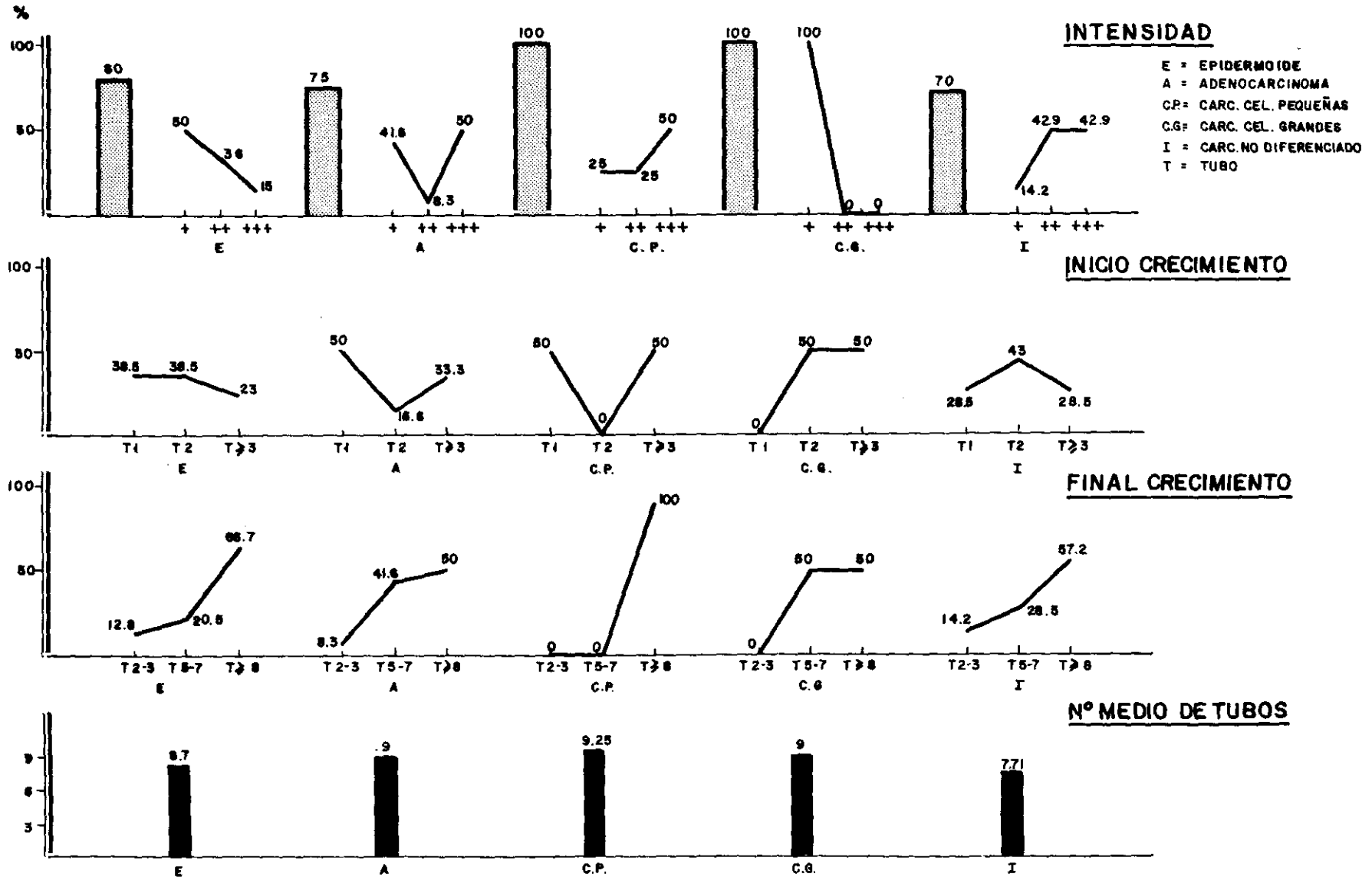


FIG. 27

Menor importancia tienen, como contaminantes, los histiocitos y la proliferación de unas células poligonales, de núcleo extremadamente regular, central y con acusada tendencia a la agrupación en placa, que, no siendo identificables por métodos exclusivamente histológicos, han sido interpretadas como de tipo neumocitario o endotelial.

**I.B.7.- Análisis estadístico de los resultados.-** Los resultados fueron analizados estadísticamente para evaluar si existían diferencias de comportamiento entre las distintas variedades histológicas explantadas.

En la figura 28, se representan los explantos medios efectuados, con sus correspondientes desviaciones típicas, de cada variedad histológica. Epidermoides: 39 +/- 12.44. Adenocarcinomas: 46 +/- 4.69. Carcinomas de células pequeñas: 41 +/- 7. Carcinomas de células grandes: 42 +/- 0. Carcinomas indiferenciados: 56.67 +/- 10.53. Podemos afirmar que el número de explantos cultivados es significativamente diferente entre epidermoides y adenocarcinomas, así como entre epidermoides e indiferenciados a favor de adenocarcinomas e indiferenciados con una  $p < 0.05$  (cuadro número 2).

# CRECIMIENTO TUMORAL EXPLANTOS CULTIVADOS

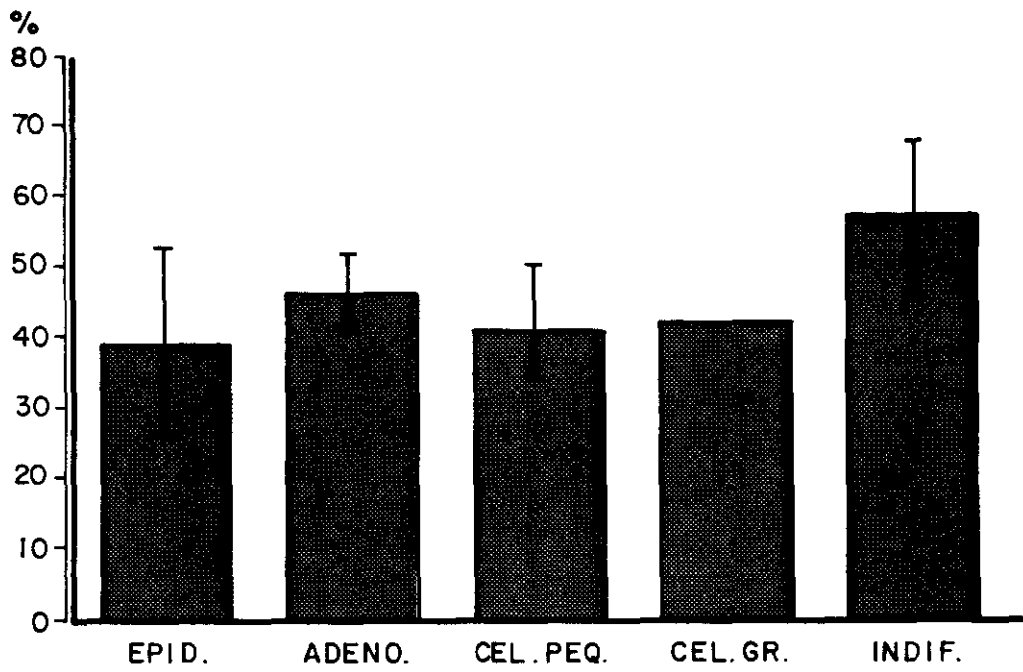


FIG. 28

**CRECIMIENTO TUMORAL  
EXPLANTOS CULTIVADOS**

	ADENOCARC.	CEL. PEQ.	CEL. GR.	INDIF.
EPIDERMOIDE	SI	NO	NO	SI
ADENOCARC.		NO	NO	NO
CEL. PEQ.			NO	NO
CEL. GRAND.				NO
INDIF.				

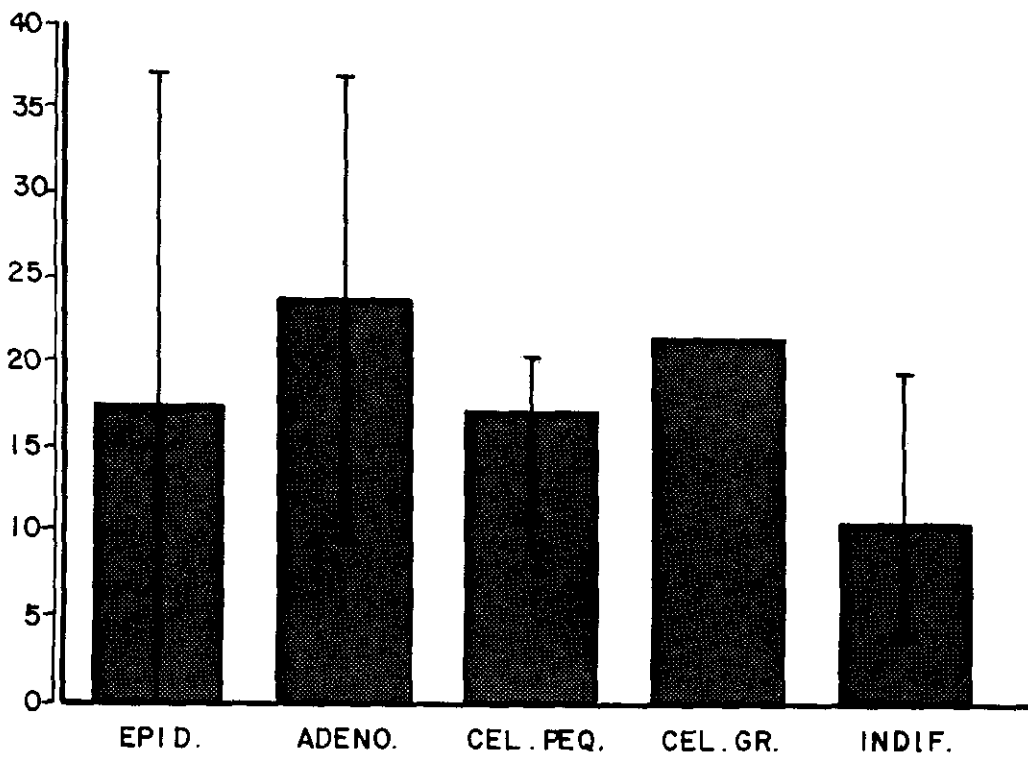
CUADRO 2

Por otro lado la figura 29, representa el % de explantos crecidos con sus correspondientes desviaciones típicas: Epidermoides, 18,87 +/- 18,9. Adenocarcinomas, 23,40 +/- 13,92. Carcinomas de células pequeñas, 16,30 +/- 4,53. Carcinoma de células grandes, 21,43 +/- 0. Carcinomas indiferenciados, 11,96 +/- 7,74. El cuadro número 3, señala diferencias significativas de crecimiento entre epidermoides y adenocarcinomas, a favor de los segundos, y entre epidermoides e indiferenciados, a favor de los primeros.

La duración del crecimiento, expresado en número de tubos crecidos, se señala en la figura 30. Epidermoides, 4,16 +/- 2,68. Adenocarcinomas, 6,36 +/- 1,61. Carcinomas de células pequeñas, 5,50 +/- 1,5. Carcinomas de células grandes, 8 +/- 0. Carcinomas indiferenciados, 4,33 +/- 0,94. La duración es significativamente mayor para los adenocarcinomas (cuadro numero 4).

La intensidad del crecimiento, es evaluada mediante la U de Mann y Witney, no demostrando que existan diferencias significativas entre todos los grupos histológicos (cuadro número 5).

**CRECIMIENTO TUMORAL  
% EXPLANTOS CRECIDOS**



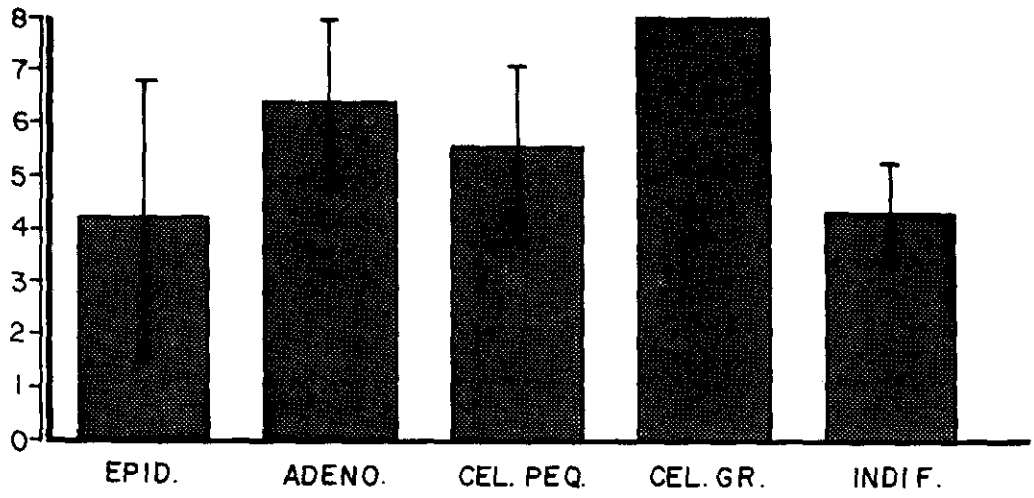
**FIG. 29**

**CRECIMIENTO TUMORAL  
% EXPLANTOS CRECIDOS**

	ADENOCARCIN.	CEL. PEQ.	CEL. GR.	INDIF.
EPIDERMOIDE	SI	NO	NO	SI
ADENOCARC.		NO	NO	SI
CEL. PEQ			NO	NO
CEL. GR.				NO
INDIF.				

CUADRO 3

**CRECIMIENTO TUMORAL  
DURACION**



**FIG. 30**

**CRECIMIENTO TUMORAL  
DURACION**

	ADENOCARC.	CEL. PEQ.	CEL. GR.	INDIF.
EPIDERMOIDE	SI	NO	NO	NO
ADENOCARC.		NO	NO	NO
CEL. PEQ.			NO	NO
CEL. GR.				NO
INDIF.				

CUADRO 4

**CRECIMIENTO TUMORAL  
INTENSIDAD**

	EPIDERMOIDE	ADENOCARC.	CEL. PEQ.	CEL. GR.	INDIF
EPIDERMOIDE		NS	NS	NS	NS
ADENOCARC.			NS	NS	NS
CEL. PEQ.				NS	NS
CEL. GR.					NS
INDIF.					

CUADRO 5

Para finalizar, se analiza la contaminación fibroblástica. En la figura 31, se expone de nuevo el número medio de tubos en los que al explantar tumor crecieron fibroblastos, asociados o no a él. Los epidermoides tuvieron una media de crecimiento fibroblástico de  $8,72 \pm 2,20$ . En los adenocarcinomas,  $9 \pm 1,54$ . En los carcinomas de células pequeñas,  $9,25 \pm 2,05$ . En los carcinomas de células grandes,  $9,0 \pm 0$ . En los carcinomas indiferenciados,  $7,71 \pm 2,54$ . En definitiva, el crecimiento fibroblástico no muestra diferencias significativas, desde el punto de vista estadístico, entre los distintos grupos histológicos explantados (cuadro numero 6).

El porcentaje medio de tubos en los que se desarrolló crecimiento de fibroblastos se representa en la figura 32. Epidermoides,  $56,94 \pm 24,51$ . Adenocarcinomas,  $53,95 \pm 26,76$ . Carcinomas de células pequeñas,  $67,76 \pm 4,24$ . Carcinoma de células grandes,  $33,33 \pm 0$ . Carcinomas indiferenciados,  $66,19 \pm 29,29$ . En el cuadro número 7, se demuestran diferencias significativas estadísticamente a favor de los primeros de cada pareja siguiente: 1) Epidermoide-Células grandes, 2) Indiferenciado-Epidermoide, 3) Indiferenciado-Adenocarcinoma, 4) Células pequeñas-Células grandes, 5) Indiferenciado-Células grandes.

### CRECIMIENTO DE FIBROBLASTOS TUBOS SEMBRADOS

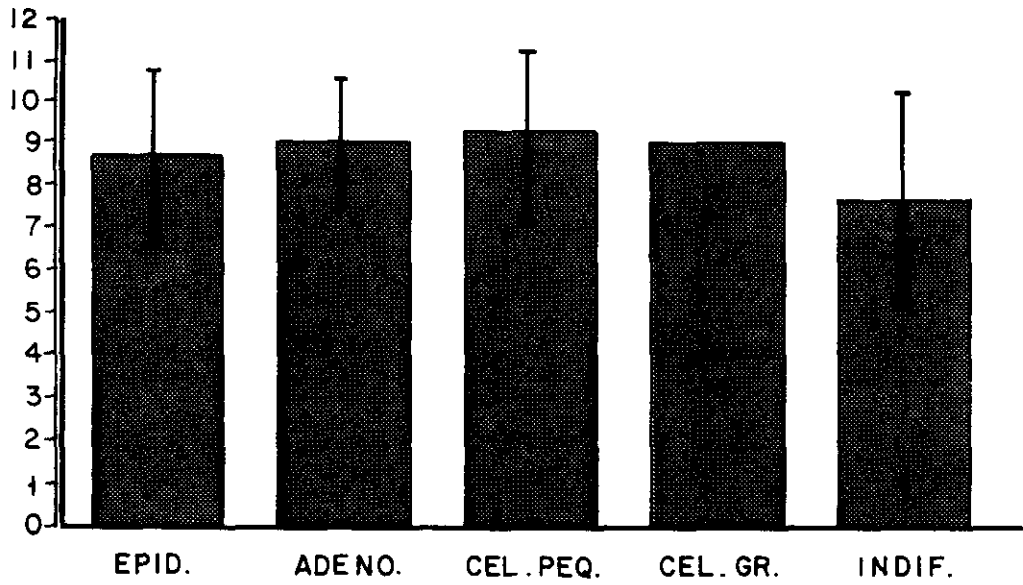


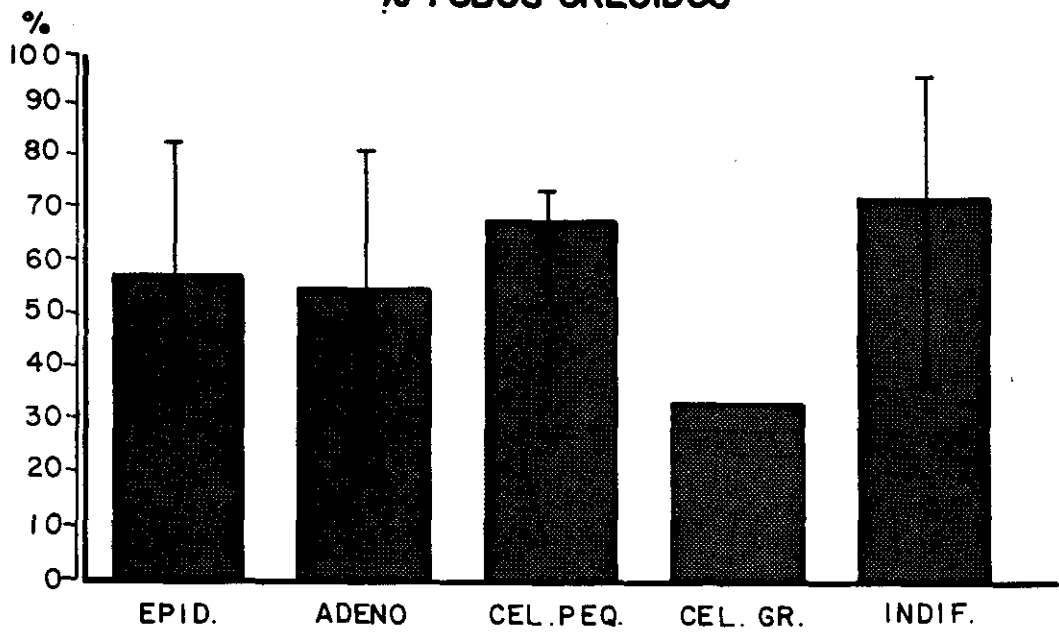
FIG.31

**CRECIMIENTO DE FIBROBLASTOS  
TUBOS SEMBRADOS**

	ADENOCARC.	CEL. PEQ.	CEL. GRAND.	INDIF.
EPIDERMOIDE	NO	NO	NO	NO
ADENOCARC.		NO	NO	NO
CEL. PEQ.			NO	NO
CEL. GRAN.				NO
INDIFEREN.				

CUADRO 6

**CRECIMIENTO DE FIBROBLASTOS  
% TUBOS CRECIDOS**



**FIG.32**

**CRECIMIENTO DE FIBROBLASTOS  
% TUBOS CRECIDOS**

	ADENOCARC.	CEL. PEQ	CEL. GR.	INDIF.
EPIDERMOID.	NO	NO	SI	SI
ADENOCARC.		NO	NO	SI
CEL. PEQ.			SI	NO
CEL. GR.				SI
INDIF.				

CUADRO 7

*Estas diferencias, desde un punto de vista práctico, no tienen mayor valor, siendo representación del estudio matemático más que de un comportamiento biológico. Traducen que el mayor porcentaje de tubos en los que se desarrollan fibroblastos es en la variedad de carcinomas indiferenciados sin que ello suponga que el método favorezca tal proliferación en dicha variedad.*

*Por último, no se encuentran diferencias estadísticas significativas de la intensidad de crecimiento de los fibroblastos en las distintas variedades histológicas explantadas (cuadro número 8).*

*En definitiva, el estudio estadístico parece indicarnos que las diferencias observadas, se deben más al número de explantos cultivados y crecidos, relativamente bajos en cada una de las variedades histológicas, que a una capacidad del método para favorecer el desarrollo de un grupo frente a otro. Por tanto, el estudio matemático es correcto pero no tiene una traducción biológica cierta.*

**CRECIMIENTO DE FIBROBLATOS  
INTENSIDAD**

	EPIDERMOIDE	ADENOCARC.	CEL. PEQ.	CEL. GR.	INDIF.
EPIDERMOIDE		NS	NS	NS	NS
ADENOCARC.			NS	NS	NS
CEL. PEQ.				NS	NS
CEL. GR.					NS
INDIF.					

CUADRO 8

## II.- NEOPLASIAS NO EPITELIALES.-

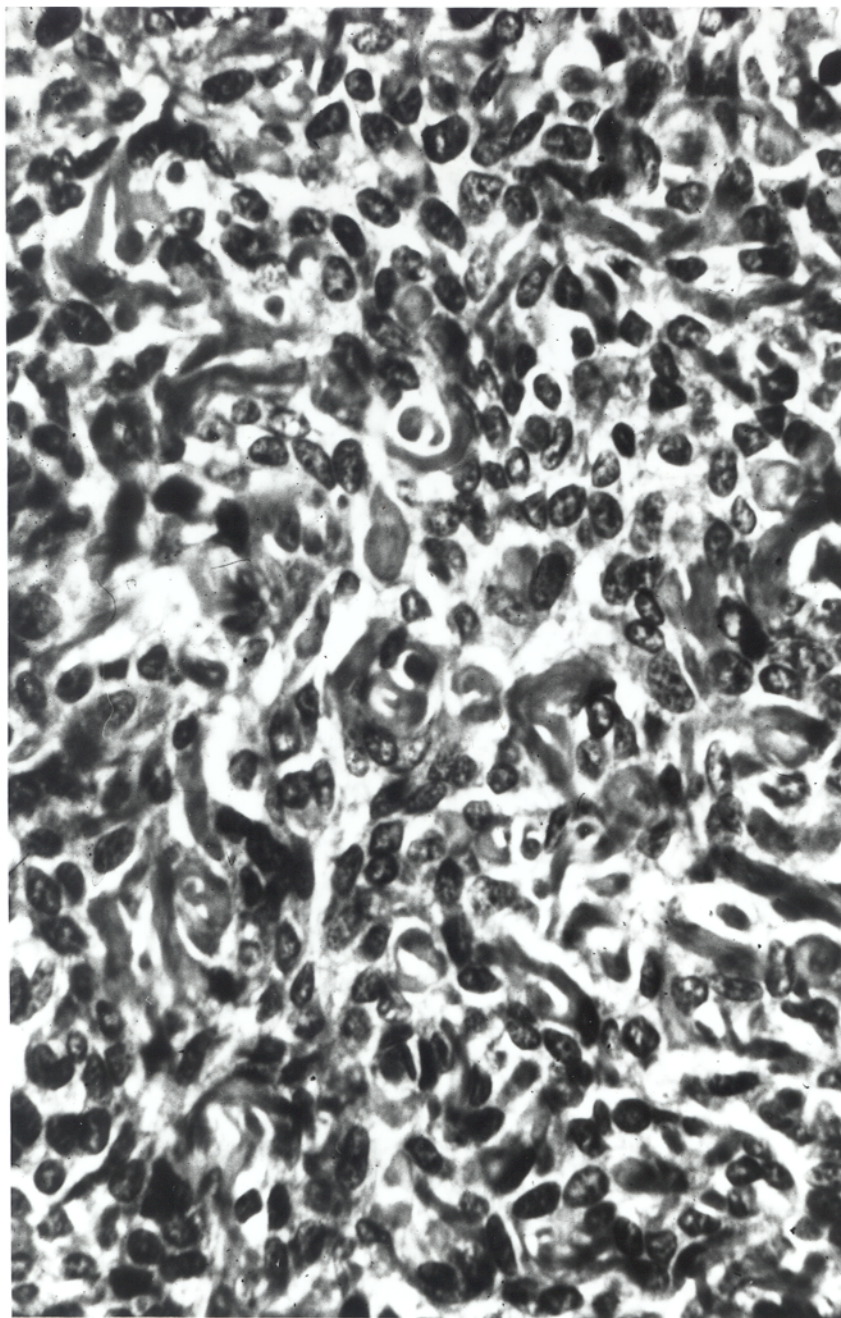
### II.A.- TUMORES MESOTELIALES.-

#### II.A.1.- Mesoteliomas monofásicos mesenquimales.-

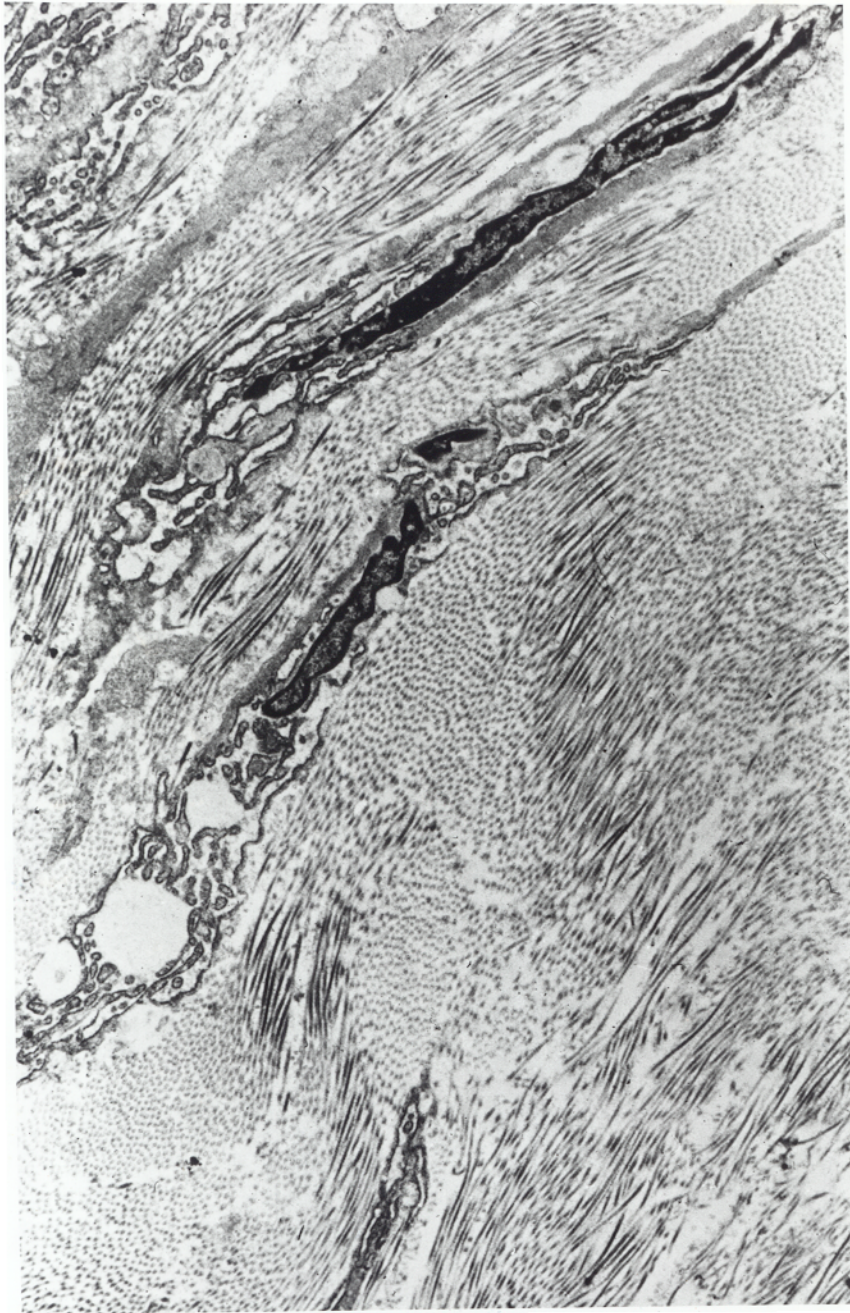
##### II.A.1.1.- "Mesoteliomas fibrosos".-

Los tres casos de mesotelioma fibroso incluidos en la serie, correspondieron a neoformaciones de localización superficial, compuestas histológicamente por una proliferación de elementos fusiformes, de aspecto fibroblástico asociados en fascículos. En uno de ellos, en el que el tumor se asociaba a la presencia de numerosas células plasmáticas perivasculares, existía un predominio de áreas esclerosas compuestas por colágena hialinizada con mínimo componente celular (Fig. 33). Desde el punto de vista ultraestructural, todas las células identificadas mostraron una morfología compatible con un origen fibroblástico. Las células eran elongadas, con abundante retículo endoplásmico rugoso y sin signo alguno de diferenciación citoplásmica (Fig. 34). De los marcadores inmunohistoquímicos utilizados, sólo la vimentina dió reacción positiva en las células tumorales.

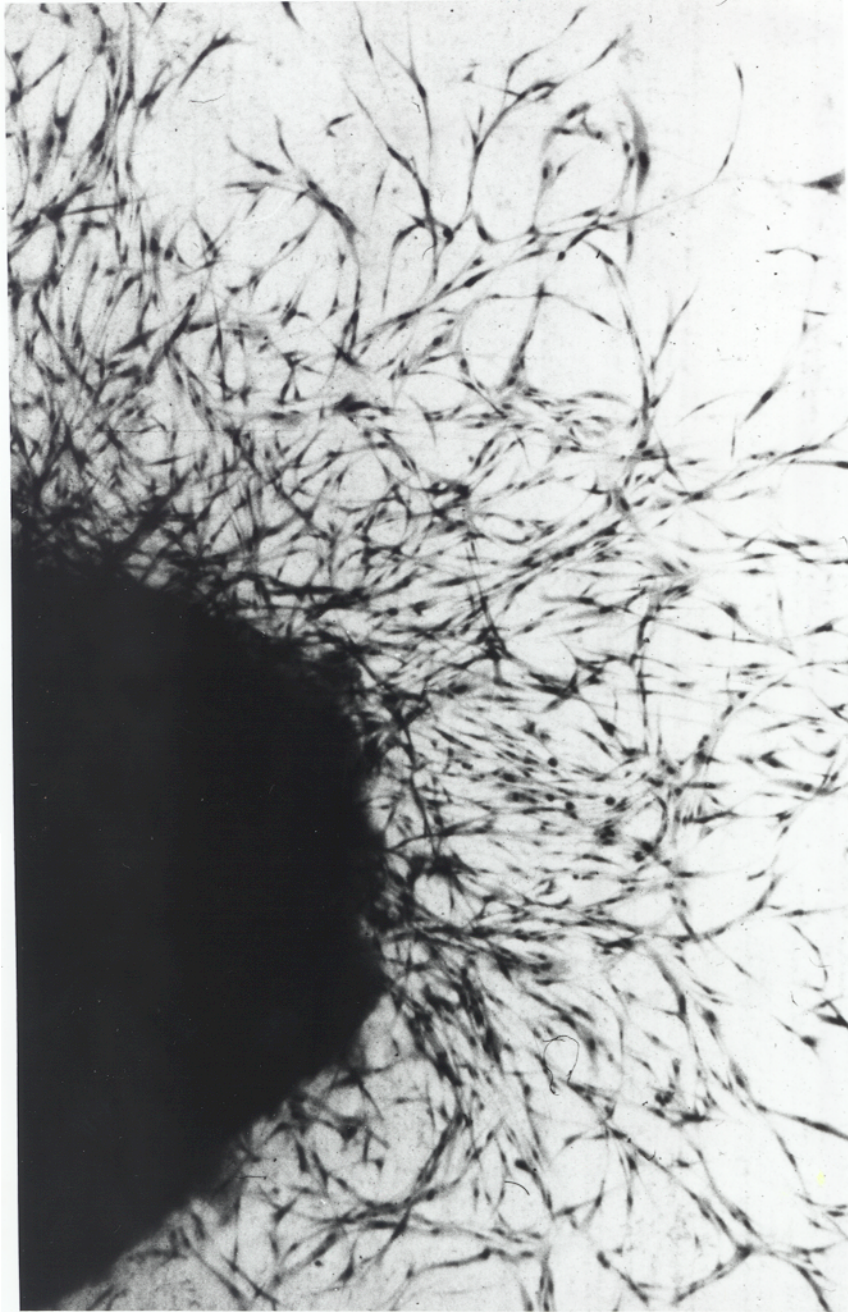
In vitro, se obtuvo crecimiento sólo en un caso. Fué precoz, poco intenso y persistente, estando constituido por elementos fusiformes o con un extremo citoplásmico bifurcado, que emigraron radialmente del explanto sin tendencia asociativa alguna. El crecimiento fué muy puro, sin contaminación por histiocitos o leucocitos (Fig. 35).



*Figura 33.- Aspecto en microscopía óptica de uno de los mesoteliomas fibrosos cultivados. El tumor aparece compuesto por elementos de conformación fusiforme sin atipia nuclear ni mitosis entre los que se observa una cantidad variable de fibras colágenas y vasos. Masson 200x.*



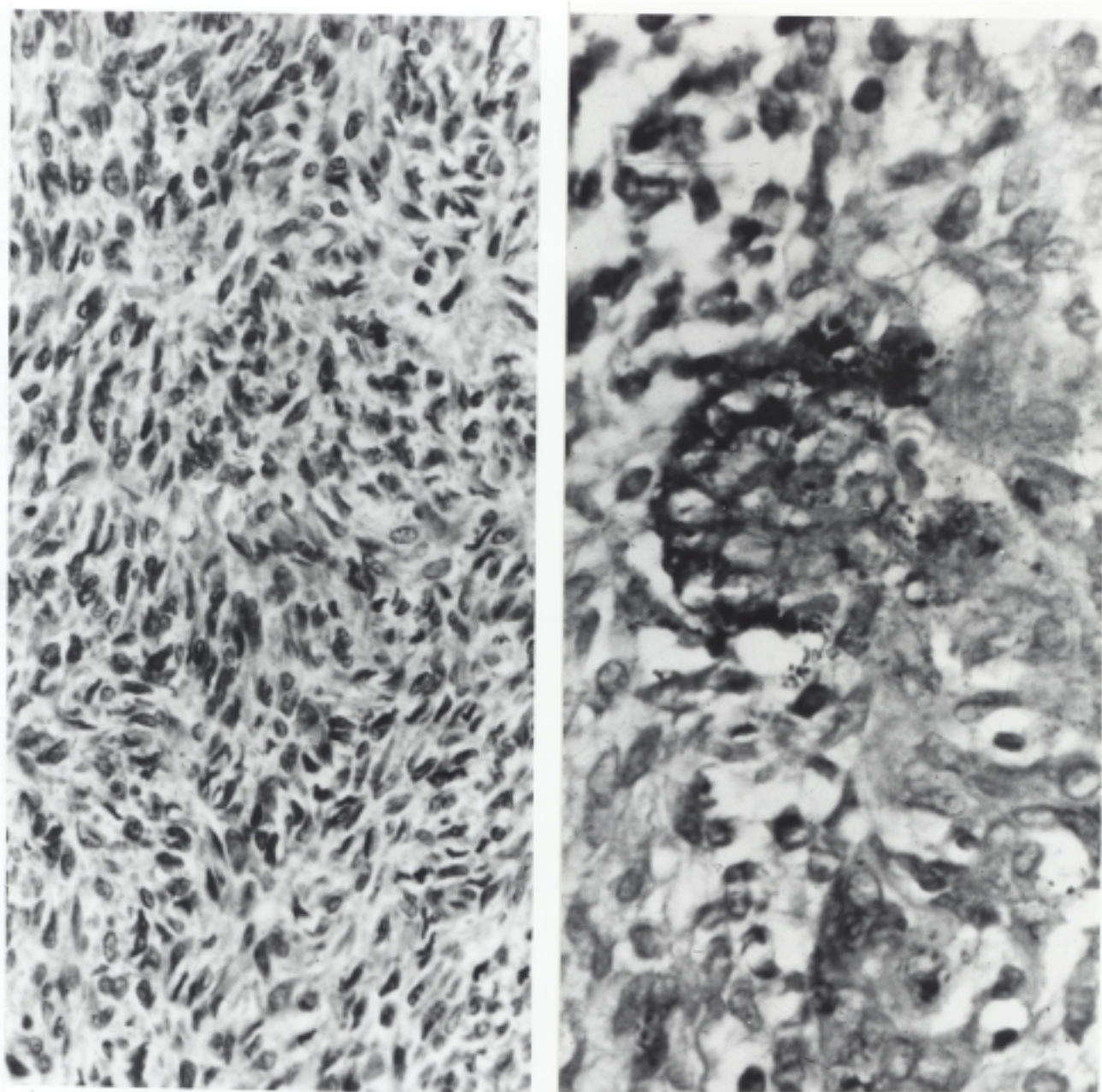
**Figura 34.-** Aspecto ultraestructural del mismo tumor en una zona más esclerosa. Puede verse cómo las células tumorales muestran un hábito fibroblástico con abundante retículo endoplásmico, y yacen en el seno de un estroma colágeno denso. Doble tinción 3000x.



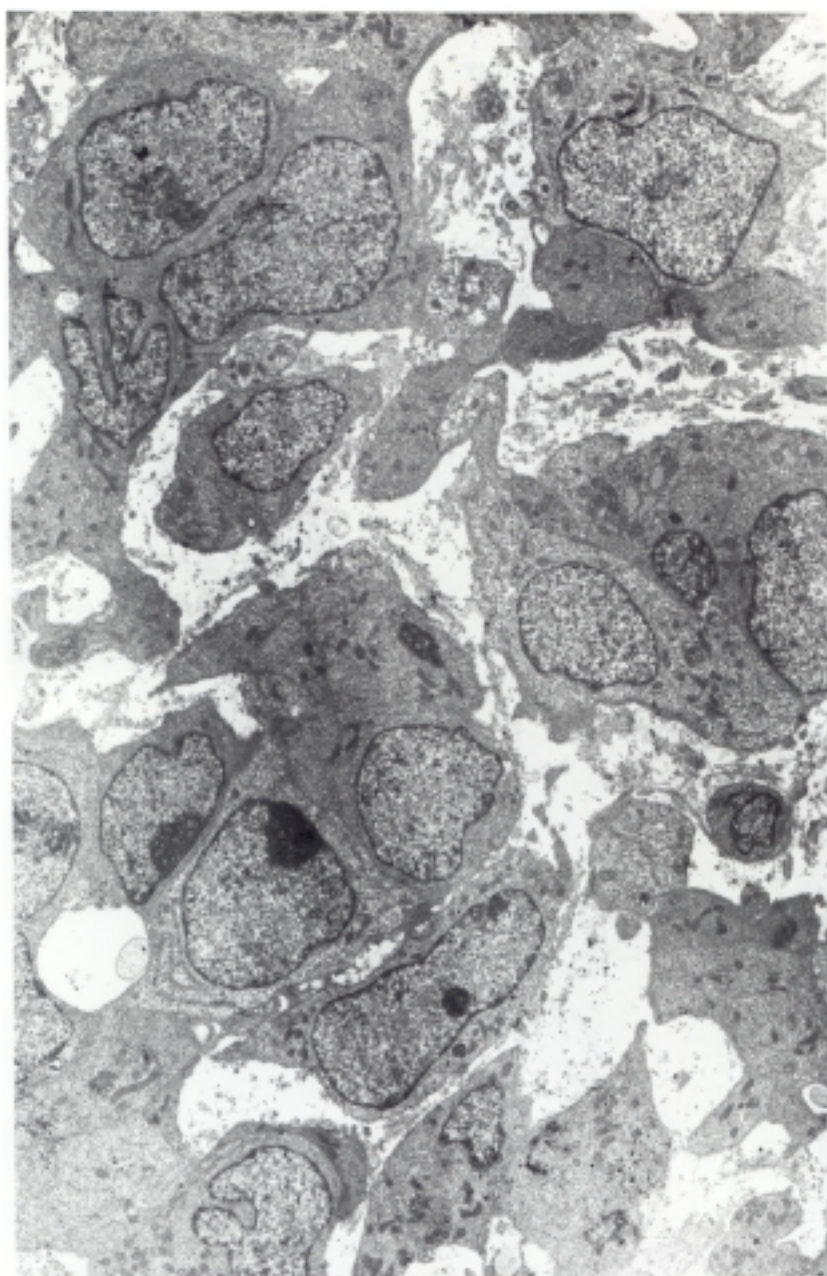
*Figura 35.- Mesotelioma fibroso benigno in vitro. Puede verse cómo la población celular está integrada por elementos fusiformes de aspecto fibroblástico sin tendencia asociativa. H. E. 40x.*

### II.A.1.2.- Mesoteliomas fibrosarcomatosos.-

Se incluyen en este grupo dos tumores de localización superficial y dos de situación profunda. Todos ellos estaban compuestos por una proliferación de células fusiformes, en general de morfología relativamente regular, con unos núcleos isomorfos y baja tasa mitótica. En uno de los tumores superficiales se observaban, diseminadas en su seno, algunas áreas en las que las células cambiaban su morfología, mostrando unos núcleos más redondeados y una mayor superficie citoplásmica. Estas células tenían también un contenido glucogénico citoplásmico muy llamativo, evidenciable mediante la técnica del PAS (Fig. 36). En los dos tumores profundos, se encontraban numerosas cavidades tapizadas por elementos cúbicos, entre los que se intercalaban células mucosecretoras. Mediante estudio histoquímico enzimático se podía demostrar la positividad de estas células para la fosfatasa alcalina, confirmando que corresponden a neumocitos o a células de Clara. El estudio ultraestructural de estos casos demostró una serie de rasgos que aparecen resumidos en la Tabla V. Las células, en los tres tumores en los que se dispuso de material correctamente fijado para microscopía electrónica, mostraban una neta tendencia a formar "agrupaciones", no muy evidentes en microscopía óptica (Fig.37). Los núcleos de uno de los dos tumores profundos intraparenquimatosos presentaban abundantes pseudoinclusiones citoplásmicas. En tres de cuatro casos, uno



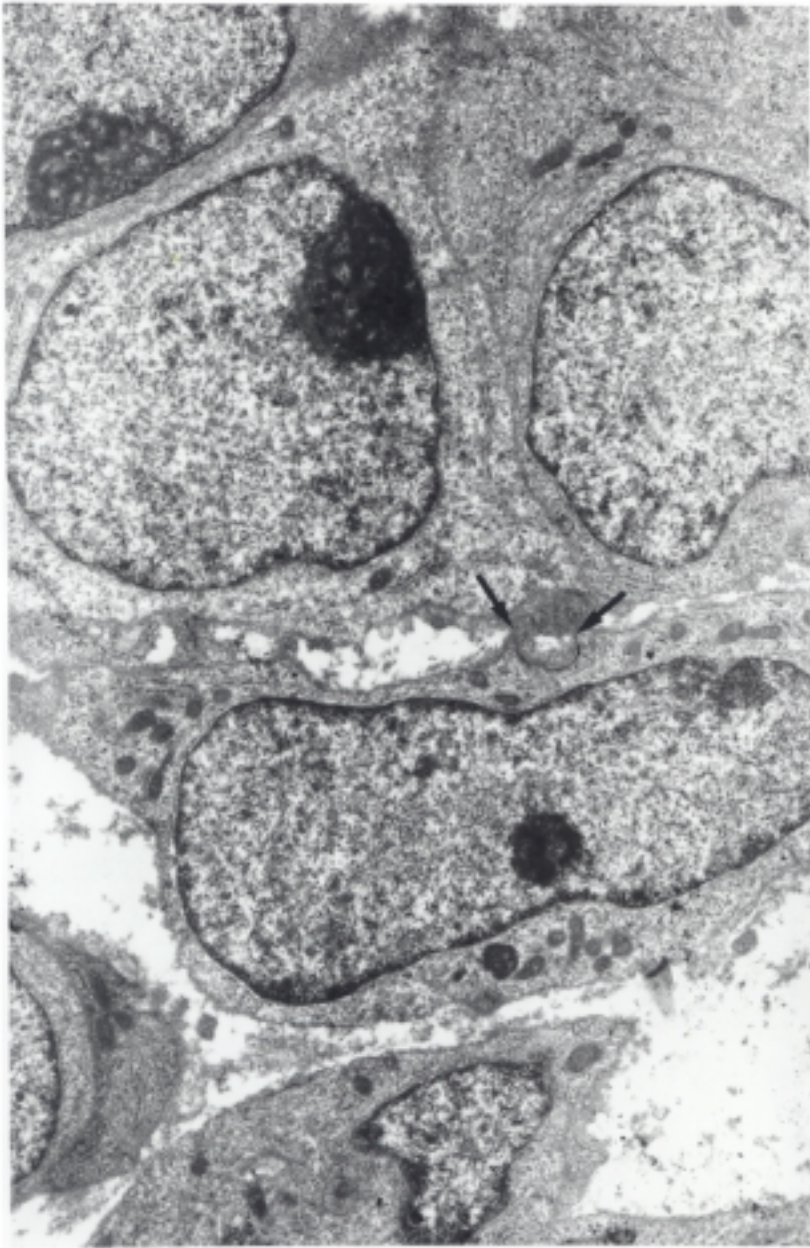
*Figura 36.- Izquierda. Mesotelioma fibrosarcomatoso. Area fusocelular pura. H.E. 200x. Derecha. El mismo tumor mostrando placas mal definidas con células con glucógeno intracitoplásmico. PAS 200x.*



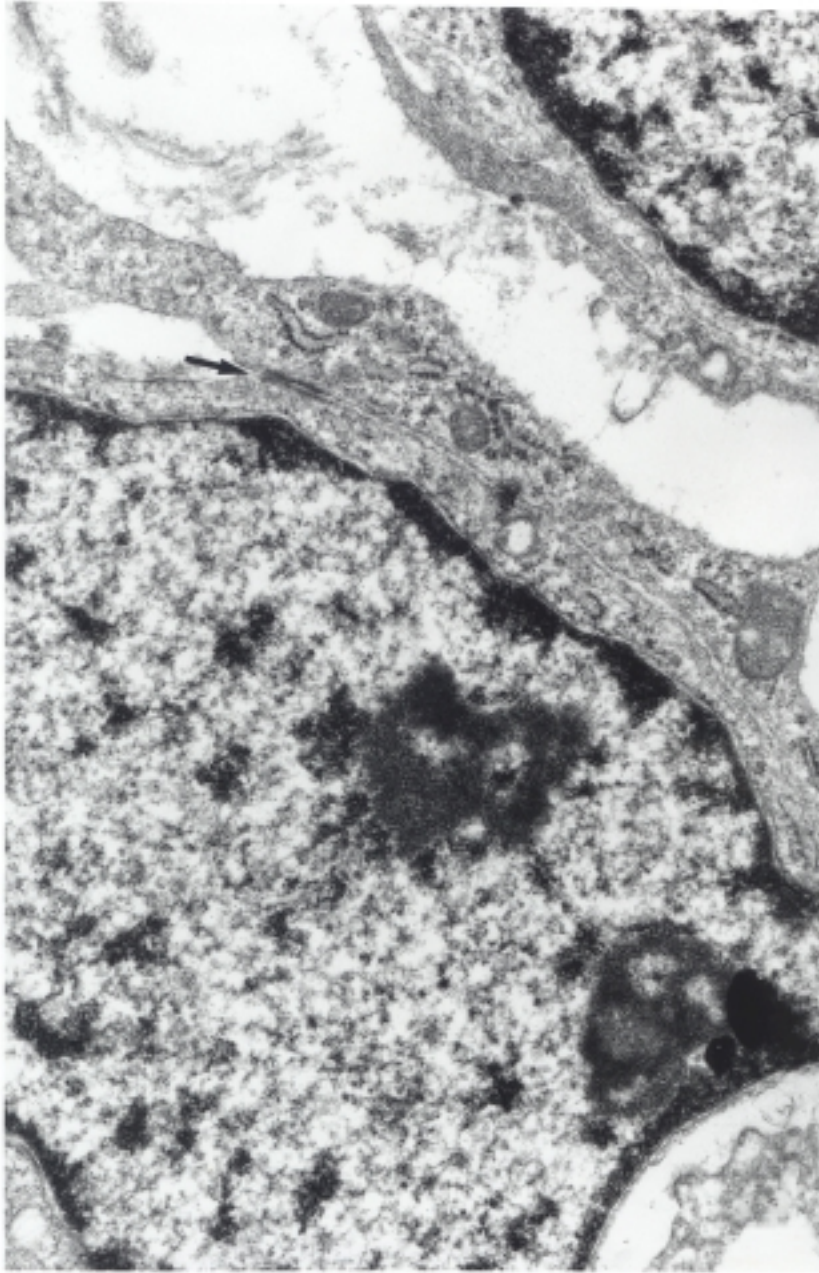
*Figura 37.- Aspecto ultraestructural, a bajo aumento, de un mesotelioma fibrosarcomatoso. Puede verse cómo las células muestran una tendencia a agruparse, estando separadas por áreas de menor densidad electrónica correspondientes a substancia fundamental. Doble tinción 2500x.*

superficial y los dos profundos, se observaron tractos discontinuos de lámina basal marginando parcialmente el contorno celular (Fig. 38). Aisladamente, se encontraron también uniones intercelulares de carácter primitivo (Fig. 39). En uno de los tumores profundos se observaron abundantes masas de filamentos intermedios intracitoplásmicos. Las cavidades incluidas estaban cubiertas, en parte por elementos de tipo mucosecretor, y en parte, por neumocitos tipo II con abundantes cuerpos lamelares intracitoplásmicos. Las técnicas de inmunohistoquímica evidenciaron una positividad de dichos elementos para citoqueratinas de bajo peso molecular, una negatividad para la vimentina y desmina. Las células fusiformes mostraron por su parte una positividad para vimentina, siendo negativas el resto de las técnicas salvo en uno de los casos, en el que se encontraron células aisladas positivas para citoqueratinas de bajo peso molecular (Fig. 40) y antígeno de la membrana epitelial.

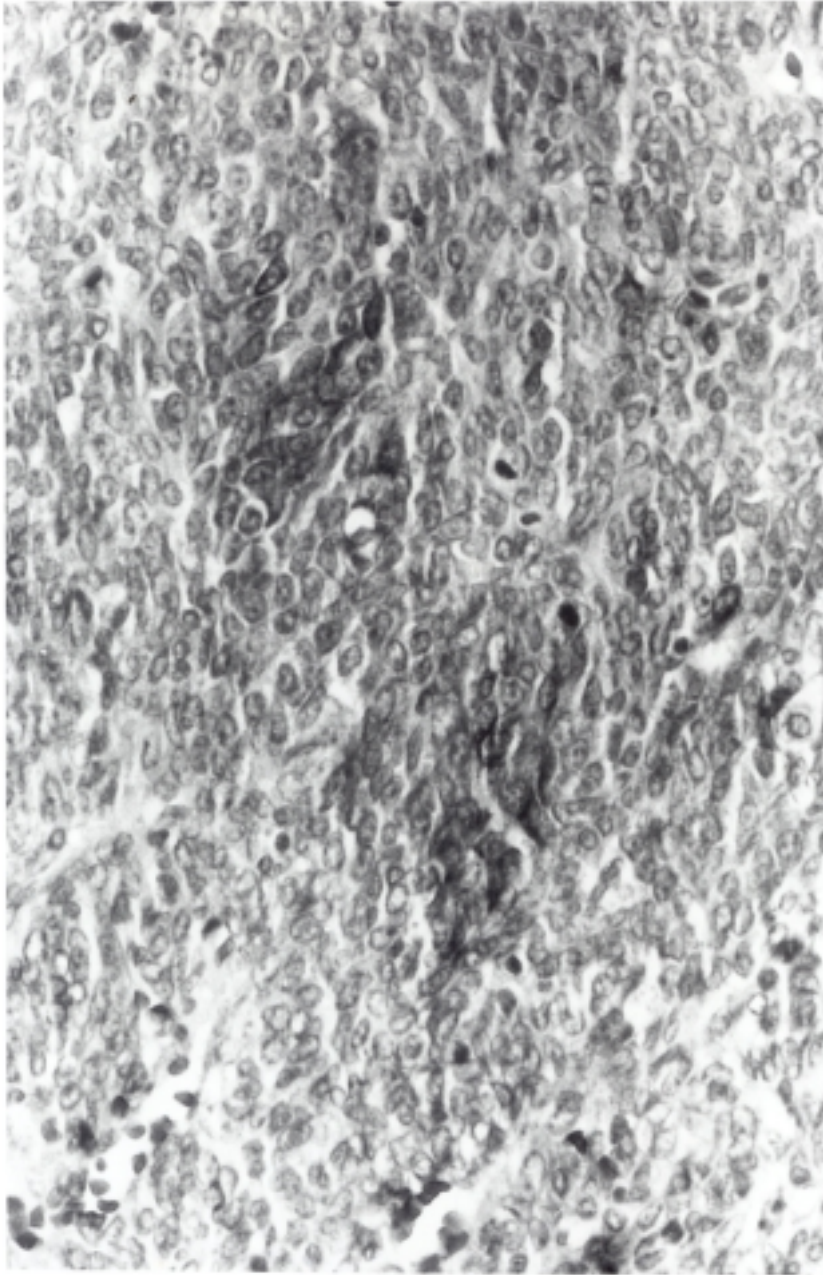
In vitro, los cuatro tumores expresaron un patrón de comportamiento similar, por esta razón, los dos profundos fueron considerados como auténticos mesoteliomas de situación intrapulmonar. El crecimiento fue precoz, intenso y muy puro a expensas de elementos fusiformes, que tras emigrar desde el explanto formando un ribete radial continuo, tenían una tendencia



*Figura 38.- Detalle del caso anterior, en el que se observa una zona de densificación de la membrana en relación con un tracto de lámina basal. Doble tinción 3000x.*



*Figura 39.- Las células neoplásicas próximas aparecen interconectadas por medio de uniones intercelulares primitivas (flechas). Doble tinción 8000x.*



*Figura 40.- Inmunotinción para queratinas de bajo peso molecular. Se observa una positividad de muy baja intensidad en las células tumorales. AMC AE 1 200x.*

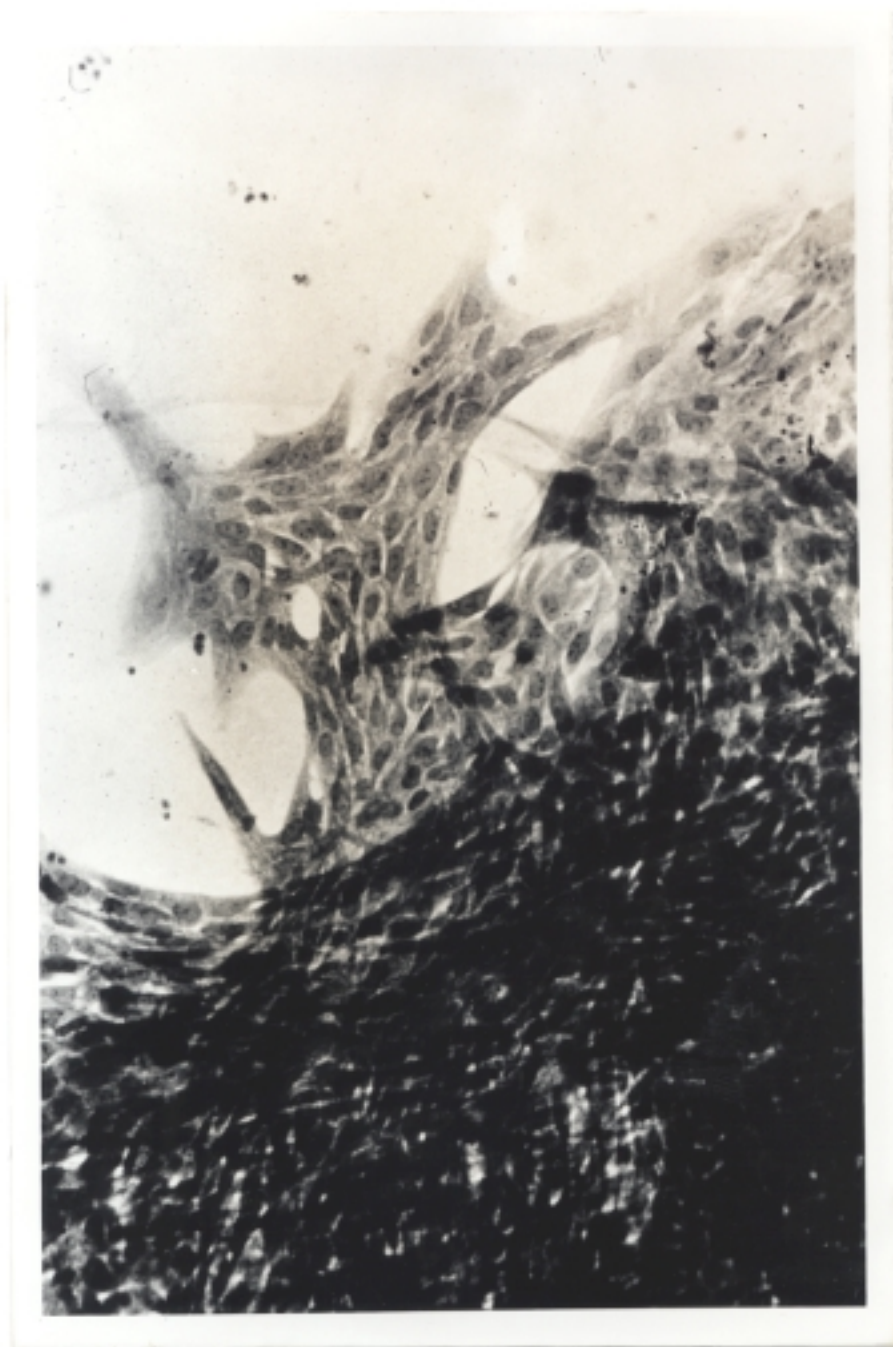
a modificar su forma, que pasó a ser poligonal o aplanada, constituyendo entonces un tapiz continuo formado por la agregación de diferentes placas adyacentes. Desde ellas, el tumor mostró una tendencia, en algunos campos, a desarrollar nuevamente elementos fusiformes que, tras modificar su forma, originaban de nuevo placas secundarias (Fig. 41).

El estudio ultraestructural de los elementos cultivados puso de manifiesto una morfología inespecífica, con abundante eucromatina, escasos organos citoplásmicos, sin filamentos intermedios y algunas cortas expansiones citoplásmicas. Las uniones intercelulares quedaban reducidas a algunos puntos de condensación de la membrana, en las zonas de aproximación de las células entre si (Fig. 42).

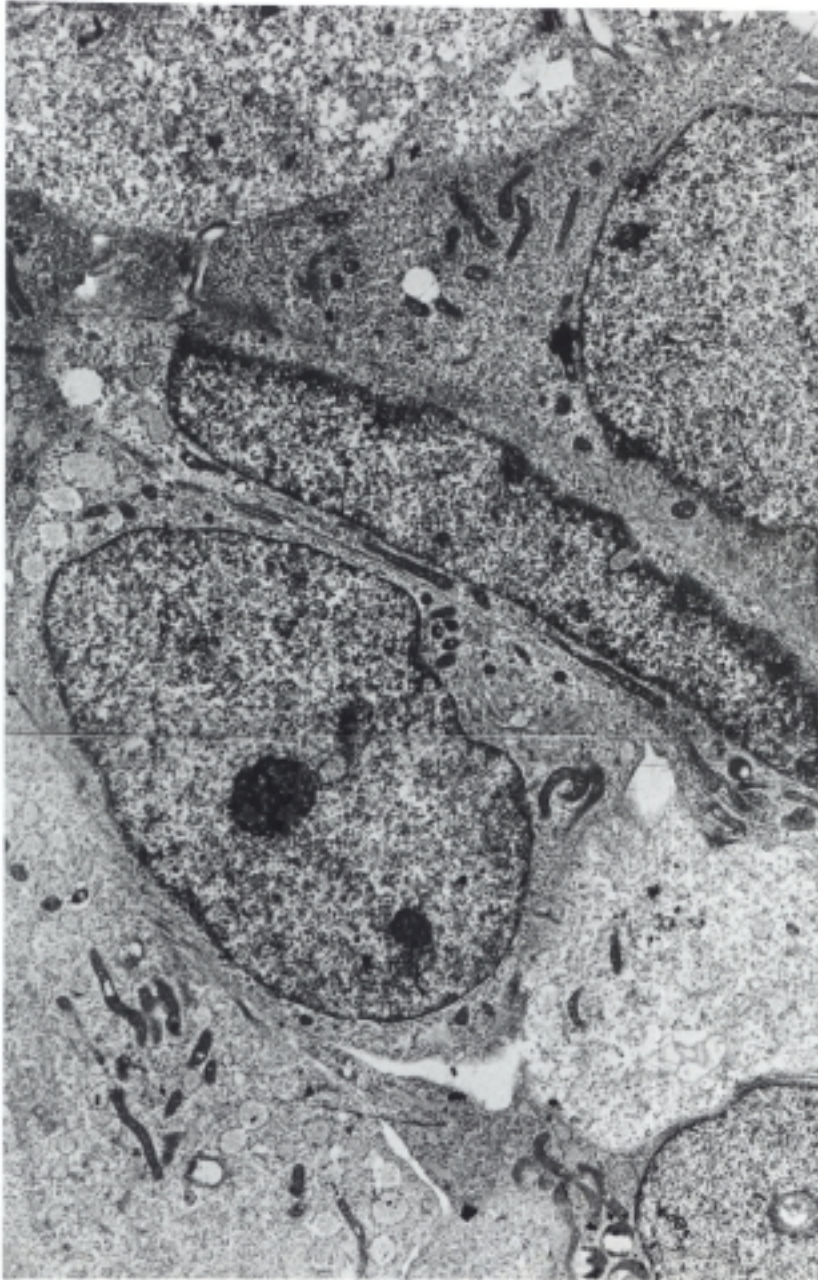
#### II.A.2.- Mesoteliomas epiteliales.-

Se estudiaron cuatro casos de mesotelioma pleural de tipo epitelial, de los cuales uno correspondía a la llamada variedad esclerosante. Todos ellos mostraron una estructura histológica convencional y una ultraestructura características, con numerosas prolongaciones en "anémona" en la superficie celular.

In vitro, tuvieron un crecimiento precoz, poco intenso y relativamente puro, emigrando del explanto grupos de células altamente cohesivas, que formaban lengüetas alrededor del mismo de igual forma que los carcinomas.



*Figura 41.- Detalle del crecimiento de un mesotelioma fibrosarcomatoso en cultivo. Se puede ver como las células emigran del explanto como placas muy cohesivas, de las que parten pequeñas expansiones que confluyen dando lugar a placas secundarias. H. E. 100x.*



*Figura 42.- Composición de micrografías electrónicas del cultivo del caso anterior, en la que puede apreciarse la ausencia de rasgos característicos en las células tumorales, que muestran un citoplasma con escasos órganos citoplásmicos o filamentos, y una ausencia de uniones intercelulares evidente. Aumento original de cada negativo 3000.*

## II. B. - ANGIOMA ESCLEROSANTE. -

Los angiomas esclerosantes presentaron, desde el punto de vista de la morfología óptica, una imagen superponible a la habitual con un predominio de las áreas epiteliales bien sólidas o papilares. Desde el punto de vista de la histoquímica enzimática, dichas células mostraron constantemente una reacción negativa para la ATP-asa, que sin embargo tenía claramente la vascularización normal incluida en la tumoración. La fosfatasa alcalina era, por su parte, constantemente negativa en las áreas sólidas, en la mayoría de las células que limitaban las cavidades y en las papilas. No obstante, en algunas zonas se observaron grupos de células intensamente positivas para la fosfatasa alcalina, generalmente localizadas en las formaciones papilares. La vascularización normal incluida en el tumor, como en el caso de la ATP-asa, era claramente demostrable por la positividad endotelial. La técnica para la demostración del antígeno relacionado con el factor VIII mostró, asimismo, una positividad exclusiva en los vasos incluidos en la tumoración, siendo negativas, al igual que la técnica para la demostración de la fijación lectina del *Ulex Europeus I*, tanto en las células que constituían las áreas sólidas como en las que limitaban las áreas papilares.

Desde el punto de vista ultraestructural, las células limitantes de las cavidades y papilas y las de las áreas sólidas mostraron un aspecto similar. Estas tenían una conformación

generalmente poligonal, con escasas prolongaciones microvillo-sitarias apicales, cortas, anchas y sin filamentos centrales. La membrana citoplásmica emitía numerosas interdigitaciones filiformes que se entrecruzaban con las de elementos próximos, así como algunas uniones intercelulares de tipo primitivo. En la superficie basal de la célula existía una lámina basal muy bien desarrollada y continua, que marginaba también los nidos celulares. En el citoplasma, se apreciaba un moderado número de órganos, con escasas mitocondrias, grupos de lisosomas, algunos perfiles de retículo endoplásmico rugoso, perfiles del aparato de Golgi y alguna inclusión osmiófila de estructura laminar. No se encontraron en ningún punto cuerpos de Weibel-Palade, ni cuerpos lamelares bien constituidos, así como tampoco transición a elementos fusiformes englobados o no en lámina basal.

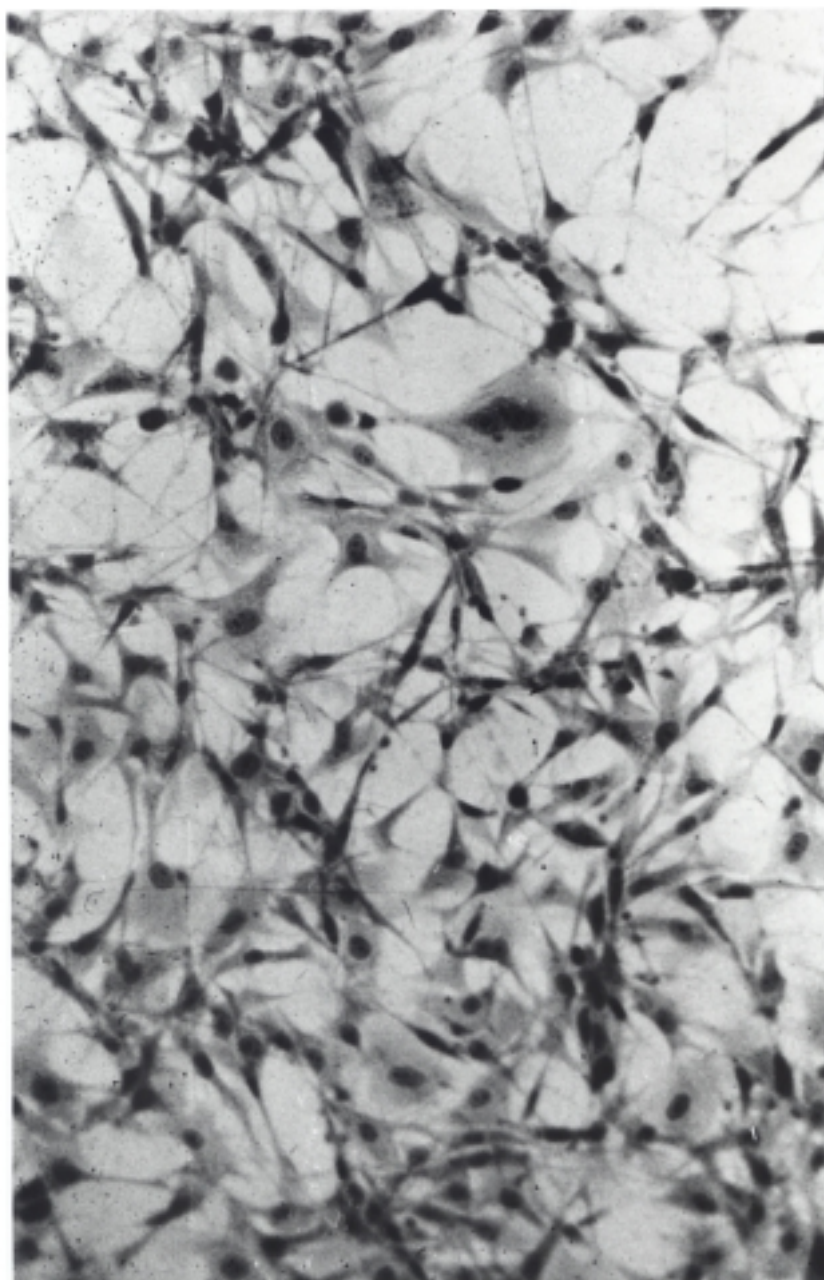
Los elementos citados, cuando se situaban próximos a vasos, aparecían perfectamente delimitados de los mismos y separados de ellos mediante una lámina basal bien constituida y una banda de elementos pericitarios.

En cultivo de tejidos, los tumores mostraron también un patrón de crecimiento similar. Este fué precoz, intenso y persistente, ya que desde el primer día de la observación se encontró una proliferación muy densa de elementos en parte estrechados, en parte elongados, aunque no fusiformes, y en parte de conformación poligonal. Estas células originaban un halo de crecimiento continuo alrededor del explanto, formando una red con

áreas libres de células neoplásicas, que le conferían un aspecto reticulado (Fig. 43). Superpuesta a la primera placa de crecimiento, existían otras zonas similares, con tendencia a formar agregados nodulares, sin que éstos, en su conjunto, mostraran características compatibles con las halladas en el cultivo de tumoraciones fibrohistiocíticas, schwanianas, adiposas, mesoteliales o sinoviales.

#### II.C.- GRANULOMA DE CELULAS PLASMATICAS.-

El granuloma de células plasmáticas mostró un crecimiento precoz y muy intenso. Los explantos, desde el primer día de la explantación aparecieron rodeados por una densa masa de elementos celulares emigrados del mismo, sobre todo leucocitos polinucleares. En días sucesivos apreció una proliferación celular distinta, integrada por fibroblastos de la morfología descrita y por células ameboides histiocíticas, que en los momentos finales de la explantación constituían células gigantes de gran tamaño.



*Figura 43.- Aspecto a mediano aumento del angioma esclerosante in vitro. Las células muestran una red anastomosada de elementos de morfología predominantemente estrellada, diferente de la hallada en neoplasias de otras estirpes. H.E. 40x.*

## II.D. - HAMARTOMAS. -

La totalidad de los hamartomas cultivados mostraron una ausencia total de crecimiento. La explantación correspondió en su mayor parte al componente cartilaginoso, el cual involucionó durante el tiempo de la explantación, mostrando en todos los casos y explantos un aspecto necrótico. No se obtuvo crecimiento de elementos epiteliales y, sólo ocasionalmente, se apreciaron focos de desarrollo fibroblástico.

## II.E. - NEOPLASIAS MUSCULARES BENIGNAS Y MALIGNAS. -

### II.E.1. - Leiomioma pulmonar. -

El tumor estaba compuesto, desde el punto de vista óptico, por una proliferación de elementos musculares lisos de morfología regular, agrupados en fascículos y entremezclados con abundantes fibras colágenas.

Desde el punto de vista ultraestructural, los elementos musculares lisos mostraron también una imagen concordante con la habitual en los leiomiomas de otras localizaciones: núcleos elongados, de contorno más o menos "dentado", haces de filamentos intermedios intracitoplásmicos con zonas densas, lámina basal externa, zonas de densificación de la membrana citoplásmica asociada a la misma y vesículas de micropinocitosis.

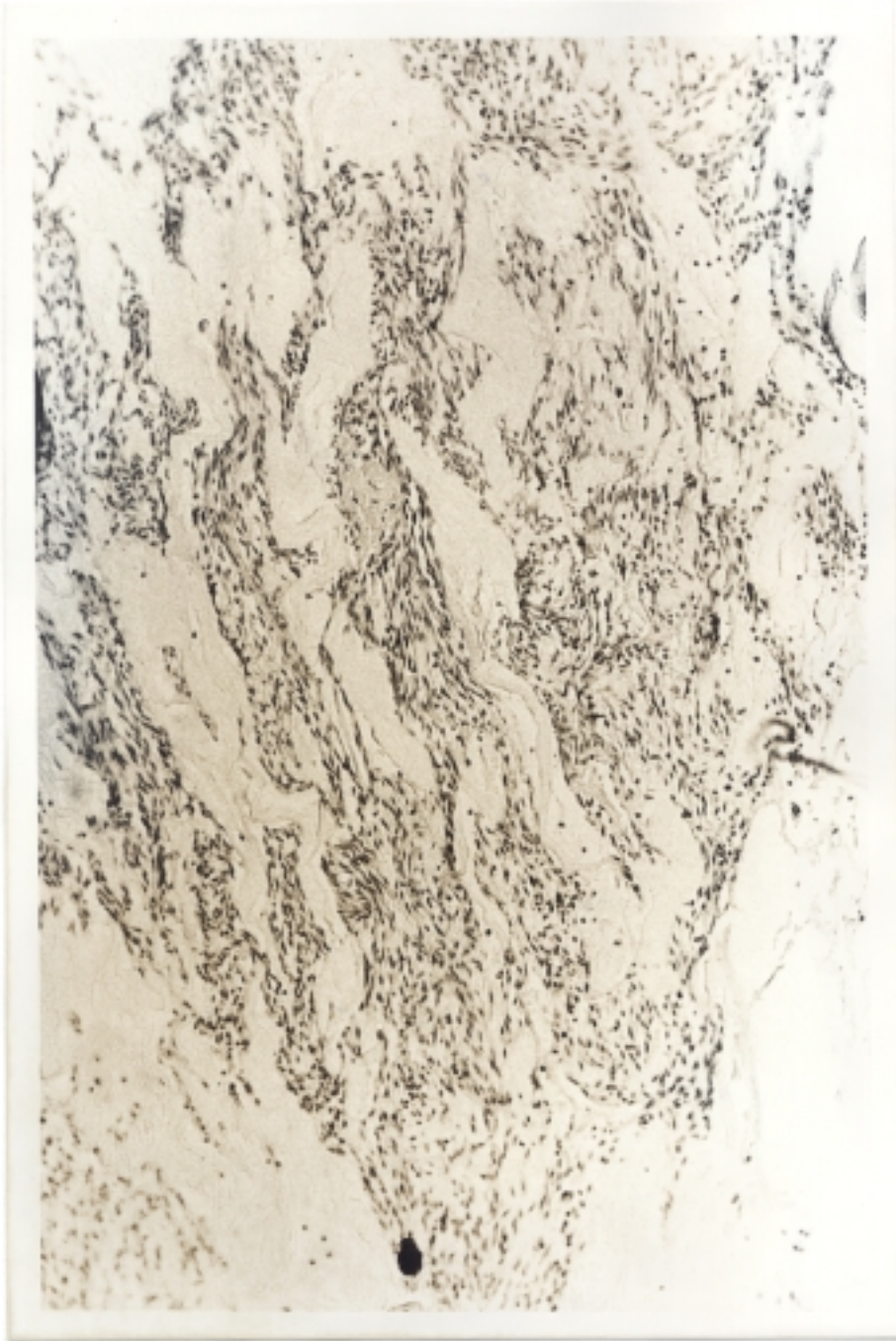
El tumor mostró *in vitro* un crecimiento precoz, de escasa intensidad, a expensas de células fusiformes de talla media y

núcleo regular, con citoplasma fusiforme situado en ambos polos del núcleo, acidófilo y homogéneo. Entre estas células, se observaron abundantes elementos de conformación también fusocelular o en flecha, de naturaleza presumiblemente fibroblástica, junto con algún histiocito aislado.

En el material incluido para microscopía electrónica, no se identificaron elementos de naturaleza muscular lisa y sí tan sólo células de morfología compatible con un origen fibroblástico.

#### II.E.2.- Leiomiosarcoma pulmonar.-

El leiomiosarcoma pulmonar cultivado corresponde al único ejemplo, en nuestra experiencia, de leiomiosarcoma mixoide de localización torácica. El tumor apareció como una masa redondeada, de densidad homogénea y situación periférica en el lóbulo inferior de un varón de 52 años, al que le fué practicada una lobectomía. La neoplasia estaba compuesta por una proliferación de elementos fusiformes, de núcleo sumamente regular y con una tasa mitótica baja (entre 0-1 mitosis por 10 campos a gran aumento). Estas células estaban separadas por abundante substancia fundamental basófila, tingible en azul por el Alcian Blue a pH 1 y 2.5, tan abundante en campos que llegaba a constituir pequeñas cavidades quísticas. En otras zonas, el tumor mostró un aspecto francamente mixoide, con células estrelladas con prolongaciones yacentes en abundante substancia fundamental (Fig. 44). A pesar de la aparente

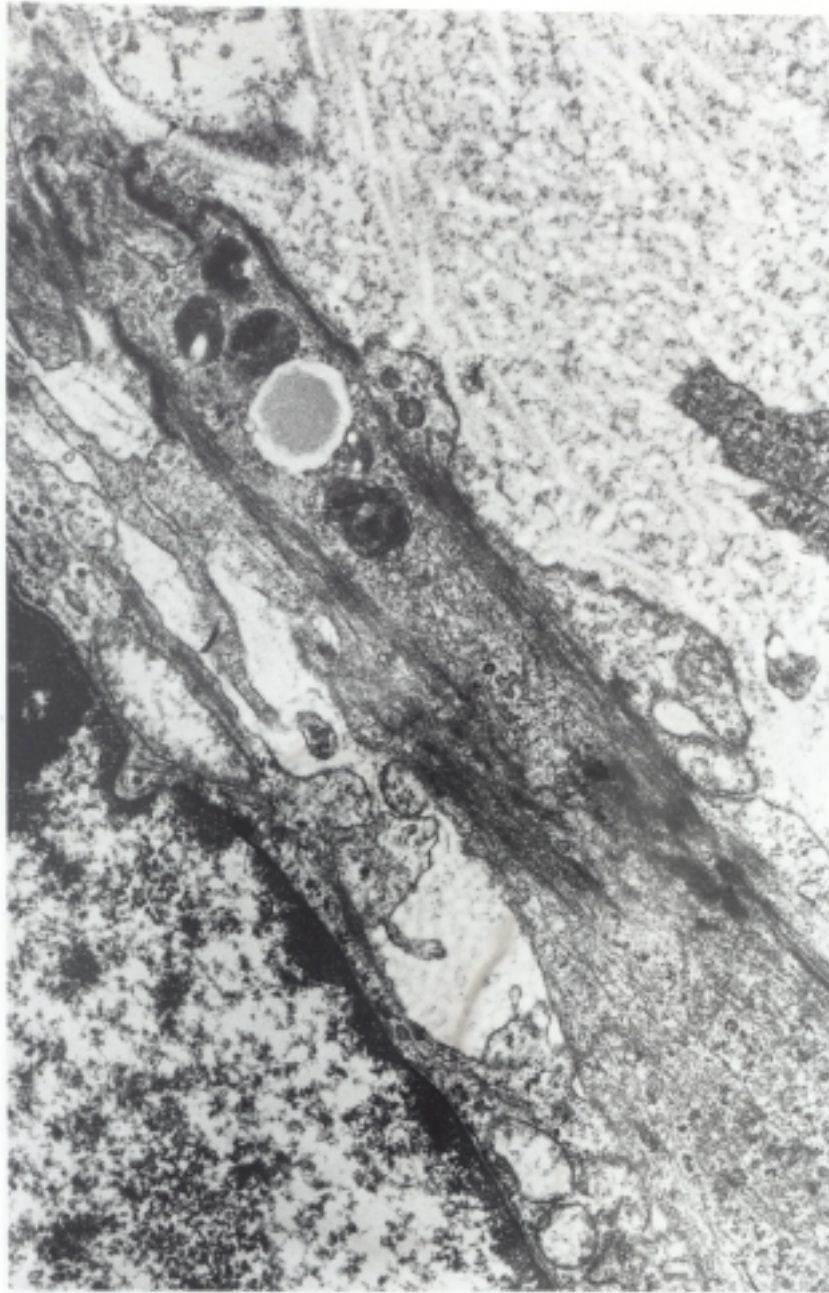


*Figura 44.- Aspecto de las áreas más características del leiomiosarcoma pulmonar mixoide, que muestra una celularidad escasa, falsamente inocente y abundante substancia fundamental disecando los fascículos neoplásicos H.E. 40cx.*

inocencia de la neoformación, ésta mostraba zonas de necrosis centrales e imágenes de invasión vascular, así como de la pared bronquial, por el tejido mixoide anteriormente citado. El tumor recidivó localmente a los dos años y desarrolló una metástasis ósea iliaca a los cuatro, falleciendo finalmente el enfermo con metástasis óseas diseminadas. La recidiva y la primera metástasis ósea se estudiaron histológicamente, siendo la imagen de éstas más agresiva que la descrita en el tumor originario, con mayor densidad celular, atipia nuclear y actividad mitótica, así como con desaparición progresiva de las áreas mixoides y predominio de las fusocelulares, junto con la aparición de un patrón heman-giopericitoide similar al descrito en las neoplasias fusocelulares pleurales.

Desde el punto de vista ultraestructural, los elementos fusiformes más maduros del tumor originario mostraron signos citoplásmicos de diferenciación muscular lisa, con filamentos intermedios subplasmalémicos con zonas densas, vesículas de micropinocitosis, lámina basal discontinua y zonas de densificación de la membrana (Fig 45).

Se cultivaron el tumor primitivo y la recidiva local torácica. En ambos casos, el crecimiento fue precoz, moderadamente intenso y persistente, con mínima contaminación por elementos de aspecto fibroblástico o histiocítico. La proliferación de células neoplásicas estaba compuesta por una emigración radial a partir del explanto de células fusiformes, de



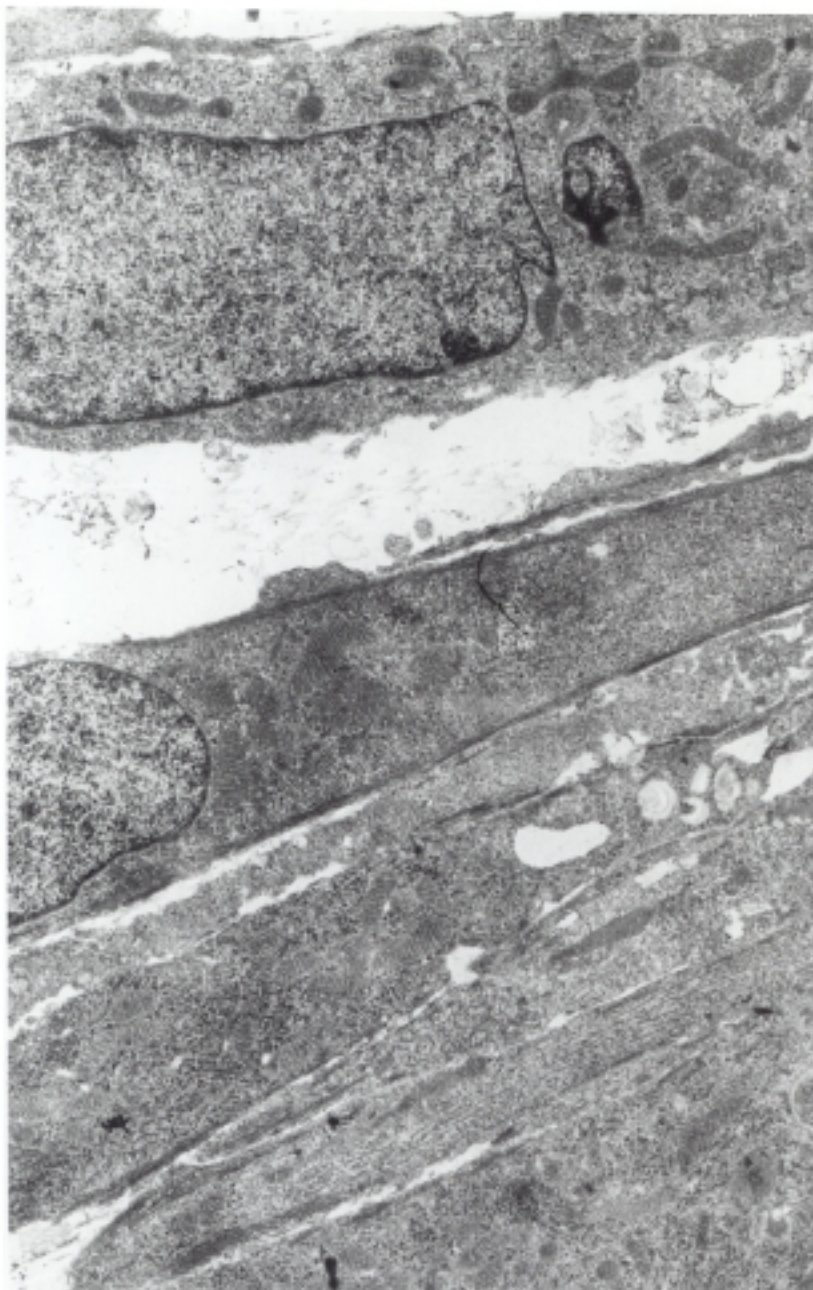
*Figura 45.- Aspecto ultraestructural del leiomiosarcoma pulmonar en el que puede apreciarse su naturaleza leiomuscular, con filamentos con zonas densas, densificaciones de membrana, tractos de basal y vesículas de micropinocitosis. Doble tinción, 6000 x.*

núcleo oval, con atipia variable, generalmente no muy acusada, y citoplasma acidófilo opaco homogéneo no granular. Estas células mantuvieron su morfología durante todo el tiempo de la observación y no mostraron en ningún momento tendencia a la agrupación en fascículos ni a la formación de placas pseudoepiteliales.

En los explantos en los que se realizó estudio ultraestructural, las células tumorales expresaron las características ya descritas en la microscopia óptica. Los núcleos tenían un predominio de eucromatina y algunas indentaciones, generalmente no muy acusadas, en la membrana. El citoplasma presentaba una dotación por lo general escasa en órganos, con un aparato de Golgi bien desarrollado y unos perfiles de retículo endoplásmico rugoso y liso escasos. Se observaba una moderada cantidad de ribosomas libres y algunos lisosomas. El rasgo más relevante era la presencia en la porción subplasmalémica del citoplasma celular, de abundantes filamentos intermedios con zonas densas, orientados paralelamente a la membrana citoplásmica (Fig. 46). Esta mostraba un apreciable número de vesículas de micropinocitosis y, de manera focal, expansiones de calibre amplio y longitud corta.

#### II.F. - FIBROHISTIOCITOMA. -

El caso de fibrohistiocitoma pulmonar apareció constituido por una proliferación celular polimorfa, integrada por elementos fusiformes de aspecto fibroblastoide, células más redondeadas de aspecto histiocitario y elementos gigantes multi-



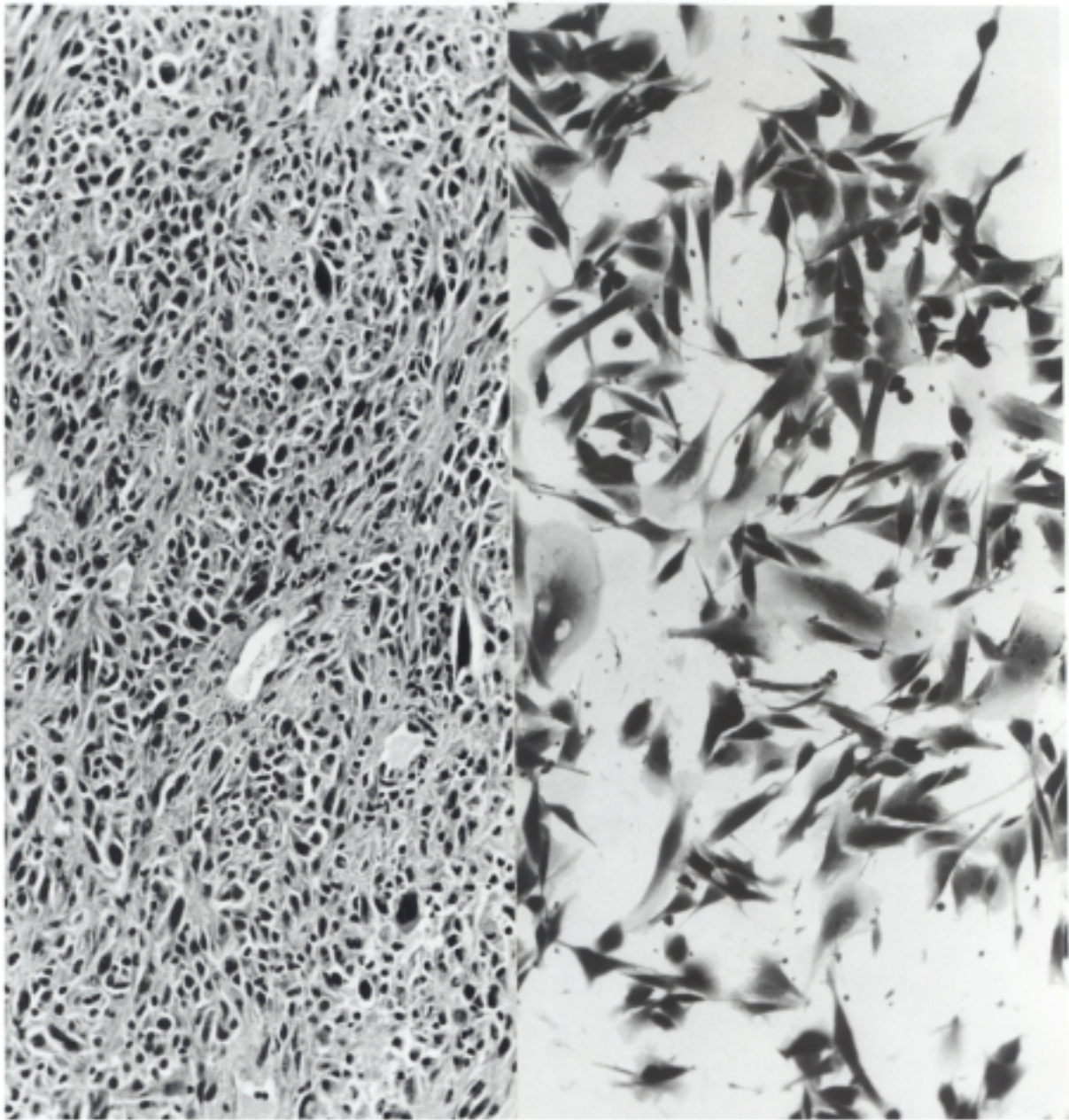
*Figura 46.- Detalle de las células cultivadas del leiomiosarcoma pulmonar, en el que se puede observar la presencia de haces submembranosos de filamentos intermedios con zonas densas. Doble tinción 4000x.*

nucleados. A ellos se asociaban algunos elementos de tipo inflamatorio. Las células citadas presentaban una reactividad negativa para EMA, citoqueratinas, y desmina, y positiva para alfa 1 anti-tripsina, antiqumotripsina y lisozima. Desde el punto de vista ultraes-tractural, se conformaba con los criterios habituales encontrados en este tipo de neoplasias, identificandose elementos fibroblás-ticos, histiocitarios, células gigantes multinucleadas, elementos de aspecto indiferenciado y escasas células con vacuolas lipídi-cas intracitoplásmicas.

*In vitro*, el tumor mostró un crecimiento similar, que fué precoz, persistente e intenso. Las células tenían una morfología fusiforme o en flecha, triangular o ameboide, en este último caso con abundantes ondulaciones de membrana. El núcleo era ovalado en los elementos fusiformes, o triangular, esférico o arriñonado en los elementos de aspecto ameboide. El citoplasma era de densidad variable, con zonas opacas granulares y áreas de microvacuolización de distribución irregular. Las células yacían de manera desordenada alrededor del explanto, sin tendencia a ningún tipo de asociación (Fig.47).

#### II.G.- MIOBLASTOMA DE CELULAS GRANULOSAS.-

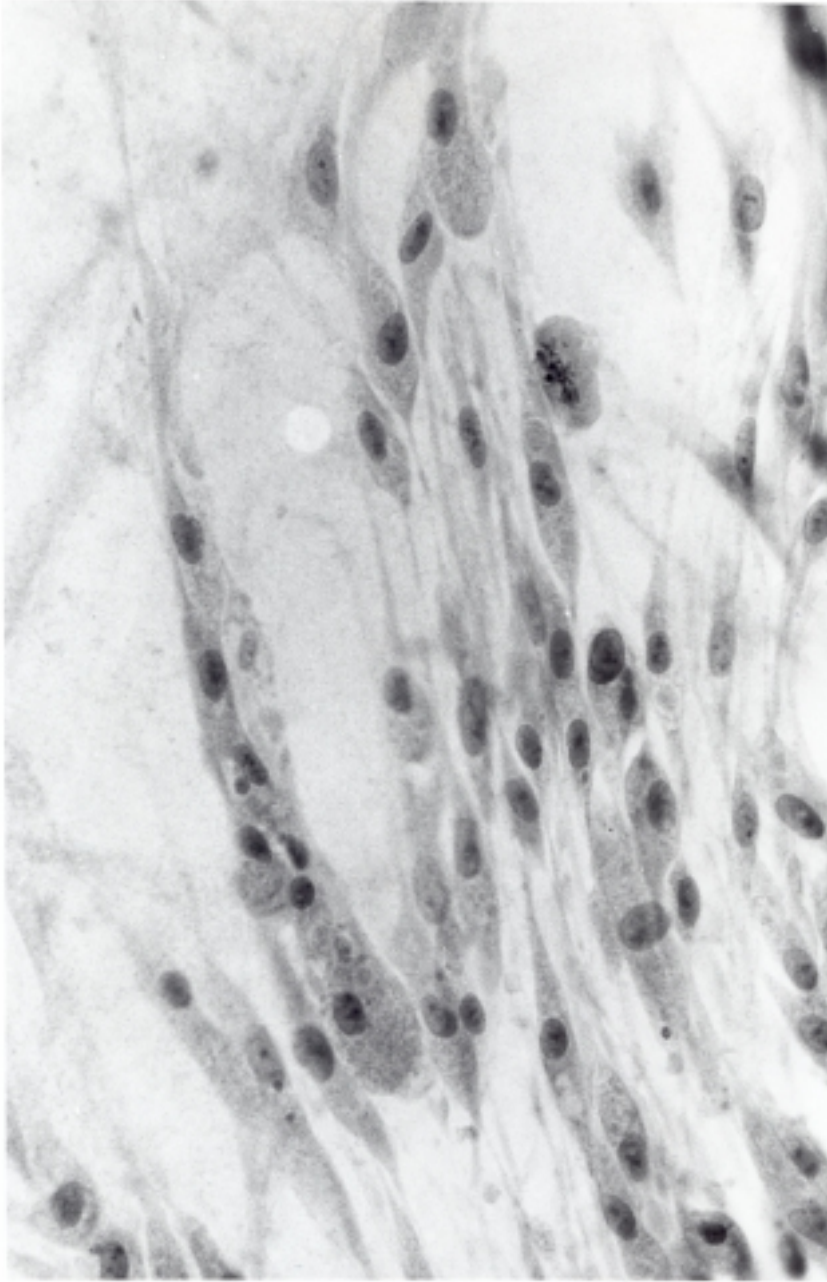
Se cultivaron dos casos de mioblastoma de células granulosas, uno de localización bronquial y otro traqueal. En ambos, el crecimiento que se obtuvo fue similar. Fué precoz, no muy intenso y persistente. Las células emigraron precozmente del explanto, de manera radial,



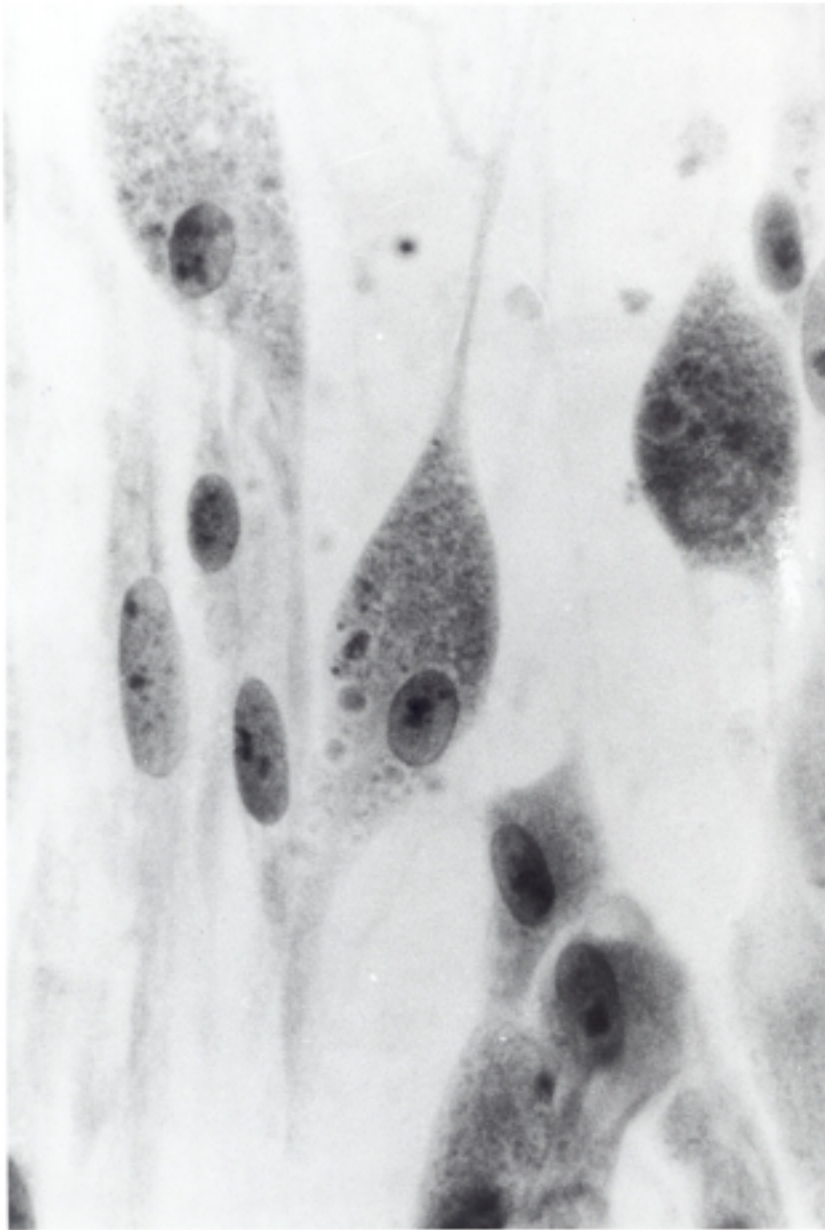
*Figura 47.- Izquierda. Imagen histológica del fibrohistiocitoma maligno pulmonar. Proliferación de elementos fusiformes en fascículos, con células gigantes multinucleadas (H.E. 40x). Derecha. El mismo tumor en cultivo de tejidos creciendo como células estrelladas o ameboides sin tendencia a la agrupación, (H.E. 100x).*

bajo la forma de elementos fusiformes de citoplasma acidófilo y núcleo oval. En el citoplasma, progresivamente, se fueron desarrollando granulaciones esféricas, acidófilas y opacas, de diámetro oscilante entre 2 y 3 micras y el límite de la visibilidad óptica. Las células mostraron una moderada tendencia, más acusada en uno de los casos, a la agrupación longitudinal, formando pequeños fascículos (Figuras 48 y 49). Entre ellas, se identificaron elementos de aspecto histiocitario y células fusiformes de morfología compatible con un origen fibroblástico.

El estudio ultraestructural de ambos casos cultivados puso de manifiesto una granulación progresiva de las células. Los elementos crecidos inicialmente tenían algunos gránulos densos, situados en las inmediaciones del aparato de Golgi. Con el paso del tiempo, se observó una granulación progresiva de las mismas, con un desplazamiento de éstos a lo largo del eje longitudinal de la célula, de manera que dichos gránulos, inicialmente aglomerados en las proximidades del núcleo, podían verse ocupando la totalidad del citoplasma celular en las células más maduras y en las senescentes. En líneas generales, es en estos momentos cuando la morfología de los gránulos era más variada, mostrando todas las posibles formas y tamaños que se encontraron en el estudio ultraestructural del tumor originario. Entre las células granuladas, se podían observar elementos también de conformación fusiforme, de similares características nucleares y citoplásmicas, pero en los que no se identificaban estructuras granulares, o si aparecían, su número era muy escaso. Estas células, cuyas características ultraestructurales son semejantes a las



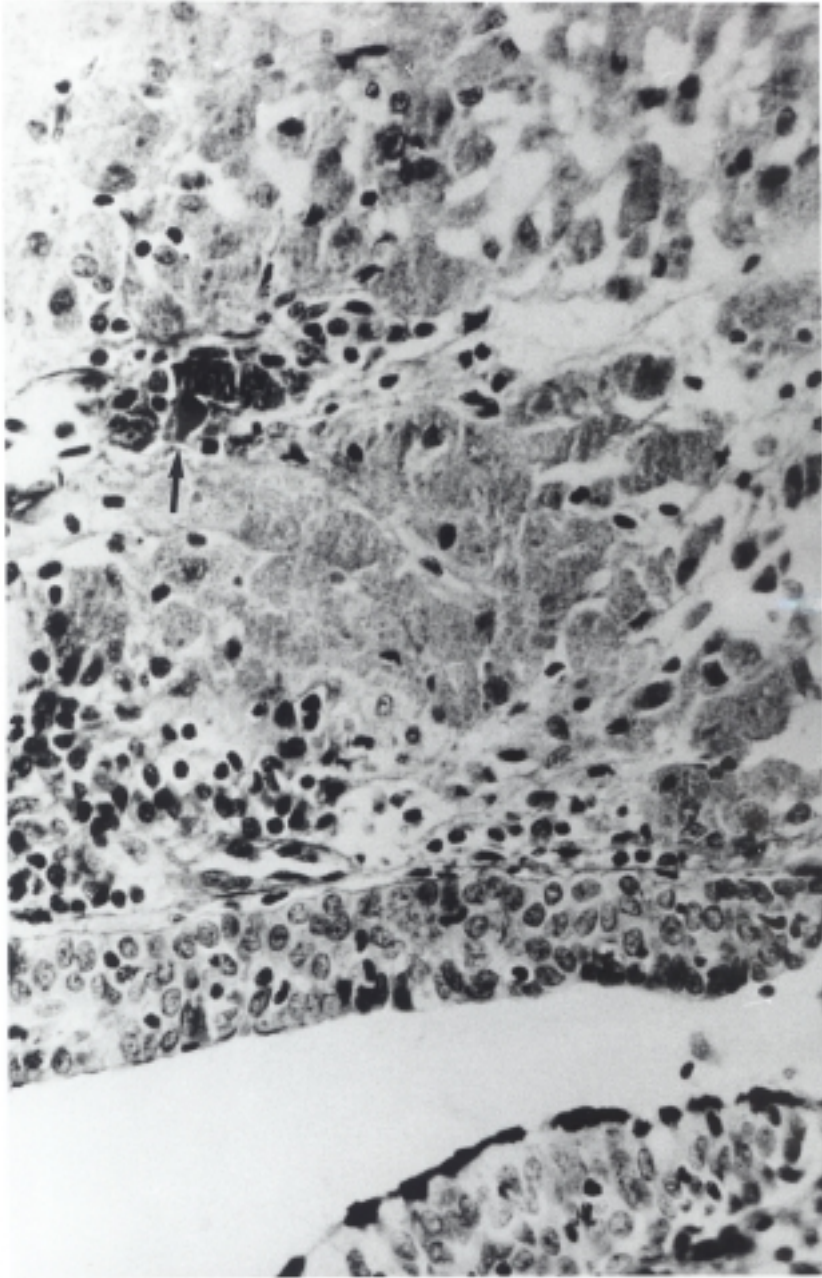
*Figura 48.- Cultivo de mioblastoma de células granulosas al sexto día de explantación, en el que se puede ver el crecimiento de elementos fusiformes, con cierta tendencia a la agrupación pseudofascicular y con figuras de mitosis. H.E. 200x.*



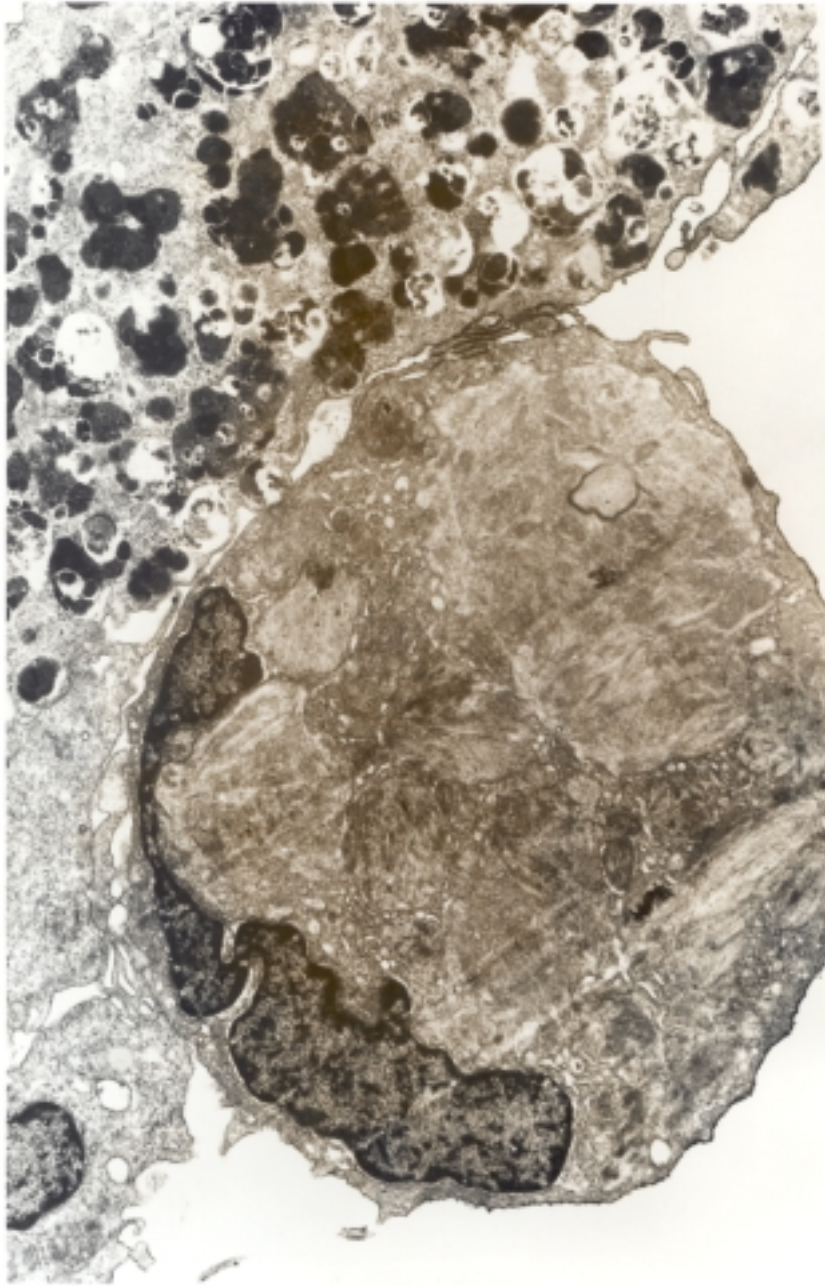
*Figura 49.- Detalle de una célula granulosa ya completamente desarrollada en cultivo. Se puede ver la modificación de su morfología, con una masa citoplásmica más abundante, y la presencia de gránulos de diferentes tamaños hasta el límite de la resolución óptica. H. E. 400x.*

halladas en las denominadas "células granulares juveniles", descritas por Sobel (74), no tenían, por su parte, rasgos morfológicos similares a los que presentan otros elementos de tipo histiocitario, schwaniano o fibroblástico en cultivo de tejidos.

Finalmente en uno de los casos, en cuyo tumor originario existían numerosas células portadoras de "cuerpos angulados", se comprobó, asimismo, el crecimiento de dichos elementos, aunque no se pudo demostrar la secuencia genética de los mismos (Figuras 50 y 51).



*Figura 50.- Sección teñida con PAS del caso número 2 de mioblastoma de células granulosas. Pueden verse las células con cuerpos angulados formando grupos en el intersticio tumoral (flecha). PAS, 100x.*



*Figura 51.- Cultivo tisular del mismo caso en el que se observa, adosada a una célula granulosa, otra célula portadora de las típicas inclusiones que corresponden en microscopía óptica a los cuerpos angulados. Doble tinción, 3000x.*

**discusión**

## DISCUSION

### I.- CULTIVO DE NEOPLASIAS EPITELIALES MALIGNAS PULMONARES.-

El cáncer de pulmón de todos es sabido que constituye un problema sanitario de primer orden en el mundo occidental. Es la primera causa de muerte en el varón con edad superior a los 35 años, y la segunda en la mujer, en Estados Unidos (4) e Inglaterra (75). En nuestro país, el cáncer de pulmón es también la primera causa de mortalidad por cáncer en varones, y la quinta en mujeres (2). La medicina moderna pese a los inmensos esfuerzos realizados en su diagnóstico y tratamiento, ha modificado escasamente su historia natural. La cirugía ofrece el mejor índice de curación en una minoría de pacientes con tumores resecables, con supervivencia a 5 años del 85% al 26% (19,21) según estadios, pero por desgracia la gran mayoría de los enfermos son inoperables en el momento del diagnóstico (11). Por otra parte, para los carcinomas de pulmón de células pequeñas, la quimioterapia intensiva ha mejorado la expectativa de vida de algunos pacientes, pero, a pesar de los buenos resultados iniciales, la recidi-

va es la norma y la supervivencia libre de enfermedad a los tres años oscila alrededor de un 5% (28).

Con todos estos datos tan desalentadores habría que insistir, que el mejor tratamiento de estas neoplasias es la prevención, fundamentalmente la supresión del hábito de fumar. Sin embargo, las campañas de medicina preventiva no han obtenido los resultados esperados, por tanto, es apremiante el desarrollo de la investigación en cualquier aspecto que afecte a la profilaxis (tabacos menos tóxicos, con menor contenido en alquitrán, hidrocarburos policíclicos y nicotina), y al mejor conocimiento de la biología celular y molecular básicas del tumor. Estos últimos aspectos necesitan para su desarrollo, de la puesta a punto de sistemas de cultivo de carcinomas pulmonares humanos por períodos prolongados. Así, se obtienen líneas celulares que producen gran cantidad de células malignas, las cuales pueden ulteriormente utilizarse con distintos fines, análisis del comportamiento biológico y bioquímico, estudios citogenéticos, de quimiosensibilidad e inmunológicos, que nos permita comprender más y mejor estos procesos malignos, y de este modo poder tratarlos con una mayor eficacia.

## **I.A.- CULTIVOS DE CARCINOMA PULMONAR EN EL LABORATORIO.-**

*Los sistemas de cultivo en el cáncer de pulmón se pueden efectuar tanto in vitro como in vivo.*

### **I.A.1.- CULTIVOS IN VITRO**

#### **I.A.1.1.- Medios de cultivo.-**

*Para una mejor comprensión de estos sistemas de cultivo, plantearemos ciertos problemas técnicos aún hoy día no resueltos. Entre ellos, podemos señalar que el implante de los especímenes tumorales o sus células, requiere previamente una disgregación mecánica o enzimática, que puede afectar la viabilidad y eficacia de la plantación de dichas células (39,76). Por otra parte, suele existir un bajo índice de crecimiento de colonias, menor o igual al cincuenta por ciento (77,78, 79), aunque algunas variedades pulmonares pueden alcanzar el ochenta por ciento (40). Este bajo índice de crecimiento es una dificultad añadida para las posibilidades de investigación que habíamos señalado antes. Otro obstáculo en los sistemas de cultivo, es el período prolongado para desarrollar colonias y las evaluaciones de los ensayos (80,81). Finalmente, los medios de cultivo permiten y favorecen el crecimiento de los distintos grupos histológicos del carcinoma del pulmón con diferente intensidad.*

Probablemente con la excepción de medio HITES (medio libre de suero RPMI-1640, suplementado con hidrocortisona, insulina, transferrina, 16-beta-estradiol y selenio), altamente selectivo para la variedad de carcinoma anaplásico de células pequeñas, con rápida y precoz proliferación de las células (43,82,83), las demás variedades histológicas del carcinoma pulmonar, a pesar de investigarse otros diferentes (libres de suero, suplementados con suero de ternera inactivado por el calor, medios "condicionados", obtenidos de cultivos ya establecidos con "factores de crecimiento" segregados en éstos, etc.) y desarrollarse en ellos colonias tumorales (82), no hay, en definitiva, un medio tan específico como el HITES para el carcinoma anaplásico de células pequeñas. Con todo, ninguno de ellos recuerda las condiciones ambientales en las que el tumor primitivo estaba inmerso. Por consiguiente, a pesar de los excelentes medios de cultivo actuales, no existe uno idóneo para garantizar el crecimiento de todas las células del espécimen tumoral, y que, por sí mismo, no seleccione una población celular con facultad de adaptarse al mismo.

#### ***I.A.1.2.- Datos bibliográficos.-.***

*Los medios de cultivo líquidos pueden dividirse: para mantenimiento y manipulación de los especímenes tumorales y los de cultivo propiamente dichos.*

*De entre los numerosos medios de cultivo hoy disponibles*

citaremos los más utilizados en la literatura, prescindiendo de su correspondiente composición química (84,85).

En primer lugar, hay que señalar que para la manipulación de los especímenes tumorales, suele emplearse la solución salina balanceada de Hanks, (39,41,54,57,86,87,88,89,90,91,92), no obstante, de una u otra manera, esta solución es casi siempre empleada en algún momento del ensayo.

Medios de cultivo como el RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute-1640) (41,42,48,51,56,59,62,76,82,93,94,95,96,97,98,99,100,101,102,103,104,105,106), McCoy y modificados (54,55,86,87,90,101,107,108,109,110,111), medio mínimo esencial (MME) de Eagle y modificados (39,76,88,89,96,99,111,112,113,114,115,116,117,118) y CMRL-1066 (51,54,86,87,92,101,107,108,109,111), son los más frecuentes.

El medio 199 ha sido utilizado con mucha menor frecuencia que los anteriores (113,119). Finalmente, el MB-752/1 (119), los nutrientes F12 de Hams (120) o el medio de Bigger se emplean de manera muy ocasional.

La tendencia a partir de la década de los 80 es a una mayor utilización de los medios RPMI-1640 y Mac Coy y modificados, frente a los CRML-1066 y MME y modificados.

En general, los implantes tumorales en medio de cultivo tanto líquidos como en agar blando, suelen complementarse con suero inactivado por calor, con excepción de medio HITES (43,82,83). Este último no es adecuado para soportar el crecimiento de especímenes de carcinomas pulmonares no de células pequeñas (43). Hoy día parece suficientemente claro, que los requerimientos para crecimiento in vitro del carcinoma de pulmón no de células pequeñas son diferentes al de células pequeñas (82).

Del total de trabajos consultados la gran mayoría añaden a los medios de cultivo suero inactivado por calor de distintos orígenes, a) suero de ternera (51,89,90,92,93,94,107,108,109, b) suero de caballo (86,87,111), c) suero humano (113). Para finalizar, en todos los cultivos se realiza profilaxis antibiótica con estreptomicina (50 microgramos/mililitro) y penicilina (50 unidades/mililitro).

#### **I.A.1.3.- Colonia tumoral.-**

Otro problema que plantean los sistemas in vitro de cultivo tumoral, es la definición de crecimiento y colonia tumoral. Hay crecimiento tumoral cuando aparecen colonias tumorales, pero el número de colonias para establecer el criterio de crecimiento es arbitrario y variable. Para algunos estaría en cinco o más colonias por placa (107), para otros en

seis o más (86,108). A veces los mismos autores (111), lo consideran con una sola colonia. Muchos investigadores, sin embargo, no clarifican este concepto, y así, teóricamente, habría que pensar que crecimiento es igual a la aparición de una colonia tumoral.

Colonia tumoral, también de una forma más o menos arbitraria, se suele definir como la agrupación celular formada entre más de 20 y más de 50 células (122). Todo lo que esté por debajo de estas cifras se considera racimo y no colonia. No obstante, esta definición no es mantenida por todos los autores, llegando algunos a considerar colonias a una agrupación celular tan baja como la integrada por cuatro o cinco elementos (96,107). En general, pese a no existir acuerdo, más de la mitad de los autores de los trabajos revisados (53%), escogen la cifra de más de 50 células para definir una colonia (42,87,98,123,124,125). Una minoría (17%), la definen como una agregación de más de 20 células (108,111,126), y otros como de más de 30 ó 40 células (12%) (51,76,99,123). Son excepcionales, (6% de los trabajos revisados), los que admiten una colonia celular a partir de más de 10 células (88). Naturalmente, todas estas amplias variaciones de un mismo concepto, influyen de forma directa en los resultados porcentuales del éxito de crecimiento de los cultivos tumorales. Para complicar aun más la nomenclatura, en algunas ocasiones el crecimiento y colonias no está referido al número de células,

sino a los diámetros de un agregado celular esferoide (115,116, 119,127,128).

#### **I.A.1.4.- Influencia de la disgregación celular.-**

Para hacer un cultivo celular de un tumor sólido, previamente es obligada la disgregación celular, que se efectuaría por procedimientos mecánicos y/o enzimáticos, éstos pueden alterar la viabilidad, integridad funcional (129), comportamiento biológico de la célula y/o de la membrana celular, que condicionaría una merma en el crecimiento de las colonias y en un nuevo concepto, que analizaremos más adelante, la eficacia clonogénica. Es decir un problema técnico, que podría acarrear modificaciones tales que falseasen los resultados de determinados tumores, como la sensibilidad o quimiorresistencia a fármacos, selección de clones celulares, dando ventaja a algunos, y en definitiva, alterando la heterogeneidad celular.

Los agentes antitumorales necesitan ser transportados a través de la membrana celular. La superficie celular y las proteínas de la membrana plasmática aumentan al pasar las células de G1 a G2 (130). Leive (131) encuentra que el tratamiento con EDTA remueve componentes de la superficie celular, dando lugar en el *Escherischia Coli* a acumular Actinomicina D y a una inhibición del crecimiento. La tripsina causa liberación de glico-

péptidos de la membrana citoplásmica (132). Las glicoproteínas sintetizadas intracelularmente y transportadas desde el aparato de Golgi a la superficie celular, pueden tener una función en el control de la proliferación celular (133), con importante influencia en la resistencia a fármacos (134). Alteraciones enzimáticas de la superficie celular, pueden también iniciar síntesis del DNA en contacto con células inhibidas (135) y causar cambios en componentes de la membrana, que han sido correlacionados con la expresión de un fenotipo transformado. Todos estos datos sugieren, que la exposición a tripsina y posiblemente a otras proteasas, así como a otros transformadores de la superficie celular, pueden causar alteraciones en la membrana y/o componentes de la superficie celular, que normalmente actúan como barreras de difusión físicas o receptores, y afectarse el transporte de los fármacos en las células.

Se han efectuado experimentos de cultivos tumorales en fase de crecimiento exponencial y sometidos a drogas después de 0,1,2, 5,12,18 ó 24 horas de exposición a tripsina (0.025% de tripsina x 5 minutos) (136). Las células tripsinizadas y expuestas a bleomicina 1 hora, tienen entonces cincuenta veces más supervivencia que las no expuestas al enzima, treinta veces a las dos horas y doce veces a las cinco horas. De 12 a 18 horas después de la tripsinización, la supervivencia celular vuelve a un nivel parecido al control. En este mismo experimento, empleando otros

quimioterápicos (actinomicina D, GAL, Me-CCNU, Ara C), existen cuatro tipos de respuestas a la tripsinización: a) células más resistentes al citostático (ActD, Bleomicina, GAL), entre 0 y 1 hora después de la tripsina, b) células más sensibles (Me-CCNU), 1 hora después del tratamiento con tripsina, c) células más sensibles inmediatamente a la tripsinización (Adriamicina), seguida de un aumento de resistencia, d) células que no expresan cambios en la sensibilidad a la droga por la tripsinización (Ara C). En todos los casos, las modificaciones vuelven a la normalidad después de 12 a 18 horas. Desde un punto de vista ultraestructural, la mayoría de los glicocalices fueron eliminados por una exposición de 5 minutos a la tripsina (137). Sin embargo, hay que señalar que las diferencias de respuesta a drogas por acción enzimática, no todas se deben a modificaciones de la membrana celular, ya que la tripsinización puede afectar también a proteínas intracelulares con un resultado parecido (136). ¿serían por tanto reversibles dichas alteraciones pasado un tiempo ?.

Otros autores (76), comparando disgregaciones mecánicas y enzimáticas en distintos tumores humanos (melanoma, sarcoma de partes blandas, carcinomas pulmonares), analizan si un procedimiento mecánico, tal como la obtención de pequeños fragmentos de tumores sólidos que son pasados a través de filtros-malla, progresivamente menores hasta conseguir disgregación celular, es mejor, desde un punto de vista de incrementar el crecimiento

tumoral, que el enzimático con colagenasa II (129). Los resultados indican que el crecimiento tumoral de colonias, es más ventajoso cuando se ha empleado previamente una disgregación enzimática en el melanoma y sarcomas de partes blandas. Sin embargo en el pulmón, si bien el índice de éxitos es superior con el procedimiento enzimático, éste puede comprometer el potencial clonogénico, especialmente para los anaplásicos de células pequeñas. Por consiguiente, esta neoplasia puede requerir disgregación por otros métodos u otros enzimas (DNA-asa), o posiblemente con una preparación obtenida por subfraccionamiento de la colagenasa II "impura". De igual forma, en la tripsina "impura" se ha demostrado citotoxicidad y actividad disgregativa que pueden ser separables. Otro aspecto a tener en cuenta, es el retraso en la implantación celular después de la disgregación, que disminuye la aparición de colonias.

#### **I.A.1.5.- Cultivo en agar blando.-**

Además del cultivo en medios líquidos *in vitro*, se han desarrollado técnicas en medio sólido como el agar blando.

En definitiva, la etapa previa para una siembra de células tumorales en agar blando, es la disgregación y obtención de una suspensión celular en un medio de cultivo, que se deposita en unos discos de Petri en general de 30x10 mms (Falcon), con una

concentración de agarosa entre 0.3 y 0.5% dejada solidificar a temperatura ambiente. Esta mezcla, suspensión celular-medio de cultivo agarosa, se incubaba a 37 grados centígrados en un incubador humidificado conteniendo 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de aire (39,41,89, 93,96, 98,99,102,108,111,124,128)

#### **I.A.1.6.- Viabilidad de la células disgregadas.-**

De nuevo surge un requisito indispensable para el crecimiento celular, la viabilidad de las células a implantar. Para demostrar ésta, se utilizan colorantes vitales como la exclusión de Azul Tripán o de Lisamina Verde, examinando las células bajo contraste de fases con un hemocitómetro. Típicamente entre un 50 y un 90% de los especímenes de médula y derrames, así como entre un 10 a un 80% de los especímenes de tumores sólidos, sus células excluyen la tinción y son contadas como viables (89,90,98,124). También es importante el número mínimo de células en suspensión necesarias para un crecimiento en cultivo. Por debajo de 200.000/células/ml es difícil la obtención de colonias. De los trabajos analizados, aproximadamente la mitad emplea 500.000 células/ml (42,51,82, 87,90,107,109,126, 128), una quinta parte 1.000.000 células/ml. y otra quinta parte 200.000 células/ml (39,41,93,111). Sólo una minoría utilizan 3.000.000 células/ml (89,108), sobre todo en situaciones de valoración de quimiosensibilidad.

**I.A.1.7.- Eficacia de clonación.-**

*Es el cociente resultante entre el número de colonias contadas y las células plantadas por mililitro, multiplicado por 100 (EC = [Nº de colonias/Nº de células] x100).*

*De nuevo hay que insistir en que estas variaciones influirán en el resultado final.*

**I.A.1.8.- Contaminación de cultivos.-**

*El manejo de los medios de cultivo junto con especímenes de tejidos tumorales fácilmente se pueden contaminar. Son obligadas por tanto las condiciones más estrictas de asepsia en la manipulación y transporte de dichos especímenes. El tiempo de demora en la implantación también influye como se señaló anteriormente. Especial cuidado hay que observar con la infección por micoplasma, que produce una reducción de la capacidad productiva de líneas celulares de los tumores (138), necesitándose un número de células diez veces superior para producir colonias, comparado con líneas no infectadas. Estudios han demostrado profundos cambios en la célula FL derivada del amnios normal humano, después de exposición larga a infección por micoplasma in vitro, cambios en los cromosomas, aumento de las aberraciones en los mismos (139). También se ha*

comprobado que después de la eliminación del micoplasma el índice de crecimiento de las células FL aumenta, aunque más reducido (140). Este hecho acontece tanto in vivo como in vitro (138).

En este sentido, los trabajos de investigación de cultivos celulares se plantean sistemáticamente la exclusión del micoplasma mediante monitorización por microscopía electrónica y microbiológica. Si en alguna ocasión surge infección por *Acholeplasma Laidlawii*, por probable contaminación de suero de ternera fetal, la reserva de cultivos se aconseja sea tratada simultáneamente con antisuero específico y kanamicina o tetraciclina por 3 meses. No suelen ocurrir recidivas (41).

En consecuencia, descartar esta infección tiene importancia e influye en los resultados, porque disminuye el crecimiento tumoral e induce modificaciones cromosómicas, que pueden ser fuentes de error en investigaciones citogenéticas de las líneas tumorales celulares humanas.

#### **I.A.1.9.- Período de latencia para el desarrollo de colonias.-**

La aparición de colonias tumorales en estos medios de cultivo suele acontecer entre la segunda y la tercera semana en el 65 % de los casos (39,51,87,89,98,102,108,126), y antes de las dos semanas en los restantes (90,99,111,124,128). Son tan sólo ocasionales

los trabajos donde aparece crecimiento después de un mes de cultivo.

Un ejemplo apasionante y práctico de utilidad de los cultivos celulares en agar que no necesita disgregación, es la obtención de colonias de lavado bronquial y aspirados de médula ósea. Von Hoff y cols. (111) interesados por el problema de incrementar la rentabilidad de positividad en el estudio broncoscópico, y valorar ensayos de quimiosensibilidad para aplicación clínica individual, obtuvieron crecimiento satisfactorio "Stem cell" (50) en 39 especímenes de lavado bronquial. Este ensayo "Stem cell" muestra crecimiento de colonias en nueve de once casos con citología positiva (6 colonias por plante). En un total de nueve especímenes citológicamente negativos, tres forman colonias (de una a tres colonias). En siete casos con papanicolaou sospechoso crecen colonias en cinco (de dos a nueve). En dos casos de Papanicolaou positivo, seis de Papanicolaou negativo y dos del sospechoso hay proliferación celular tumoral pero no llegan a formar colonias. En los restantes doce especímenes el desarrollo celular tumoral, aunque evidente, es mínimo. La viabilidad celular estuvo entre 10 y 100% (media de 44%) y la eficacia de plantación fue de 0.003 a 0.04%, con 350.000 células por plante, circunstancias que influyen en los resultados, con una relación directa entre el número de células plantadas y las colonias aparecidas en los discos de Petri. En

todos los casos el aspecto citológico de las colonias es de carcinoma de pulmón (111). Cuando la citología fue positiva, el ensayo "Stem Cell" correlaciona razonablemente bien con la citología, con un 82% de los cultivos positivos. Sin embargo, cuando la citología fue negativa se obtuvieron cultivos positivos en un 33%. Por consiguiente, el cultivo Stem cell puede emplearse para incrementar el diagnóstico de los lavados de fibrobroncoscopia, a pesar del bajo rendimiento, que podría ser consecuencia de a) bajo número de células exfoliadas y de baja viabilidad, sobre todo con visión endoscópica negativa y Papanicolaou negativo, b) alto índice de contaminación, hasta en un 30% de los plantas cultivados crecen de forma exuberante hongos y dicho índice no se reduciría por la adición de antifúngicos al cultivo (111). De nuevo estamos ante un problema técnico de difícil solución, favorecido por el agar y por la fácil contaminación de las muestras a través del paso por la orofaringe. Por el contrario, en los especímenes obtenidos por centrifugación de derrames pleurales y/o aspirado medular, queda salvado el problema por las medidas antisépticas de recogida de la muestra y la profilaxis antibiótica. Así, la rentabilidad para especímenes citológicamente negativos es sensiblemente más alta, teniendo especial interés para pacientes que hubiesen de ser tratados con trasplante autólogo de médula osea (40).

## **I.A.2- CULTIVOS IN VIVO.-**

### **I.A.2.1.- Introducción histórica.-**

Ya se ha comentado que uno de los mayores problemas de los cultivos de los tumores sólidos humanos, es la disgregación del tumor para producir una suspensión de células aisladas, bien por métodos mecánicos o enzimáticos. Ambos perturban el ciclo o el metabolismo celular, así como la heterogeneidad fisiológica tumoral. Con el fin de preservar al máximo estas características, algunos autores han investigado el heterotransplante de tumores pulmonares en varios animales huésped (40).

En un principio se intentó el desarrollo tumoral en localizaciones privilegiadas (ojo, cerebro) de animales normales con éxitos limitados (44). Crecimientos tumorales de corta duración se consiguieron en animales inmunodeprimidos por esteroides (45), irradiación (141), suero antilinfocítico y drogas citotóxicas (142). Steel y cols (143) señalan mejoría de la inmunosupresión en el ratón, cuando se realizaba neonatalmente timectomía e irradiación corporal en la vida adulta, de tal manera que este huésped es capaz de soportar crecimiento de cáncer de pulmón humano varios años (46).

Actualmente, el huésped in vivo más empleado en el laboratorio para el crecimiento del cáncer de pulmón es el ratón atímico desnudo o calvo (*athymic nude mouse*). Estudios inmunológicos de estos animales demuestran ausencia de linfocitos T, linfocitos B normales, altos niveles de células killer naturales (NK-cells), e incremento de la actividad macrofágica (144). Rasgos que serán analizados más adelante con detalle. Como consecuencia estos animales son muy vulnerables a infecciones, necesitando un aislamiento estricto, dieta adecuada seleccionada y personal técnico altamente especializado, tanto en la crianza como en su manejo para asegurar una colonia suficientemente sana. Todo ello se traduce en un encarecimiento importante del método de cultivo, convirtiéndolo en prohibitivo en algunos medios. Sin embargo, su alta receptividad para tumores humanos, entre ellos los pulmonares, contrapesan parcialmente este inconveniente.

El desarrollo con éxito de tumores pulmonares in vivo en el laboratorio oscila entre un 44% y un 78%, tanto en ratones atímicos desnudos, como en los timentomizados e irradiados (46, 91, 145, 146). Hay pequeñas diferencias de crecimiento entre los distintos tipos histológicos del cáncer de pulmón o entre el tumor primario y metastásico (40). Sorprende que los tumores anaplásicos de células pequeñas de pulmón usualmente muestran una mayor dificultad para crecer.

La mayoría de los investigadores registran un tiempo de duplicación de entre 6 y 29 días (46,147), aunque varía con el tipo histológico, el carcinoma anaplásico de células pequeñas no tiene un tiempo acortado (46,91,147). El pase seriado de tumores en xenografías mantiene las características histológicas y cromosómicas del tumor inicial (46,56,146,147). También se ha demostrado que el tumor xenografiado suele mantener el comportamiento funcional primitivo, así tumores con secreción inadecuada de ADH, producción de ACTH, hormona beta estimulante de los melanocitos, diez meses más tarde persisten en xenografía (56).

El desarrollo xenográfico tumoral reproduce con bastante fidelidad el comportamiento tumoral en el hombre, tanto morfológico como citogenético, funcional o de quimiosensibilidad (147). Sin embargo, este mimetismo desaparece en dos aspectos a) tumores que en el hombre conducen a la caquexia del enfermo, una vez transplantados pierden esta capacidad, pensándose hoy día que la caquexia es debida a una proteína, caquexina, (tumor necrosis factor), producida por los macrófagos del huésped (148), y por tanto el tumor trasplantado no se habría modificado, sino la respuesta de los macrófagos del huésped. b) otra característica discrepante es que los tumores malignos humanos una vez transplantados en el animal, excepcionalmente dan metástasis. Aunque las causas no están aclaradas, se ha sugerido que el método y el lugar de implantación pueden ser determinantes (100).

Thiede y cols (106) demuestran un índice de crecimiento tumoral superior (78-94%) de los injertos inoculados, cuando se efectúa en una matriz artificial de poliuretano previamente colocada en el ratón atímico desnudo. Esta aumentaría la vascularización de la zona facilitando la capacidad de prendimiento tumoral. También se ha comprobado un aumento del índice de metástasis tumorales (106). Se piensa, por tanto, que la escasa vascularización de los implantes tumorales subcutaneos in vivo, puede ser la responsable del bajo índice de metástasis (149). En este mismo sentido, se ha comprobado experimentalmente una mayor capacidad metastatizante (hígado, ganglios) cuando se compara la vía subcutánea frente a la intraperitoneal, de tal manera que en la primera prácticamente no existen metástasis y en la segunda suelen estar presentes (118). Incluso en el trasplante subcutáneo, varía el desarrollo tumoral dependiendo de la localización efectuada en el animal (región ventral o región dorsal del tronco) (150). También parece ser crítico el estado de inmunosupresión del huésped para el desarrollo de las metástasis (100).

Como ya se ha dicho, de todos los animales huéspedes en los que se realizan xenografías de tumores pulmonares, el que más ventajas presenta es el ratón atímico desnudo, descrito por Flanagan en 1966 y designado por el símbolo Nu (151). Dos años más tarde, Pantelouris reporta que estos animales tiene un timo pequeño y rudimentario (152). También los primeros estudios

indicaron que el ratón calvo era enormemente susceptible a la hepatitis y neumonía, así como que tenía una vida corta (153). No está claro que si éste es aislado y mantenido en un medio razonablemente estéril, libre de microorganismos patógenos, su supervivencia sea similar a la del ratón normal.

#### **I.A.2.2.- Características inmunológicas del ratón atímico calvo.-**

Aunque este animal presenta una aplasia congénita del timo y un déficit de células maduras T, tiene, sin embargo, células T precursoras (linfocitos T patológicos). Las áreas dependientes del timo de los tejidos linfoides periféricos contienen pocos linfocitos (154) y los linfocitos circulantes están disminuidos. No obstante, un timo irradiado inyectado en un ratón "desnudo", es repoblado por precursores del huésped "desnudo" (155). Estos son incapaces de rechazar el aloinjerto respondiendo a células T-antígeno dependientes o rechazar tumores inducidos-MSV.

Hay un acuerdo general que, excepto la IgM, el ratón "desnudo" tiene bajos los niveles de inmunoglobulinas en relación al nu/T o ratón normal. Los niveles de IgA e IgG1 están usualmente por debajo del 10% del control. Los de IgG2A e IgG2B están por debajo del 20%. También parecen tener un sistema del complemento

débil (156). Sin embargo, estos valores se modifican claramente con la edad (157), así, en ratones viejos, la IgG1 alcanza valores normales. Otro hallazgo inesperado fué la aparición de niveles relativamente bajos de IgM en todos los grupos de edad, que no se ven modificados por el tratamiento con suero antilinfocitario. Por el contrario, el empleo de este suero en ratones "desnudos", reduce marcadamente las cifras de IgG1 e IgG2. La sensibilidad al suero antilinfocitario es mayor en las hembras que en los machos.

La síntesis de anticuerpos, la función citológica medida por las células T y los niveles de inmunoglobulinas vuelven a la normalidad, cuando al ratón "desnudo" se le inoculan timocitos o células T tímicas, o recibe un injerto tímico. Las células natural killer (NK) están elevadas en este animal en comparación con sus hermanos de camada convencional. Si la función tímica es reconstruida por injerto fetal de timo en el ratón "desnudo" joven (Balb/c), la función T es recuperada y la actividad de la células killer decrece a niveles normales (158).

La importancia práctica del deterioro de la función inmunológica de las células T en el ratón "desnudo", es la tolerancia a los trasplantes de tejidos. Se ha demostrado que este animal aceptaría xenografías de una gran variedad de animales próximos y distantes, tanto de mamíferos como de aves,

reptiles y anfibios (159), así como de tumores humanos entre ellos los pulmonares (160). No obstante, a pesar de la enorme tolerancia de estos huéspedes, el éxito xenográfico del carcinoma pulmonar no se da en el 100% de los casos. Así Sharkey (160) cita un 54% de éxitos para el carcinoma epidermoide, 0% para adenocarcinomas y un 71 % para un grupo misceláneo de células claras, células grandes, células pequeñas y mixto glandular y epidermoide. En general, tumores menos diferenciados crecieron mejor en el ratón "desnudo". Mattern (161), entre otros, describe un crecimiento en el 50% de las xenografías de los carcinomas epidermoide y adenocarcinomas de pulmón, en tanto que otros tumores logran alcanzar un crecimiento del 78 al 94% (106).

Esta aceptable capacidad de tolerar crecimiento de injertos tumorales en este tipo de huésped, lo convierte en un método útil para la experimentación in vivo de tumores humanos, ya que prácticamente en el 100 % de los casos el tumor xenografiado es idéntico al tumor de origen (158). Con todo, el método presenta inconvenientes nada despreciables a la hora de escogerlo para valoraciones de laboratorio. Primero, es un procedimiento caro, por la obtención de los animales, razas Balb/c (nu/nu), Bomholtgaard, Ry Denmark o NMRI (nu/nu) de Zentralaustalt für Versuchstierzucht/ Hannover, por el mantenimiento de éstos (habitación con flujo laminar, temperatura entre 25 y 28 °C, bajo

condiciones asépticas, aire filtrado, esterilizado de jaulas, agua y comida) (99,106). También es caro porque exige dedicación de un personal especializado. Por otra parte, la rentabilidad puede mermarse notablemente (descenso del tanto por ciento de prendimientos), por el largo período de incubación para el primer pase tumoral, que puede alcanzar entre 90 y más de 125 días (100, 153,162), junto con una vida corta de los animales por infecciones, sobre todo víricas. Circunstancias todas encarecedoras del método de laboratorio.

Las xenografías tumorales, tanto en el ratón "desnudo" atímico como en otros ratones inmunodeprimidos, presentan otros inconvenientes tales como verse influenciado el prendimiento tumoral por el sexo del animal y por el estado inmunitario. El sexo influye naturalmente por las secreciones hormonales de los huéspedes, así un carcinoma de próstata se desarrollaría mejor en el individuo macho que en la hembra. También se ha demostrado que un carcinoma anaplásico de células pequeñas pulmonar se desarrolla más en el ratón macho que en el ratón hembra (93% versus 57%) (158). La susceptibilidad entre ambos sexos es eliminada por la administración de suero antitimocito. Esto sugiere que las diferencias hormonales entre ambos sexos son función indirecta de la inmunidad del huésped, y que la resistencia a un trasplante tumoral puede verse modificada por efecto del suero antitimocito. Por el contrario, el suero antilinfocito no afecta al

prendimiento tumoral (157).

#### **I.A.2.3.- Animales inmunodeprimidos artificialmente.-**

Otros investigadores emplean ratones de laboratorio a los que se les ha provocado una depresión inmunitaria por varias técnicas. La raza de ratón a utilizar suele ser CBA/lac. A este animal se le practica una timectomía neonatalmente, y tras ella, dos a cuatro semanas más tarde, se realiza una irradiación corporal total con 9 Gy (163). A otros ratones CBA/lac se les realiza timectomía retroesternal a las tres o cuatro semanas, e irradiación de 9 Gy Co dos semanas más tarde (112,164). También es frecuente añadir a la timectomía, efectuada a las 3 semanas, e irradiación corporal con cobalto, una dosis de citosina arabinósido, 48 horas después de la irradiación, con 200 mgs por kilogramo de peso intraperitoneal (46). En todos, pocas horas más tarde, se hace reposición medular con injerto de médula ósea de ratones control, en general 5.000.000 de células nucleadas medulares (46,112,143, 163,164). La implantación tumoral usualmente se realiza de dos a cuatro semanas después de esta reconstitución.

El ensayo de laboratorio con estos animales es de menor coste que con los ratones atímicos "desnudos", pero tiene una menor ventaja en cuanto a la consecución de un estado inmunitario

óptimo, aparte de no estar exentos de una cierta mortalidad por infecciones. Otra desventaja es que recuperan la capacidad de rechazar el injerto dependiendo de la reconstitución medular. Steel y cols. (143) concluyen que la reconstrucción con 200.000 células medulares, permite a los ratones sobrevivir y tolerar las manipulaciones subsiguientes con la misma seguridad que reconstrucciones de injertos superiores (5.000.000 de células), y, sin embargo, mejora el grado de inmunosupresión. Se ha intentado también aumentar el déficit inmunitario de estos ratones elevando la dosis de irradiación a 10 u 11 Gy, pero los convierte en mucho más frágiles y susceptibles y al mismo tiempo no ofrece ninguna ventaja en la receptividad de los animales (147).

#### **I.A.2.4.- Datos bibliográficos.-**

##### **I.A.2.4.1.- Animal de experimentación.-**

En la revisión de la literatura, el animal más empleado en xenografías experimentales humanas es el ratón atímico "desnudo" (40,55,89,91,93,94,106,114,145,150,162,165,166), que se utiliza en más de la mitad de las referencias consultadas. Dentro ellos la inmensa mayoría de los trabajos se refieren al empleo de la raza Balb/c. Con menor frecuencia se han empleado ratones de la raza NMR-F, ratones CBA/lac tratados con timectomía y cobalto (112,143,163,164),

timectomía, irradiación y citosina arabinósido (46,120,146,167), irradiación exclusiva con cobalto (147), o con suero antilinfo-citario (88).

Ha existido una mayor tendencia emplear ratones atímicos "desnudos" a partir de la década de los 80.

#### I.A.2.4.2. Sexo.-

Existe un predominio en el empleo de animales inmunodeprimidos de ambos sexos indistintamente (46,56,88,89,91,94,100,106,112,114,120,143,145,146,147,162,163,164,165,166). Con menor frecuencia se han empleado ratones del sexo femenino exclusivamente, o rara vez sólo los del sexo masculino (41,93,99,118,150,167).

#### I.A.2.4.3.- Edad.-

La edad escogida para la experimentación en más de la mitad de los casos es entre 4 y 6 semanas (41,89,93,112,143,146,164,165,166). Con menor frecuencia se han empleado animales de edad superior a éstas (56,91,94,99,100,106,145,167) y ocasionalmente ratones de menor edad (46,163).

#### I.A.2.4.4.- Via de la inoculación.-

La vía xenográfica utilizada es fundamentalmente la subcutánea (46,56,89,94,106,112,114,118,120,145,146,150,162,163,164,165,166). De forma más

esporádica se han empleado otras como la cerebral, intraperitoneal y la intramuscular (88,91,93,100,118,143).

#### **I.A.2.4.5.- Tipo de injerto.-**

En más de la mitad de las ocasiones el injerto a xenografiar son células tumorales, de tumores sólidos pulmonares disgregados, o células recogidas de derrames (41,89,91,93,94,99,100,118,143, 147,150,166). En menor número de casos se han implantado auténticos microfragmentos tumorales de diferente tamaño (46,56,112,146,162,164).

#### **I.A.2.4.6.- Medios líquidos para el manejo del injerto.-**

Para el manejo de la suspensión celular y de la manipulación de los especímenes se emplean, lo mismo que en ensayos in vitro, medios de cultivo. El más comunmente utilizado es el RPMI-1640. Menos frecuente es el empleo de los medios mínimos esenciales de Eagle, MacCoy y solución balanceada de Ham, muy raramente el suero de ternera fetal.

#### **I.A.2.4.7.- Suspensiones celulares.-**

No todos los autores utilizan el mismo número de células viables en sus estudios para el ensayo xenográfico, oscilando entre  $nx10$  a  $nx10.000.000$ /injerto (41,88, 89,91,93,94,99,106,118,143, 147,150,162,164,166).

**I.A.2.5.- Período de latencia en xenografías.-**

Se entiende por período de latencia en xenografía el intervalo de tiempo que transcurre desde el inóculo tumoral hasta el desarrollo del tumor, cuyo índice de prendimiento oscila entre 44 y 78 % (46,91,145,146), si bien en algunos casos puede alcanzar el 94 % (106). Este período de latencia suele ser de 14 a 30 días (41,46,94,121,147,150). Sin embargo, no es infrecuente, no desarrollarse tumoración alguna hasta períodos tan prolongados como 12 semanas e incluso 18 ó 20 semanas (162,165,166). Es uno de los graves inconvenientes del método. Se piensa que la gran variabilidad del período de latencia es consecuencia directa del número de células inoculadas, del animal inmunosuprimido, de la vía de inoculación, y del mismo concepto de crecimiento tumoral en xenografía. No obstante, hay que señalar que el período de latencia disminuye con los sucesivos pases xenográficos (91,162).

**I.A.2.6.- Definición de crecimiento tumoral en xenografía.-**

No todos los investigadores emplean la misma terminología para referirse al crecimiento tumoral, pudiendo utilizarse criterios de tipo cuantitativo o cualitativo.

- Criterios cuantitativos.- Se pueden expresar en unidades de volumen y de peso tumoral, en medidas lineales de los implantes o de superficie de los mismos (46,56,89,91,94,100,112,143,147,162,163,164,166,167).

-Criterios cualitativos.- Cuando se desarrolla hipertensión endocraneal (ataxia, sopor, etc.) en caso de xenografías intracraneales.

Las fórmulas más frecuentes de valoración del crecimiento tumoral son las siguientes:

$$1.- \text{Volumen} = [\pi x D d^2] / 6$$

En donde "D" es el diámetro mayor y "d" es el diámetro menor (46).

$$2.- \text{Volumen} = [\pi x d_i^3] / 6$$

En donde "di" es el diámetro medio (112,164,167).

$$3.- \text{Volumen} = \ln [\ln A_{\max} - \ln A(t)]$$

En donde "A" es el producto de diámetros largo y ancho siendo las valoraciones hechas en varios tiempos (162).

**I.A.2.7.- Características generales del crecimiento xenográfico tumoral.-**

La xenografía tumoral es un método de laboratorio que investiga in vivo el desarrollo y comportamiento de distintas neoplasias humanas. Es un modelo ideal pues, de alguna manera, los tumores se desarrollarían en unas condiciones ambientales lo más parecidas al crecimiento en el hombre. Desde un punto de vista de ensayo de quimiosensibilidad, en teoría, este sistema podría ser óptimo. Parecería todo ventajas en estos procedimientos, sin embargo, tienen deficiencias que los alejan de ser el método indiscutible y standard para el crecimiento de tumores humanos en el laboratorio por la razones que vamos a exponer.

-Es un método caro.

-El índice de éxitos oscila entre el 44 y el 78 %.

-No siempre se consigue una inmunosupresión correcta y ésta a su vez aumenta la fragilidad de los animales.

-Influye el sexo.

-Ocasionalmente hay que realizar disgregación celular de los tumores, con los consiguientes errores que esta técnica introduce en el sistema (viabilidad celular, selección tumoral, etc.).

-Hay modificaciones del crecimiento en función del lugar del animal donde se efectue el injerto.

-No hay consenso acerca del número de células a transplantar.

-No hay consenso del volumen que debe alcanzar el tumor xenografiado para considerarse "crecimiento" y poder emplearse en otros estudios, como los de quimiosensibilidad.

-Largo período de latencia para el desarrollo tumoral y de investigación de técnicas especiales, para la aplicación individual de un paciente tumoral.

-En definitiva, tampoco es posible concluir si las subpoblaciones tumorales estaban presentes en el tumor original, o son consecuencia de mutaciones acontecidas a lo largo del desarrollo del método.

#### **I.B.- APLICACIONES EN EL LABORATORIO DE LOS SISTEMAS DE CULTIVO.-**

Las aplicaciones más importantes son la quimiosensibilidad y la biología del cáncer de pulmón.

##### **I.B.1.- ANALISIS DE LA QUIMIOSENSIBILIDAD.-**

Basados en la observación de los estudios con antibiograma, estimula el interés la posibilidad del desarrollo de un sistema similar para células neoplásicas, de tal forma que la sensibilidad de los tumores humanos a agentes citotóxicos fuese rápidamente analizada

en el laboratorio con dos usos potenciales: A) valoración, previa al tratamiento de un paciente tumoral, de un amplio espectro de agentes para la aplicación de un tratamiento individualizado, disminuyendo así el uso de drogas inactivas y su asociación tóxica, B) selección de nuevos compuestos y regímenes de fármacos con posible aplicación en pacientes con cáncer.

Hasta la fecha ninguna técnica desarrollada ha satisfecho criterios mínimos de rapidez, economía, capacidad de predecir comportamiento en el paciente o mecanismo de acción.

#### **I.B.1.1.- Quimiosensibilidad en ensayos in vitro de corta duración.-**

La mayoría de los sistemas de test in vitro requieren la preparación de una suspensión tumoral para ser expuesta a una concentración fijada de agentes citotóxicos.

##### **I.B.1.1.1.- Disgregación celular.-**

Ya se ha comentado que la disgregación celular provoca grandes cambios en la membrana celular que repercuten en la viabilidad y quimiosensibilidad de las células. La viabilidad celular es analizada frecuentemente con tinciones supravitales como el azul tripan, sin embargo, estas valoraciones no tienen la suficiente precisión para

determinar viabilidad biológica (129). Cole (48) recientemente ha descrito los resultados de colorimetría ensayada en numerosas líneas celulares de cáncer de pulmón. En el sistema de Sal tetrazólica que es convertida a color por enzimas presentes sólo en células viables, la reacción colorimétrica es medida rápidamente siguiendo testigos simultáneos de múltiples líneas celulares y expuestas a citostáticos. La validez de este ensayo no ha sido establecida.

#### **I.B.1.1.2.- Esferoides.-**

Un intento para mejorar el crecimiento celular tumoral en cultivo se ha efectuado con los esferoides (115,116,119,127). Los esferoides multicelulares están compuestos de células tumorales creciendo en una estructura tridimensional, que simula el desarrollo y condiciones microambientales del tumor real. En ellos persisten interacciones celulares por íntimo contacto y un gradiente de difusión para oxígeno, nutrientes y agentes quimioterápicos (119), pudiendo ser empleados como un modelo tumoral *in vitro* de complejidad intermedia entre el cultivo en suspensión y tumores *in vivo*. De una revisión amplia de tumores algunos autores han alcanzado formación de esferoides aproximadamente en el 40% de los casos de especímenes obtenidos directamente de cirugía. Sin embargo, otros llegan a cifras tan bajas como el 5%, especialmente para especímenes quirúrgicos del carcinoma de pulmón (127). Hay que señalar que el criterio de creci-

miento de esferoides incluye el desarrollo de volúmenes entre 400 y 500 micras de diámetro (119,127), dimensiones que se suelen emplear, una vez alcanzadas, para la valoración de agentes quimioterápicos.

Para obtener el esferoide es necesario una disociación celular, bien por procedimientos enzimáticos o mecánicos, y cultivar unas 100.000 células por plante en disco. Después de una o dos semanas de cultivo, los esferoides con 1.000.000 a 100.000.000 de células por micra cúbica, son colocados en microvasos con medio de cultivo y suero de ternera fetal al 20%, incubándose a 37 ° en una atmósfera con 100 % de humedad, 5% de CO<sub>2</sub>, 95% aire. Después de varias semanas de cultivo y una vez alcanzado un volumen suficiente, se emplean en valoraciones de quimiosensibilidad o estudios biológicos. El volumen final del esferoide no se ve influenciado por la frecuencia de cambios del medio y depende del número de células y del tipo tumoral (115, 119,127).

$$\text{Volumen} = \frac{3}{4} \pi (a/b)^{3/2}$$

Donde "a" y "b" son diámetros máximos perpendiculares (115)

La disociación celular, previa a la formación de esferoides, reduce la eficacia de plantación e introduce la posibilidad de modificación y selección celular (116,119,127). Otros,

sin embargo, no han detectado influjo en la formación de esferoides por la tripsinización o tratamiento con EDTA previo (115).

Por estudios de radiomarcadores se ha encontrado que las células pueden emigrar de los esferoides y que esta capacidad aumenta cuando se utiliza, previa al tratamiento, tripsina o EDTA. Se ha demostrado que una alta capacidad de emigración puede ser correlacionada con mayor capacidad metastatizante in vivo (119).

#### **I.B.1.1.3.- Biología del esferoide.-**

Los esferoides desarrollan habitualmente un reborde de células viables que rodean un núcleo necrótico (47,115,116,119,127). El espesor de células viables varía significativamente para diferentes tipos tumorales. En general, los elementos cercanos a la periferia fueron más sueltos, la zona intermedia más empaquetados y hubo un significativo espacio extracelular cercano al centro necrótico. Las diferencias en el espacio extracelular y en la densidad de empaquetamiento pueden verse influenciadas por la concentración del gradiente de oxígeno y nutrientes, afectando por consiguiente al crecimiento del esferoide. Las células del esferoide son morfológicamente muy parecidas a las del tumor in vivo (115,116, 119,127).

En los esferoides se han referido diferentes tipos de unión. La frecuencia de tales contactos célula a célula varían ampliamente entre diferentes tipos de esferoides, mimetizando los del tumor originario.

Los estudios de gradiente de oxígeno y nutrientes con implantación de microelectrodos concluyen que fundamentalmente la hipoxia induce la necrosis central (47,115,127), y también la falta de capacidad de oponerse al stress del bajo pH y alta osmolaridad en regiones centrales (47,115). Estas mismas circunstancias influirían, a su vez, en la respuesta a la quimio y radioterapia. Otro factor importante a tener en cuenta en estos estudios es el empaquetamiento celular, cuanto mayor es éste y mayor el contacto celular, más resistencia a las radiaciones e hipotermia existe (47).

#### **I.B.1.1.4.- Valoración de citotoxicidad en los esferoides.-**

La valoración de citotoxicidad en los esferoides es una importante aplicación de este sistema de cultivo, por la similitud con el microambiente tumoral, especialmente cuando existe una pobre vascularización, (las drogas penetran a través de varias capas de células desde el capilar). Así, se sugiere que una pobre penetración del agente fuese el mayor factor en la resistencia a

*fármacos (127).*

*La concentración de los agentes quimioterápicos en ensayo con esferoides, se realiza en función de las concentraciones máximas del plasma in vivo. Estas soluciones se almacenan en otras como la balanceada de Hanks. Se añaden al medio completo para obtener una concentración final apropiada, y los esferoides se agitan en dicho medio por espacios de 1 a 2 horas (116,119). A continuación los esferoides se retiran y, tras lavado, son depositados de nuevo en un medio de cultivo ya sin agente citotóxico. En algunas ocasiones, cuando el fármaco necesita una activación in vivo, como la ciclofosfamida, los esferoides y el fármaco se inyectan intraperitonealmente por espacios de 4 horas en ratones hembra, tras de lo cual se mata al animal y se extraen, depositándose en medio de cultivo. Veinticuatro horas más tarde los esferoides se ponen en contacto con una solución de 5 iodo deoxiuridina, que es incorporada a los mismos para alcanzar un "plateau" máximo sobre las 48 horas, e indica que todas las células en división han sido muertas por el citostático (167). Cuando el esferoide es expuesto al agente quimioterápico, tanto la captación como el nivel máximo del "plateau" son bajos y función de la dosis de dicho agente, aunque a altas concentraciones no hay cambios significativos. En definitiva, una débil incorporación de 5 iodo deoxiuridina a las células del esferoide indicaría sensibilidad al fármaco. El método es sensible para*

determinar los efectos del citostático a bajas concentraciones. En general, el nivel máximo de incorporación a la 48 horas, es dependiente de la concentración del citotóxico y del número de células viables restantes después del tratamiento con la droga (119). El método se propone como un modelo de primer nivel de aproximación para evaluar la eficacia de estos agentes.

Otro procedimiento de valoración es el retraso de crecimiento de esferoides expuestos, definido como la diferencia en el tiempo entre el grupo tratado y el grupo control para alcanzar el doble del diámetro inicial. Por último, el tiempo de duplicación se define como la fracción siguiente :

$$TD = \frac{\log 2 \times \text{retraso de crecimiento}}{-\log \text{fracción superviviente}}$$

En donde "la fracción superviviente" es el número de células del grupo tratado / número de células del grupo control (116).

El tiempo de duplicación tiende a aumentar cuanto más pequeña es la fracción de supervivencia.

El método colorimétrico, referido anteriormente por Cole (48), puede ser utilizado también para valorar la quimiosensibilidad de células tumorales de pulmón humano, con una sal de

tetrazolio (3-[4,5-dimetil tiazalato 2-yl]-2-5 difenil bromuro de tetrazolio, MTT), que es convertida en un producto coloreado por enzimas activos sólo en las células vivas. El ensayo MTT puede ser llevado a cabo en numerosas fuentes a la vez, con diferentes concentraciones del fármaco, tiempo de exposición al mismo, y distintas densidades celulares. Aunque es un método poco sensible, es útil para monitorizar y valorar el desarrollo de multirresistencia de células en cultivo.

#### **I.B.1.2.- Quimiosensibilidad en el ensayo clonogénico.-**

##### **I.B.1.2.1.- El ensayo de Stem cell de tumores humanos.-**

Se ha propuesto como el método *in vitro* por el que los citostáticos pueden ser seleccionados por su actividad contra células tumorales de un paciente (92). Las células neoplásicas forman un conjunto con un potencial proliferativo variable, desde aquellas con una capacidad limitada de divisiones, a otras que pueden regenerar la población celular entera, incluyendo ellas mismas (168). Los estudios de cinética celular indican que la mayoría de las células tumorales tienen un doblamiento lento, mueren o terminan diferenciadas, y sólo un pequeño porcentaje del total tiene capacidad de repoblar el tumor. A éstas se las denomina *stem cell*, y son, a su vez, responsables de la repoblación tumo-

ral después del tratamiento y del desarrollo de las metástasis. Constituyen, por tanto, el primer blanco de algunos agentes citotóxicos (77).

#### **I.B.1.2.2.- Validez del modelo Stem cell.-**

La validez del modelo stem cell para el cáncer humano está soportada por numerosa evidencias.

- existe una relación inversa entre índices de proliferación, tales como el índice mitótico o el índice de marcado de timidina, y el grado de diferenciación tumoral.

- la experiencia clínica con radioterapia sugiere, que sólo una pequeña proporción de células tiene capacidad de regenerar el tumor después del tratamiento (169).

- en el ensayo clonogénico, el número de colonias generadas de una suspensión celular de un tumor humano, está usualmente en el rango de 0.001 a 1.0 % del número de células plantadas (92,93, 124).

- fracciones de suspensiones celulares tumorales humanas han demostrado que proliferan activamente (potencial clonogénico). La diferenciación celular está restringida a subpoblaciones con definidas propiedades físicas (170).

- la presencia de un marcador clonal, como el cromosoma Philadelphia, sugiere que el tumor es originado de una stem cell

*multipotencial (77).*

*La formación de colonias sugiere que las células neoplásicas tienen capacidad substancial proliferativa, siendo necesarias al menos seis divisiones para constituir dichas colonias, conteniendo como mínimo más de 50 células (77,122,125). Pero se pueden formar pequeñas colonias o racimos por células transicionales y así, grupos de 10 elementos en el primer día de plante, que formen grupos de 60 células en el día 14, difícilmente satisfacen la definición de crecimiento clonogénico (125). Por consiguiente, la formación de colonias no es un test suficiente para valorar los efectos del tratamiento stem cell (77).*

**I.B.1.2.3.- ¿Qué se entiende por quimiosensibilidad en el ensayo stem cell?.-**

*Se ha investigado la relación entre la supervivencia de las células clonogénicas y la dosis de un agente citotóxico. A menudo tiene una relación exponencial con la dosis del fármaco o radioterapia, resultando entonces líneas rectas. La observación de una acodadura inicial de la curva de supervivencia puede indicar resistencia a bajas dosis, mientras que un "plateau" indicaría resistencia de una subpoblación (77).*

*En el ensayo clonogénico standard las células son cultivadas en medios líquidos o semilíquidos, después de 2 ó 3 semanas de incubación se hace el conteo de colonias. Estas son expuestas de manera arbitraria a la acción de ciertas concentraciones del fármaco (función de las concentraciones plasmáticas, 1/10 de su nivel), durante un tiempo aproximado de una hora. Se considera que existe quimiosensibilidad, cuando el número de colonias disminuye al 30% o menos. Quimiorresistencia, cuando la supervivencia de colonias es superior o igual al 50% (53,55,90,92,128). El número de colonias necesario para que los ensayos de quimiosensibilidad puedan ser evaluables, es como mínimo de 30 colonias por plante (51,55,77,90,92).*

#### **I.B.1.2.4.-Problemas técnicos del ensayo Stem cell.-**

*Junto a los conceptos anteriores, un tanto de consenso arbitrario, el ensayo clonogénico plantea una serie de problemas técnicos:*

- Racimos que son artefactos (79,171).*
- Perturbaciones artificiales del crecimiento, resultado de la simple manipulación de los cultivos (171).*
- La exposición a fármacos reduce el consumo de nutrientes por las células no clonogénicas, e incrementa artificialmente el volumen y número de colonias de células clonogénicas (172).*
- Baja eficacia de plantación. La proporción de tumores*

humanos que crecen con una eficacia de plantación suficiente para valorar la actividad de la droga (más de 30 colonias por 500.000 células plantadas), es menor del 50% (77)

- Dificultades en el conteo de colonias, pobres índices de evaluabilidad y grandes coeficientes de variación (128).

- Dificultades de preparación de suspensiones celulares simples. El daño celular ocasionado puede alterar el crecimiento de las colonias, así como la quimiosensibilidad a los fármacos, ya que ésta es función del tiempo de exposición a la enzima de disgregación celular (136).

- Amplias variaciones de la curva de supervivencia celular, con escasa reproductibilidad de los resultados del test entre los diferentes laboratorios (173).

- Varios tipos de tumores no pueden ser valorados (171).

- Tiempo prolongado para realizar la evaluación (80).

- El volumen de las colonias es arbitrario. Se ha escogido entre 30 y 50 células. Un estudio de distribución del volumen de colonias sugiere, que puede existir discriminación entre las producidas por las stem cell y pequeñas colonias abortivas. La inclusión de estas últimas, puede conducir a una sobreestimación de supervivencia tumoral y alterar el "plateau" de la curva de supervivencia celular (77).

- Análisis de correlación in vitro-in vivo de quimiosensibilidad en el ensayo Stem cell, predice una verdadera sen-

sibilidad del 40 al 75 %, mientras que la predicción de resistencia verdadera es del 84 al 98% (77,78,125).

#### **I.B.1.2.5.- Utilidad del ensayo no clonogénico para valoración de quimiosensibilidad.-**

Por todas estas razones, algunos autores consideran que para la valoración de quimiosensibilidad el ensayo no clonogénico puede ser tan válido como el clonogénico (122). Además, las células clonogénicas comprenden sólo una pequeña fracción del total de las células. La quimioterapia del cáncer ha tenido su gran efecto curativo en neoplasias tales como las leucemias, linfomas, carcinomas testiculares, coriocarcinoma, cáncer de pulmón de células pequeñas. Todos estos tumores tiene la propiedad común de desaparecer después del inicio de una quimioterapia efectiva, y es improbable que este efecto sea mediado a través de la esterilización selectiva de unas pocas células clonogénicas. Es probable que la población celular tumoral entera esté siendo destruida por dichos agentes. Existen evidencias clínicas como son las desapariciones muy precoces de las poblaciones blásticas leucémicas enteras, o remisiones completas precoces de carcinomas microcíticos pulmonares, que correlacionan bien con remisiones prolongadas (174). Se ha podido comprobar, en tumores xenografiados tratados con quimioterapia y radioterapia, que sin necrosis celular precoz, el crecimiento tumoral no

se afecta, es decir, si no hay un daño en la mayor parte del componente heterogéneo celular del tumor (clonogénico y no clonogénico (175)). En definitiva, el ensayo in vitro, basado en el concepto del daño celular precoz en la población tumoral celular entera, ha correlacionado bien con la respuesta a la quimioterapia. Además el concepto más importante, tanto en el ensayo clonogénico como en el no clonogénico, es el de la fracción de supervivencia, que consiste en la cuantificación del número de colonias supervivientes después de una exposición a un fármaco, en relación al número total de colonias del grupo no tratado. Y esta fracción suele ser idéntica en ambos tipos de ensayo (122).

#### ***I.B.1.2.6- Resumen.-***

*La información obtenida de la valoración de quimiosensibilidad en el ensayo clonogénico, no necesariamente beneficia al enfermo. Parece que sólo seleccionaría pacientes con mayor probabilidad de responder a la quimioterapia. La mayoría de las respuestas predeterminadas son parciales y cortas. De tal manera que no se ha demostrado beneficio real para los pacientes en términos de calidad o cantidad de vida (77). Por último, señalar que, la valoración de la quimiosensibilidad en cultivos de tumores in vitro, puede ser medida también por los cambios morfológicos observados como daño celular (121), por inhibición*

del metabolismo (176), por inhibición de la incorporación de precursores radioactivos (101,177), sin que ninguno de ellos esté consagrado por su utilidad clínica (173).

### **I.B.1.3.- Xenografías en el ensayo con citostáticos.-**

#### **I.B.1.3.1.- Valor científico.-**

El desarrollo xenográfico de tumores humanos permitiría estudios de quimiosensibilidad in vivo con indudable atractivo científico, ya que representa el procedimiento más similar al tratamiento de quimioterapia en el hombre. Los fármacos serían administrados de forma semejante a la práctica clínica, transportados por vía hematógica al tumor, y, al mismo tiempo, éstos sufrirían interacciones metabólicas como acontece en el ser humano. Por ejemplo, en sustancias que necesitan una activación metabólica, como la ciclofosfamida, la valoración in vivo sería el procedimiento idóneo a tener en cuenta.

Es bien conocido que los tumores humanos xenografiados retienen las características morfológicas y funcionales originales (112, 120,146,147,164,167, 178,179), con algunas excepciones, como hemos analizado anteriormente, entre ellas la

capacidad metastatizante y de invasión. Característica que puede ser modificada por razones diversas, como el estado de inmunosupresión del animal (100), la vascularización del injerto (106), y la zona escogida para xenografiar (118,150). Por sí solas, estas razones originan deficiencias de técnica que van a influir en el comportamiento del tumor a valorar (quimiosensibilidad).

#### **I.B.1.3.2- Factores que influyen en la valoración xenográfica.-**

El índice de éxitos de prendimiento tumoral oscila del 44 al 78 % (46,91,145,146). Este puede verse influenciado por el estado inmunitario del huésped (164), y, al mismo tiempo, es probable que exista una selección tumoral celular (147,167).

Los ratones de experimentación modifican su estado inmunitario con el paso del tiempo, recobrando la capacidad de rechazo del injerto a los pocos meses de efectuar la inmunosupresión (127,143). Así, el tumor se ve infiltrado por granulocitos, macrófagos y linfocitos, que conducen a la destrucción del mismo entre 4 y 14 días. La muerte celular fue debida fundamentalmente a linfocitos T, aunque también hubo un grado de células T citotóxicas independientes (127).

En la mayoría de los casos el índice de crecimiento tumoral

es función del volumen, y, a su vez, éste de los diámetros alcanzados en las xenografías (Ver apartado I.A.2.6).

$$\text{Vol} = \pi/6 \cdot (d_i)^3$$

$$\text{Vol} = \pi/6 \cdot (D \cdot d^2) \quad \text{Las cifras son exponentes}$$

$$\text{Vol} = \ln (\ln A_{\text{max}} - [\ln A(t)])$$

El índice de crecimiento a menudo disminuye con el incremento del volumen tumoral, y es posible que un bajo índice sea debido a una mayor pérdida celular (147,164). No obstante, los datos experimentales señalan que hay una aceleración en el crecimiento xenográfico a partir del cuarto pase (179), así como un aumento del índice de prendimiento después del cuarto al décimo cuarto pase en el ratón. Circunstancias que pueden ser interpretadas como selección tumoral celular (164,179,180). De otra parte, hay cierta correlación entre el índice de prendimiento en el primer pase y el índice de crecimiento (147). En definitiva, se piensa que serían tumores seleccionados que crecen rápidamente. Otro argumento sobre selección tumoral, que pueden influir en el índice de crecimiento, sería la porción escogida para xenografiar, ya que las células de diferentes partes de la neoplasia varían en su habilidad para proporcionar angiogénesis

y en la formación de un armazón de tejido conectivo (164). En esta última circunstancia la selección celular no estaría condicionada por la interacción tumor-huésped y sería fruto exclusivamente del azar. En el extremo opuesto, un fuerte crecimiento tumoral y alto índice de prendimiento, aumentaría el riesgo de que éstos no sean representantes del tumor original, debiéndose sospechar una proliferación de otras células (158).

#### **I.B.1.2.3.- Limitaciones de la valoración de quimiosensibilidad en el laboratorio in vivo.-**

Por éstas, entre otras razones, la valoración de quimiosensibilidad in vivo, que en teoría podía ser el método más fiable y más semejante al ensayo clínico, se ve limitado tanto en sus resultados como en las conclusiones prácticas de aplicación humana. Pero además, otras causas técnicas influyen desfavorablemente a la hora de interpretar los datos.

Los tumores xenografiados en los animales de experimentación, una vez que han alcanzado un diámetro superficial medio de 8 a 10 mms., son seleccionados y divididos en grupos comparables, conteniendo cada uno de 6 a 10 tumores. Un grupo es guardado como control y los otros son tratados con uno o más fármacos. Las medidas calibradas se suelen realizar tres veces por semana, y los volúmenes tumorales son calculados por una fórmula geométrica, o usando curvas de calibración. El creci-

miento de los tumores tratados es retardado y puede temporalmente regresar. La curva de respuesta para los tumores tratados puede ser dividida en dos componentes: a) componente declinante, que representa el aclaramiento por muerte tisular, b) componente de recrecimiento, que inicialmente está oculto. Es el segundo de éstos el que realmente indica el efecto del tratamiento (147).

Usualmente, la fórmula para analizar el efecto de la quimioterapia está basada en el concepto de retraso de crecimiento específico :

$$RCE = [Td \text{ (tratado)} - Td \text{ (control)}] / Td \text{ (control)}$$

(46,146,147,163,164,181)

En donde Td es el tiempo medio de duplicación.

El retraso de crecimiento específico representaría el número de retrasos de tiempos de duplicación tumoral por el tratamiento, y permitiría la comparación entre tumores de diferente índice de crecimiento. Pero hay evidencia de que las células tumorales que sobreviven a la acción citotóxica pueden repoblar, con un tiempo de duplicación considerablemente más corto, que el que tenían antes de dicho tratamiento (158), asimismo, también el índice de repoblación es distinto con citostáticos diferentes.

La selección de la dosis del fármaco es otro problema de difícil interpretación en los estudios de quimiosensibilidad en xenografías. Muy frecuentemente se suele administrar al ratón 1/10 de la dosis máxima tolerada del hombre (46,120,146,147, 164,167). Este procedimiento se basa en los estudios de Freireich (182), quien señala una relación lineal en la dosis LD10 de citostáticos en el ratón y sus niveles máximos tolerados en el hombre. Sin embargo, son necesarios datos farmacocinéticos comparativos entre el hombre y el ratón, para poder conocer con mayor exactitud una selección de dosis de estos agentes a utilizar en el animal.

Un problema adicional en los experimentos de retraso de crecimiento en xenografías, es el estado inmunitario del huésped, que sería capaz de atacar inmunológicamente al tumor, y de éste modo se interpretaría falsamente como un incremento de la respuesta tumoral (164).

Para intentar minimizar estos problemas, algunos autores utilizan el concepto de fracción de reducción de volumen. Se realizan medidas de volumen a un tiempo fijado después del tratamiento, en un grupo control y tratado respectivamente:

$F.R.V = \log \text{ media volumen control/media volumen tratado}$   
(147).

Conceptualmente, la FRV significa el número de décadas que es reducido el volumen tumoral tratado, en comparación al volumen tumoral no tratado. Una FRV = 1.0 indica que el tumor tratado se ha reducido 10 veces. Una FRV = 2.0, que el volumen tumoral se ha reducido 100 veces con relación al control.

El método ha sido criticado, porque si las determinaciones del volumen se realizan demasiado pronto, la regresión tumoral no sería aún completa, y la magnitud de la respuesta, por tanto, sería indeterminada.

#### **I.B.1.3.4.- Quimiosensibilidad de xenografías del cáncer de pulmón.-**

A pesar de todo, generalmente las xenografías mantienen las mismas características de respuesta a la quimioterapia que el tumor original (112,146,147,163,167,183). Concretamente, el cáncer de pulmón xenografiado muestra marcadas diferencias entre el carcinoma anaplásico de células pequeñas, con altos índices de respuestas, y el grupo de no células pequeñas. Aunque unos tumores respondieron más que otros, no se evidenció diferencia de respuesta en el espectro de los fármacos. Fue llamativo cómo algunos pacientes con carcinoma microcítico de pulmón previamente tratados, que no obtuvieron remisión completa, en xenografías se

comportaron de igual modo resistentes (146,163).

#### **I.B.1.3.5.- Resumen.-**

El ensayo de quimiosensibilidad *in vivo* en el laboratorio presenta limitaciones que nos obligan a interpretar los datos con cautela. En primer lugar, el índice de prendimiento en las mejores series suele estar próximo al 80 % (91), pero no todos alcanzan una intensidad de crecimiento necesaria para el ensayo (34%) (167). De éstos, a su vez en la mitad de los casos, la valoración estuvo dificultada por factores interrelacionados con el pobre índice de prendimiento, lento crecimiento y prolongado período de latencia hasta el desarrollo tumoral xenográfico, de tal modo que sólo un 10 o un 20 % de pacientes pueden beneficiarse de dichos ensayos (184). Por todo ello, los estudios de quimiosensibilidad en xenografías actualmente tendrían su mayor aplicación en la valoración primaria de nuevos citotóxicos (167), evitando así innecesarios ensayos en humanos de agentes inactivos (112,181,185).

#### **I.B.2.- APLICACION DE LOS SISTEMAS DE CULTIVO EN EL ESTUDIO DE LA BIOLOGIA DEL CANCER DE PULMON.-**

Muchos de los conocimientos de la biología del cáncer de pulmón, de su posible origen, producción

hormonal, citogenéticos, estudios de membrana, etiopatogénicos, histológicos y de comportamiento en el ser vivo, han podido ser realizados por el establecimiento de líneas celulares en cultivo de tejidos.

#### **I.B.2.1.- Evaluación de productos biológicos en cultivo de tejidos**

##### **I.B.2.1.1- Producción hormonal.-**

En muchos tumores puede estar presente un síndrome paraneoplásico, pero en ninguno es tan frecuente y con tal diversidad de manifestaciones como en el carcinoma microcítico de pulmón (104). Si bien, la evidencia bioquímica de producción de hormonas llega a ser tan alta como en el 50% de los pacientes (186), con demostraciones ocasionales de más de catorce hormonas (56), el desarrollo clínico del síndrome es menor del 25 % de los casos (187).

Se ha demostrado producción hormonal en cultivo de tejidos tumorales in vitro en numerosas ocasiones (41,42,57,59,89,95,96, 104,110), comprobándose que ésta suele ser de varias sustancias, especialmente en el carcinoma microcítico de pulmón. En dicha neoplasia, debido a la frecuente secreción ectópica hormonal que presenta, se ha intentado valorarlas como "marcadores" tumorales, tanto de la extensión de la enfermedad como de la respuesta a la

terapia. Sin embargo, ninguno de los marcadores es suficientemente específico o sensible, de tal manera, que en el cáncer microcítico de pulmón rara vez dan información adicional a la obtenida por el examen físico, o por los procedimientos de estadiaje de rutina (104).

En general, la valoración hormonal se efectúa por radioinmunoensayo. Sucesivos análisis del medio de cultivo, incluido en los dos primeros años, han mostrado que el espectro de producción hormonal se ha mantenido constante en la mayoría de los casos, sin identificarse producción adicional (57). Asimismo, la cantidad puede cambiar en algunas circunstancias, pero habitualmente permanece estable.

El espectro de producción hormonal es muy variable, no obstante, la capacidad de síntesis de un espectro amplio está ligada al carcinoma de células pequeñas pulmonar (57). Entre estas hormonas las más frecuentes son: ACTH, calcitonina, parathormona, gonadotropina coriónica, glucagón, hormona de crecimiento, somatostatina, prolactina, beta endorfina, lipotropina, oxitocina, vasopresina y hormona luteinizante. También han sido demostradas hormonas esteroideas. La producción de más de una hormona por tumores no endocrinos es rara (188).

Ultraestructuralmente, las células en cultivo presentan

gránulos electrondensos intracitoplasmáticos, pero no hay correlación entre el número de gránulos y la secreción hormonal (57). La cantidad de hormona medida en el medio no es necesariamente toda la producida por las células, bien por adsorción del frasco del cultivo, adherencia a la pared celular o persistencia intracitoplasmática, también hay evidencia de degradación en el medio de cultivo. Por último, parece existir un mecanismo de autorregulación, de tal manera que la síntesis se inhibiría a determinadas concentraciones de estas sustancias. En consecuencia, niveles bajos de hormonas, no reflejan la capacidad de síntesis celular.

#### **I.B.2.1.2.- Marcadores tumorales en el carcinoma de pulmón de células pequeñas.-**

Se ha intentado correlacionar la producción de ciertas hormonas con determinados tumores. Así, la producción ectópica de PTH estaría asociada clásicamente con el carcinoma epidermoide de pulmón (189). Las hormonas esteroideas no serían sintetizadas por tumores pulmonares (190). Sin embargo, estos datos no son confirmados en los ensayos *in vitro*, pues el carcinoma microcítico es capaz de secretar la mayoría de las hormonas entre ellas las esteroideas (57), y el grupo de carcinomas no microcíticos, aunque con menos capacidad, también se ha demostrado que es productor de estrógenos (191). Recientemente han sido evaluados otros marcadores más específicos del carcinoma de pulmón

de células pequeñas, relacionados con isoenzimas tales como la bombesina, enolasa neuronal específica y la isoenzima creatin-kinasa cerebral. Estas tres sustancias son activamente secretadas en los cultivos de carcinoma microcítico, y no estuvieron presentes, o en cantidades mínimas, en los carcinomas de pulmón no de células pequeñas, mostrando además una buena correlación clínica, en pacientes de carcinoma microcítico, con la carga tumoral y la respuesta a la terapia (59,104).

#### **I.B.2.1.3- Enzimas polimorfos.-**

Distintas líneas celulares de tumores humanos cultivadas, han sido valoradas por análisis de enzimas polimorfos. Se ha comprobado que una combinación determinada de enzimas es un mecanismo útil para distinguir unas líneas celulares de otras (192), y que hay una asociación fenotípica particular de enzimas en dichas líneas, con susceptibilidad o resistencia a tumorigénesis. Además, estos estudios permiten confirmar en un cultivo tumoral si las células son de origen humano (41,89,96).

#### **I.B.2.1.4- Otras sustancias con actividad biológica.-**

Por último, otras sustancias con actividad biológica constatada en

cultivo han sido: a) la CSA (actividad estimulante de colonias), que estimula la formación de colonias de granulocitos-macrófagos (FSC-GM), y podría dar origen a una leucocitosis paraneoplásica. b) La secreción de prostaglandina E2, relacionada con la reabsorción ósea y la elevación de la calcemia (factor osteolítico). Ambas han sido descritas en tumores anaplásicos pulmonares (110).

#### **I.B.2.2.- Estudios de cinética celular en cultivo de tejidos .-**

El crecimiento celular puede ser medido por la incorporación de timidina marcada con H3. Esta incorporación es directamente proporcional al número de células tumorales viables plantadas y al número de colonias crecidas por plante. El método puede emplearse también para estudios de sensibilidad a fármacos in vitro, ya que existe una correlación entre la incorporación de timidina marcada y la fracción de supervivencia, en el 89 % de los casos (101). Además, produce resultados más rápidos (a los cinco días de la plantación celular), con pequeñas variaciones con el ensayo stem cell humano, y no requiere el conteo óptico visual o automático. Las desventajas del método son, que no es posible una valoración de colonias individuales o de clones, y tampoco estudios de las propiedades celulares.

Estos datos correlacionan con otros efectuados *in vivo*. Así un descenso del índice de marcado (LI) puede ser atribuible a varios factores ligados al retraso de crecimiento inducido por quimioterapia. Dichos cambios por modificación de la propia cinética celular, justificarían la disminución de respuestas a subsiguientes tratamientos tras una recidiva inicial, y serían considerados como posibles causas de resistencia a citostáticos (193).

#### **I.B.2.3.- Estudios citogenéticos en cultivo de tejidos.-**

Hansido

detectadas anormalidades en el número y morfología de los cromosomas de las células de los tumores pulmonares (61,62,97,194).

Las anormalidades fueron muy variables tanto en pacientes tratados como no. La poliploidía fue la anomalía más frecuentemente observada, en un porcentaje del 50 al 75 % de los casos. El estudio citogenético puede ser un método rápidamente diagnóstico, complementario para detectar metástasis distantes, entre ellas en la médula osea y en el líquido pleural (97).

En cultivos de carcinoma de pulmón de células pequeñas, las alteraciones estructurales más frecuentes estuvieron en los cro-

mosomas 3,1,2 y 10 (61). En el 100 % de metafases hay una deleción del 3p, en al menos un cromosoma 3, que no ha sido detectada en metafases de otros tumores o líneas linfoblastoides. Aunque se propone la deleción 3p (14-23) como anormalidad cromosómica específica adquirida para el carcinoma microcítico, el defecto está presente en las células epiteliales bronquiales, pero sigue por determinarse si permanece en la lesión preneoplásica (61).

También en cultivos tumorales se han estudiado los oncogenes que están implicados en el desarrollo del cáncer de pulmón. El *c-myb* sólo es detectado en el carcinoma pulmonar de células pequeñas, sugiriendo que la presencia de *c-myb* transcrito puede tener un papel específico en la iniciación o mantenimiento de este tumor (62). Este oncogen estaría asociado con la expresión de un fetotipo neuroendocrino (enolasa neuronal específica, isoenzima creatin kinasa, bombesina). Un oncogen *c-myb* transcrito de un carcinoma de pulmón de células pequeñas a un tumor intestinal, se ha demostrado que expresa propiedades neuroendocrinas. El oncogen *v-raf* se ha descrito también transcrito en el carcinoma microcítico, éste debe ser considerado en unión con el *c-myb* (195).

Por otra parte, el oncogen *c-myc* está amplificado en el carcinoma de células pequeñas pero no refundido. Se piensa que el *c-myc* es responsable de las rápidas propiedades de crecimiento

en una subpoblación de variantes de este tumor (105). Estudios recientes han indicado que para la transformación oncogénica de las células diploides normales, se requieren al menos dos alteraciones genómicas que produzcan lesión del DNA, activando dos oncogenes complementarios, a) mutaciones, por ejemplo en el oncogen *c-ras*, b) traslocaciones cromosómicas, tales como aparecen en el linfoma de Burkitt, c) amplificación del oncogen (196). El primero de estos mecanismos altera la estructura de la proteína *c-ras*, los dos últimos pueden meramente incrementar la expresión de un oncogen a menudo inalterado. En las células del carcinoma pulmonar se han encontrado amplificaciones del oncogen *c-myc* o daño mutacional del gen *c-Ki-ras*. Uno puede especular que la amplificación del oncogen no es una lesión obligatoriamente tumorigénica, de tal manera, que en la progresión de algunos tumores se podría desarrollar más tarde (105).

Los estudios del oncogen *c-myc* relacionados con el carcinoma de pulmón de células pequeñas-variante demuestran, que también hay una amplificación de este oncogen, y se sugiere que podría tener un papel en la conversión fenotípica y en el comportamiento maligno del tumor (resistencia a la terapia) (194). No se sabe con seguridad si la amplificación del oncogen *c-myc* está presente en el enfermo, o si se desarrolla en el crecimiento del cultivo celular de un carcinoma de células pequeñas-variante. No obstante, cultivos de esta variedad tomados directamente del

*paciente y que muestran amplificaciones, inducen a pensar que éstas debe ocurrir en el enfermo (194).*

*El carcinoma de pulmón microcítico expresa gran heterogeneidad morfológica, funcional y en el contenido de DNA. Aunque las líneas celulares en cultivo demuestran tener un contenido similar de DNA que el tumor original, no es menos cierto, que existe un evidente conflicto para la estabilidad genética, ya que después de una serie de pases se han comprobado cambios en dicho contenido, desapareciendo algunos clones y emergiendo otros. En otras circunstancias no se producen estos acontecimientos (104). La heterogeneidad tumoral no surge sólo in vitro, también acontece in vivo, lo que sugiere que la evolución tumoral es un proceso dinámico causado, quizás, por la interacción entre subpoblaciones clonales y el medio. Aunque la presión de selección que pueda causar estos cambios en el paciente in vivo (respuesta del huésped, tratamiento, vascularización), pueden ser diferentes de los encontrados in vitro (requerimientos nutricionales, crecimiento y factores inhibidores), el hecho de presentar inestabilidad genética celular, no invalida a los cultivos como modelos experimentales (197). De tal manera que el contenido de DNA de las líneas celulares puede ser usado para monitorización del crecimiento celular y detectar la emergencia de nuevas líneas (104). Empleando este procedimiento también se ha constatado inestabilidad genética y emergencia de algún clon celular en*

*otras variedades histológicas pulmonares (89).*

***I.B.2.4.- Otras aplicaciones del cultivo de tejidos.-***

***I.B.2.4.1.- Valoración de la actividad antineoplásica de sustancias no citostáticas.-***

*Entre ellas tenemos a la vitamina A y análogos, con capacidad de inhibir la formación de colonias tumorales humanas, efecto que es dependiente de la concentración de las mismas, sobre todo en el tejido epitelial (87). No hay diferencias entre ellas y su mecanismo de acción, modificando la respuesta biológica, es desconocido.*

***I.B.2.4.2.- Análisis del comportamiento biológico de las líneas celulares y establecimiento de subgrupos histológicos (carcinoma de pulmón de células pequeñas).***

*El comportamiendo de los distintos grupos que forman el carcinoma pulmonar es diferente de unos a otros. Desde un punto de vista clínico se subdividen en dos grandes grupos : A) carcinoma de pulmón no células pequeñas, compuesto a su vez por el grupo de epidermoides, adenocarcinomas y anaplásicos de células grandes, B) carcinoma pulmonar anaplásico de células pequeñas.*

Como ya se ha dicho anteriormente cada uno se trata de manera diferente, los primeros (A) fundamentalmente con cirugía y los segundos (B) con quimioterapia.

Especial importancia presenta en clínica el segundo grupo, ya que los tratamientos con quimioterapia agresiva pueden curar a determinados pacientes (28).

El comportamiento de los distintos subgrupos que forman, a su vez, esta variedad, muestra oscilaciones notables (102,103, 194,198,199). En la revisión de 1981 de la OMS, el carcinoma de pulmón de células pequeñas se subdivide en los siguientes apartados : a) oat cell, b) intermedio (fusiformes y poligonales), c) combinado, con características de células pequeñas y epidermoide o adenocarcinoma (72). Inicialmente la histología de células pequeñas/células grandes fue incluida en el grupo intermedio. De forma más reciente, la Asociación Internacional para el Estudio del Cáncer de Pulmón, ha propuesto la subdivisión : a) carcinoma de células pequeñas, b) carcinoma mixto de células pequeñas/células grandes, que puede estar asociado con un peor pronóstico y respuesta a la terapia, c) carcinoma de células pequeñas combinado (200).

Algunos autores no encuentran diferencias significativas de respuesta al tratamiento y en supervivencia, entre los dis-

tintos subgrupos de carcinomas microcíticos pulmonares (201). Sin embargo, cuando se independiza la variedad de células pequeñas/células grandes, el índice de respuestas y supervivencias decae considerablemente, siendo de importancia pronóstica la identificación de estos pacientes (199).

Este distinto comportamiento tiene una traducción morfológica, bioquímica y citogenética. El 70 % del grupo lo constituye el carcinoma de células pequeñas clásico (102,197). La histología células pequeñas / células grandes representa entre un 15 y un 30% (102,199), y se le denomina carcinoma de pulmón de células pequeñas variante. A su vez, se subdivide en dos nuevos subgrupos a) líneas celulares variantes bioquímicas, teniendo un perfil bioquímico variante, pero reteniendo la morfología típica del carcinoma de células pequeñas y sus características de crecimiento, b) variante morfológica, que retiene el perfil bioquímico, con morfología de carcinoma indiferenciado de células grandes y características de crecimiento alteradas.

**Características del carcinoma de pulmón de células pequeñas variante:**

- Perfil bioquímico (102,103):

- Pérdida de L-dopa decarboxilasa

- Disminución marcada de enolasa neuronal específica y de la inmunorreactividad a bombesina.

- Retención de la isoenzima cerebral creatin-kinasa

- Estudios citogenéticos:

- Pérdida de la característica anormal 3p- (delección del brazo corto del cromosoma 3(14-23)) (198). Otros autores no encuentran estos hallazgos, cuando en cultivo un carcinoma de células pequeñas modifica su morfología a células grandes, aunque pierdan sus características bioquímicas (103).

- Amplificación del oncogen c-myc (102,194)

- Crecimiento in vitro:

El crecimiento del carcinoma de pulmón de células pequeñas es bajo la forma de agregados flotantes fuertemente empaquetados, como esferoides o masas amorfas con falta de adhesividad al substrato (158). Las formas variantes crecen con una unión más laxa y alguna adherencia al substrato. El tiempo de duplicación es más corto para la forma variante (32 horas frente a 80 horas) y, asimismo, la eficacia clonogénica es superior para la variante (14% frente a 2%) (102).

- Mayor resistencia a los tratamientos in vitro e in vivo tanto de radioterapia como de quimioterapia (102,103,198,199).

Por consiguiente, el subgrupo variante de células pequeñas/células grandes parece representar una entidad transicional, con implicaciones de biología celular y clínicas concretas.

**I.C.- ANALISIS COMPARATIVO ENTRE DISTINTOS SISTEMAS DE CULTIVO IN VIVO E IN VITRO Y EL METODO DE KERSTING, APLICADO A LAS NEOPLASIAS EPITELIALES MALIGNAS PULMONARES.-**

**I.C.1.- VENTAJAS.-**

El método de Kersting utilizado para crecimiento de distintos tumores in vitro, en teoría, presenta dos grandes ventajas frente a otros :

a.- No exige una disgregación celular previa, evitándose así el daño celular originado por los diferentes métodos mecánicos o enzimáticos (76,129,131,132,133,134,135,136), que dan lugar a una serie de células más o menos desvitalizadas (89,90,98,124,129), y baja rentabilidad de éxitos en el cultivo.

b.- Se planta todo el fragmento tumoral, por consiguiente, hay mayor probabilidad de que en éste queden

*incluidos más representantes de toda la población heterogénea del tumor, es decir, no existe selección de poblaciones celulares (40).*

*De todos los sistemas de cultivo se hacen implantes de auténticos fragmentos tumorales, tan sólo en el 38% de los efectuados in vivo (46,56,112, 146,162,164). En estos casos, el tamaño del espécimen es algo superior al empleado por nosotros (menos de 1 mms<sup>3</sup>, frente a los 2 o 3 mms<sup>3</sup> en xenografías). En todas las demás ocasiones se han implantado células después de la disgregación de un tumor sólido, o tras la recolección y centrifugación de exudados, es decir, se ha producido una modificación de la heterogeneidad del tumor.*

#### **I.C.2.- RENTABILIDAD.-**

*La rentabilidad del crecimiento medio con el método de cultivo de tejidos de Kersting fué del 58.5%.*

*En las tablas VI y VII, respectivamente in vitro e in vivo, se hace un resumen de los índices de crecimiento de los carcinomas pulmonares considerados globalmente (todas las histologías). Se aprecia una menor rentabilidad para el cultivo in vivo.*

TABLA VI

## CULTIVO "IN VITRO"

año	Autor	%crecimiento	ref
1973	Giard	46%	88
1981	Salmon	50-60%	126
1981	Von Hoff	82-100%	111
1982	Kern	73%	38
1982	Kitten	66%	107
1983	Carney	64-74%	104
1985	Shoemaker	21%	128
1986	Brower	75-83%	82
1986	Von Hoff	63%	54

Rango 21-100%

Media 62,5 %

Tabla VII

## CULTIVO "IN VIVO"

---

Año	Autor	% crecimiento	ref
1976	Shisamoto	47%	55
1980	Fogh	45-50%	145
1981	Sorenson	71%	158
1985	Mattern	44%	91

---

Rango 44-71%

Media 52.3%

### **I.C.3.- CARACTERISTICAS COMPARADAS DEL METODO DE KERSTING.-**

Nuestro índice de crecimiento, considerado globalmente, está dentro de la media señalada por los distintos autores (40), si bien, más próximo a los rangos inferiores. Por lo tanto, aunque podría considerarse como un método sensible, en realidad no lo es por las razones que discutiremos más adelante.

Así, en las tablas VIII y IX se registran los distintos porcentajes de crecimiento de las diferentes variedades histológicas del carcinoma de pulmón in vitro e in vivo. En primer lugar llama la atención la gran disparidad de resultados de unos autores a otros, incluso dentro del mismo grupo histológico. Pero lo más significativo es el distinto comportamiento de éstos, según que el método de cultivo sea in vivo o in vitro, en las variedades tumorales de células pequeñas y células grandes. Bajando la media para los primeros del 71.7% in vitro, al 53.6% in vivo. Del mismo modo, en el grupo de células grandes, la media de crecimiento de in vitro a in vivo desciende del 73.8% al 57.8%. ¿ Serían indicio semejantes diferencias de la mejor adaptación de estos carcinomas al crecimiento in vitro ?.

TABLA VIII

Resumen de los resultados descritos en la literatura del crecimiento del carcinoma pulmonar cultivado in vitro, según el tipo histológico

CARCINOMA ANAPLASICO DE CELULAS PEQUEÑAS

Año	Autor	Porcentaje de crecimiento	Referencia
1977	Hamburger	100%	51
1980	Carney	93%	98
1981	Carney	85%	93
1981	Gazdar	83%	100
1981	Pollard	9-100%	86
1981	Von Hoff	62%	90
1982	Kitten	65%	107
1983	Von Hoff	50%	54
1985	Douple	25%	119
1986	Engelholm	100%	162

Rango 25-100%

Media 71.7%

Tabla VIII (continuación)

## CARCINOMA EPIDERMOIDE

Año	Autor	Porcentaje de crecimiento	Referencia
1980	Pavelic	40%	76
1980	Pavelic	50%	99
1981	Von Hoff	72%	90
1982	Kitten	59%	107
1983	Von Hoff	56%	54
		Rango 40-72%	
		Media 55.4%	

## ADENOCARCINOMA

1980	Pavelic	67%	76
1980	Pavelic	60%	99
1981	Carney	66%	93
1981	Von Hoff	50%	90
1982	Kitten	63%	107
1983	Von Hoff	67%	54
		Rango 50-67%	
		Media 62.1%	

TABLA VIII (continuación)

## CARCINOMA ANAPLASICO DE CELULAS GRANDES

Año	Autor	Porcentaje de crecimiento	Referencia
1980	Pavelic	80%	76
1981	Von Hoff	85%	90
1982	Kitten	90%	107
1983	Von Hoff	100%	54
1986	Cole	14%	94

Rango 14-100%

Media 73.8%

## CARCINOMA "INDIFERENCIADOS" no tipificados

1982	Kitten	74%	107
------	--------	-----	-----

MEDIA GLOBAL 67.4%

TABLA IX

Resumen de los resultados descritos en la literatura del crecimiento del carcinoma pulmonar cultivado in vivo, según el tipo histológico

CARCINOMA DE CELULAS PEQUEÑAS

Año	Autor	Porcentaje de crecimiento	Referencia
1975	Kopper	55%	164
1976	Shimosato	66%	56
1980 a y b	Shorthouse	29%	146,167
1981	Carney	88%	93
1981	Gazdar	45-86%	100
1983	Steel	83%	147
1985	Mattern	38%	91
1986	Engelholm	50%	162
1986	Fergusson	30-35%	46

Rango 29-88%

Media 53.6%

TABLA IX (continuación)

## CARCINOMA EPIDERMOIDE

Año	Autor	Porcentaje de crecimiento	Referencia
1976	Shimosato	50%	56
1978	Giovanella	83%	114
1980 a y b	Shorthouse	32%	146-167
1981	Sorenson	54%	158
1983	Steel	65%	147
1985	Mattern	51%	91
1986	Fergusson	56-70%	46

Rango 32-83%

Media 53.7%

TABLA IX (continuación)

## ADENOCARCINOMAS

Año	Autor	Porcentaje de crecimiento	Referencia
1976	Shimosato	42%	56
1980 ay b	Shorthouse	48-49%	146-167
1981	Carney	88%	93
1983	Steel	100%	147
1985	Mattern	43%	91
1986	Fergusson	45-75%	46

Rango 42-100%

Media 61.4%

TABLA IX (continuación)

## CARCINOMA ANAPLASICO DE CELULAS GRANDES

Año	Autor	Porcentaje de crecimiento	Referencia
1980 a y b	Shorthouse	64-65%	146-167
1983	Steel	75%	147
1985	Mattern	38%	91
1986	Cole	80%	94
1986	Fergusson	25%	46

Rango 25-80%

Media 57.8%

MEDIA GLOBAL 56.8%

Por el contrario, los adenocarcinomas y carcinomas epidermoides mantienen una media de crecimiento similar con los dos sistemas de cultivo, alrededor de un 60% y un 55% respectivamente. La tasa media global sigue mostrando una menor rentabilidad del sistema de cultivo in vivo .

El crecimiento de nuestros explantos fue (cuadro número 1): epidermoides, 62 %, adenocarcinomas, 68.7%, carcinomas de células pequeñas, 50%, carcinomas de células grandes, 50%, carcinomas "indiferenciados", 30%. En efecto, cifras muy similares a las medias registradas en cultivos in vitro para los carcinomas epidermoides y adenocarcinomas, pero nada próximas a las de células pequeñas (71.7%), células grandes (73.8%), o carcinomas "indiferenciados" (74%). Quizás en estos tres últimos, las discrepancias se puedan acentuar por el escaso número de cultivos efectuados de cada uno en nuestro laboratorio.

Con todo, el método de Kersting, aunque permite el crecimiento de tumores pulmonares, éste es poco intenso, resultando difícil el desarrollo de colonias tumorales (mayor de 20 a 50 células), y distanciándose más si nos ajustamos a la definición de crecimiento (más de cinco colonias por "n" células plantadas), no olvidemos que plantamos fragmentos tumorales. De este modo el

crecimiento en todas las variedades histológicas es inferior al 25% de los explantos (epidermoide 18,9%, adenocarcinoma 23,4%, células pequeñas 16,3%, células grandes 21,4%, "indiferenciados 10.5%), (Figuras 20,21,22,23,24,25).

La intensidad, expresada cualitativamente en cruces de una a tres (escasa, media e intensa), en general fue escasa (del 50 al 80 % de los casos). Por estas razones consideramos el método como poco intenso.

De otra parte, el desarrollo tumoral en los medios de cultivo, origina un crecimiento celular que conserva la mayoría de las características morfológicas, citogenéticas, funcionales, etc. de los tumores humanos (115,119,127,147). Sin embargo, con el método de Kersting no siempre es reconocible la neoplasia que crece en el medio, por consiguiente es un método poco fiel.

El crecimiento tumoral, cuando acontece, surge a los pocos días del implante. Así, se pone de manifiesto en el primer tubo, (al tercer día del explanto) en el 74.8%. Representa un desarrollo tumoral algo más rápido que otros métodos de cultivo *in vitro* (más del 65% entre 2 y 3 semanas) (39,51, 87,108), o *in vivo* (más del 90% entre 2 y 4 semanas) (41,46,94,121,147,150). Por estas razones es un método precoz.

Si bien el crecimiento tumoral surge a los pocos días del inicio del cultivo, éste se agota rápidamente, pues en ningún caso supera el décimo tubo (30 días), y sólo la mitad de los cultivos logran alcanzar tres semanas (51% crecen en el octavo tubo) (Figs. 15 y 16). Señalaremos que no se pretendió obtener ninguna línea de cultivo tumoral. Con todo, la desventaja es notoria con el resto de los sistemas de cultivo (41,42,43,82,89, 91,94,96,99,102,107,110, 145). Habrá que afirmar que nuestro método es de corta duración.

Los requerimientos de tiempo, personal y presupuesto en nuestro sistema de cultivo no son importantes. Un solo encargado puede poner en práctica el cultivo, cuyo coste, a su vez, supone pocos gastos (medio de cultivo, tubos de ensayo, estufa). En este sentido es un método económico frente a otros cultivos *in vitro*, (transporte, recolección, viabilidad), o *in vivo*. No obstante, la relación eficacia-coste de este método es francamente adversa en comparación a los otros sistemas de cultivo.

Para finalizar, el método de Kersting no es selectivo, pues permite no sólo el crecimiento tumoral, sino el de otros elementos celulares tales como fibroblastos, histiocitos y células de tejido pulmonar normal (Fig 15,16,17,18,19,27). Especial interés tiene el desarrollo de fibroblastos, que de forma inicial es un hecho común en la mayoría de los cultivos líquidos (41,95), éste

parece ser de utilidad para el establecimiento de líneas celulares tumorales por actuar como un alimentador de placa (162), representando un 5% de las células originales plantadas (113). Los fibroblastos suelen ser eliminados completamente después del primer subcultivo de forma espontánea (96,113), éstos no constituyen una amenaza para el cultivo tumoral salvo las formas muy exuberantes, controlándose fácilmente por la adición al medio de colagenasa (41,158). También si se añade medio de cultivo HITES, selectivo para el carcinoma de pulmón de células pequeñas, se provoca la desaparición de las células del estroma tumoral en 7 a 10 días (104). Otro mecanismo, que concede a las células neoplásicas una ventaja selectiva sobre las normales y los fibroblastos, son los implantes tumorales en agar semisólido (51,126), procedimiento no permisivo para el desarrollo de células no malignas (98).

Nuestro método de cultivo no fue selectivo como hemos señalado con anterioridad, apareciendo en los explantos células no tumorales: fibroblastos, histiocitos y células pulmonares normales. El desarrollo fibroblástico tiene especial interés por su frecuencia, 85% de los cultivos, por su intensidad, dos o más cruces en la mitad de las ocasiones, por su precocidad, apareciendo entre el tercero y el sexto día de cultivo en el 63 % de los casos, por su persistencia, se mantiene casi cuatro semanas en el 64,7% de los tumores cultivados, y frecuentemente

sobreviven a la extinción del desarrollo tumoral (Fig 27).

#### **I.C.4.- CONSECUENCIAS.-**

Para finalizar, hay que señalar que la baja rentabilidad de este sistema de cultivo puede deberse a varias razones:

- El propio medio de cultivo líquido (medio 199 modificado), no necesariamente el más idóneo para neoplasias pulmonares (HITES, RPMI 1640, etc).

- Los fragmentos implantados podrían ser demasiado grandes para permitir emigraciones tumorales, así como una adecuada nutrición y oxigenación celular.

- El desproporcionado desarrollo fibroblástico sería capaz de ahogar o inhibir el crecimiento tumoral, complicando aún más las posibilidades de emigración, nutrición y oxigenación de las propias células tumorales.

Por todo lo referido en páginas anteriores, el método de cultivo líquido de Kersting aplicado a carcinomas pulmonares, produce una baja rentabilidad de crecimiento, tanto por su frecuencia como por su intensidad. Aunque es un método económico con desarrollo precoz de células tumorales y normales, es poco fiel,

*de corta duración, con una relación eficacia/coste baja, y, sobre todo, no es selectivo. De tal manera que el empleo de este método de cultivo in vitro en los carcinomas de pulmón se podría desestimar, por carecer de utilidad para estudios morfológicos, de quimiosensibilidad o para ensayos de biología tumoral.*

## II.- CULTIVO DE NEOPLASIAS NO EPITELIALES PULMONARES

En este apartado no se discutirán las formas neoplásicas en las que no se ha obtenido crecimiento. Los hamartomas pulmonares, cuyos explantos estaban integrados exclusivamente por material cartilaginoso y en los que no se obtuvo crecimiento, probablemente por la dificultad de emigración de las células del explanto, como es común en las neoplasias cartilaginosas. Además, los mesoteliomas epiteliales cuya forma de crecimiento no se distinguió especialmente de las neoplasias epiteliales y cuyos hallazgos no ofrecen datos de interés específico para comprender su histogénesis.

### II.A.- TUMORES MESOTELIALES .-

#### II.A.1.- MESOTELIOMAS MONOFASICOS MESENQUIMALES.-

##### II.A.1.- "Mesoteliomas fibrosos".-

El llamado mesotelioma fibroso benigno fue considerado como una neoplasia de origen mesenquimal aunque de morfología fibroblástica tras del trabajo de cultivo tisular de Murray y Stout (65). Dichos autores cultivaron una neoplasia primariamente pleuropulmonar que en histología convencional mostraba una imagen compatible con un fibro o leiomiomasarcoma. Este tumor, que presentó un curso clínico maligno, fue

estudiado *in vitro* obteniéndose una imagen similar a la descrita por Maximow en los cultivos de pleura normal e inflamada (202). En el cultivo se encontró, por una parte un crecimiento de elementos fusiformes de aspecto fibroblástico, por otra de células poligonales que se adosaban unas a otras lateralmente, formando un tapiz semejante, o muy parecido, a los que constituyen las células y los tumores epiteliales cultivados en las mismas condiciones. Estos autores consideraron que el patrón de crecimiento *in vitro*, era expresión de la doble capacidad diferenciativa de los elementos mesoteliales, en parte como fibroblastos, en parte como epitelio, y que por lo tanto el tumor correspondía a un mesotelioma monofásico de expresión puramente fibrosarcomatosa. Posteriormente, en una serie de trabajos Stout consideró, sin cultivar ningún caso más, que las variantes de tumor fusiforme benigno de aspecto óptico fibroblástico, localizadas en el peritoneo y en la pleura, correspondían a la variante benigna de dicha tumoración y, por lo tanto, fueron denominados por él "mesoteliomas fibrosos benignos" (203,204). La opinión de estos autores, sustentada en una tecnología prácticamente utilizada por ellos de manera exclusiva, se mantuvo sin crítica durante años.

La aplicación de la microscopía electrónica se realizó bajo dicha influencia. Esta puede ser la justificación de los resultados aparentemente discordantes obtenidos de los estudios ultraestructurales, los cuales incluyen un total de 47 casos del

llamado "mesotelioma fibroso benigno", (Hernandez y Fernandez 1 caso (205), 2 casos, Osamura, (206), 1 caso, Kawai, (207), 6 casos, Dalton y cols., (208), 3 casos, Briselli, Mark y Dickersin, (209), 4 casos, Burring y Kanstendieck, (210), 5 casos, Dervan, Tobin y O'Connor, (211), 2 casos, Keating y cols, (212), 2 casos, Carter y Otis, (213), 1 caso, El Nagaar y cols, (214), 6 casos, England, Hochholzer y McCarthy, (215), 15 casos). En 38 de ellos, los tumores aparecieron compuestos por células de morfología fibroblástica, de conformación elongada, con abundante retículo endoplásmico rugoso y sin lámina basal externa ni microvellosidades. En los casos referidos por Kawai y cols. (207) y en uno de los casos publicados por Briselli y cols (209), se identificaron uniones intercelulares primitivas y una morfología celular global sugestiva de diferenciación mesotelial o "transicional" entre células mesoteliales y fibroblásticas. Kawai y cols. (207) encontraron en las células neoplásicas de las áreas más celulares un aspecto ultraestructural muy similar al de las células que limitan las cavidades intratumorales, que para ellos también tienen un origen neoplásico.

Los estudios inmunohistoquímicos en dicha variante tumoral, han demostrado una negatividad constante para el antígeno de la membrana epitelial y el antígeno carcinoembrionario, así como para marcadores histiocíticos (alfa 1 antitripsina, alfa 1 antiquimotripsina y lisozima), para el antígeno relacionado con

el factor VIII de la coagulación y para todo tipo de filamentos intermedios con la excepción de la vimentina, que da una tinción sistemáticamente positiva en todos los casos (212,213).

Sin embargo, el análisis de los casos publicados con estudio ultraestructural permite afirmar, que en la mayoría de los mismos las células muestran un aspecto sugestivo de una estirpe exclusivamente fibroblástica (morfología fusiforme, abundante retículo endoplásmico rugoso, ausencia de uniones intercelulares y de lámina basal, mínimas expansiones citoplásmicas). Esta morfología es la que se describe en todas las publicaciones, salvo en cuatro (un 50%) de la serie de Briselli (209). En éstos, basándose sólo en la existencia de las prolongaciones citoplásmicas citadas, los autores defienden una génesis mesotelial, en tanto que, en la otra mitad, la ausencia de prolongaciones y de unos rasgos ultraestructurales similares a los descritos, sugerirían un fenotipo fibroblástico. La concordancia entre los datos inmunohistoquímicos y los ultraestructurales es pues completa en la mayoría de las ocasiones.

Tienen por consiguiente, especial importancia los hallazgos de cultivo tisular en los dos casos que se incluyen en esta serie, uno de los cuales ha sido referido previamente (216). En ambos, se obtuvo un crecimiento típicamente fibroblástico, con células fusiformes, que sin tendencia a la asociación ni a la

*transformación en elementos planos de aspecto pseudoepitelial, emigraron radialmente desde el explanto, de la misma manera y con la misma morfología que lo hacen los elementos tumorales de las fibromatosis, fibromas, fibrosarcomas y fibroblastos no tumorales de diferentes orígenes.*

*Parece, por tanto, que se puede considerar, dada la concordan-  
cia general de los hallazgos obtenidos mediante inmunohisto-  
química, el estudio ultraestructural y los aportados por el cul-  
tivo tisular (ampliación del estudio inicial de Murray y Stout  
como se comentará más adelante), que el llamado mesotelioma  
fibroso benigno corresponde a una variante de tumor fibroblástico  
benigno, mejor denominado fibroma pleural o tumor fibroso pleural  
benigno. La descripción de variantes intrapulmonares (217), me-  
diastínicas (218) o en otros órganos extratorácicos como el híg-  
ado (219), la fosa nasal (220) o la túnica vaginal del testículo  
(221), obligan incluso a poner en entredicho el calificativo de  
"pleural".*

#### **II.A.2.-Mesoteliomas fibrosarcomatosos.-**

*Las referencias  
bibliográficas al cultivo de tejidos de mesoteliomas fibrosar-*

comatosos se reducen a tres casos previos: el comentado anteriormente de Murray y Stout (65), el caso publicado por Sano Weiss y Gault (222) y el referido por Alvarez Fernández y Diez Nau (216). Las tres neoplasias, constituidas íntegramente por elementos fusiformes indistinguibles en base a la morfología óptica de un fibrosarcoma o de un leiomioma, crecieron *in vitro* como una doble población celular: unos elementos fusiformes y otros poligonales agrupados en una placa pseudoepitelial con transiciones entre una y otra.

En nuestro caso se ha comprobado además otro hecho no descrito, que es la existencia en el seno de la masa tumoral de islotes de elementos de mayor cohesividad, con glucógeno intracitoplásmico, llegando en algunos puntos a constituir pequeñas cavidades pseudoglandulares. En estos acúmulos en placa no se observan fibras de reticulina, y la imagen global es concordante con una estructura bifásica. La no identificación de estas placas en el estudio ultraestructural, no permite aseverar su naturaleza neoplásica y excluir por tanto, con total seguridad, que correspondan a islotes de mesotelio incluido.

La ultraestructura de dichas tumoraciones no ofrece datos absolutos que puedan aclarar la histogénesis o el fenotipo del tumor. Los escasos trabajos publicados (205,209,211,212,213,214,219) demuestran en las células características fibrosarcomatosas, con una conformación fusiforme, sin complejos de unión y

con abundante retículo endoplásmico rugoso.

El cultivo de tejidos es, sin embargo, de la máxima utilidad en su identificación. La explantación de masas de elementos fusiformes produce, sorprendentemente, el crecimiento de placas de elementos poligonales apreciablemente cohesivos, que forman un tapiz continuo alrededor de explanto o, en otras ocasiones, constituyen áreas de crecimiento en placa, que alternan con otras donde éste se realiza a expensas de elementos fusiformes, que emigran con disposición radial. Este patrón es sumamente precoz y se observa a partir de los primeros momentos en que aparece el crecimiento. Por otra parte, cuando se compara dicho patrón de crecimiento con el que se obtiene en el cultivo de pleura normal, sinovial normal y sarcomas sinoviales, se comprueba una absoluta similitud entre los tres.

Parece razonable, sin embargo, el intentar validar de alguna forma los hallazgos del cultivo tisular, con las técnicas de estudio morfológico disponibles en este momento, a pesar de que la morfología del comportamiento *in vitro* ha sido el único apoyo racional de las hipótesis sobre la histogénesis, tanto de los mesoteliomas mono y bifásicos como de los sarcomas sinoviales.

Los estudios ultraestructurales de mesoteliomas pleurales de estructura exclusivamente fibrosarcomatosa son también

escasos. Kay y Silverberg (224), refirieron un caso de una neoplasia de estructura óptica característica, en la que se observaron ultraestructuralmente unos elementos neoplásicos cohesivos, cuyas membranas citoplásmicas discurrían paralelamente durante trayectos largos de la superficie celular, con un número escaso de uniones intercelulares de tipo primitivo, sin microvilli y con tractos de material electrondenso adosados a la superficie de las células, que ellos interpretaron como lámina basal. Klima y Bossart (225) han referido 10 casos de mesotelioma maligno pleural de estructura óptica sarcomatosa. Estos autores, tras del estudio de la serie, que es la más larga referida hasta la fecha, encontraron, en ocho de sus casos, rasgos sugerentes de diferenciación epitelial, consistentes en la presencia de uniones intercelulares de carácter primitivo, el desarrollo de microvellosidades abortivas y la tendencia a formar agregaciones acinares mal definidas en áreas que, en los cortes semifinos, mostraban una morfología sarcomatosa. Es de importancia el hacer constar que los dos casos restantes expresaron rasgos ultraestructurales de diferenciación muscular lisa. Este hallazgo habla a favor de que el grupo de tumores fusocelulares pleurales, sea en realidad más heterogéneo de lo previsible e incluya fibro y leiomiosarcomas, fibrohistiocitomas malignos (226) y otras entidades como se discutirá más adelante. England, Hochholzer y McCarthy (215) han referido otra serie de veintidós casos de tumores malignos fibrosarcomatosos, encontrando filamentos cito-

plásmicos en uno de cada cinco casos, uniones intercelulares primitivas tipo zónula ocludens y zónula adherens, o más rara vez, desmosomas pentalaminares bien constituidos en la mayoría de los casos (20/23), y en dos más, material similar al de la lámina basal distribuido alrededor de las células.

Tiene importancia también la comparación con algún caso aislado de mesotelioma extrapulmonar, con características ultraestructurales similares a las referidas, como el publicado por Fukuda y cols. (227). Estos autores encontraron en una tumoración fusocelular maligna pericárdica uniones intercelulares, filamentos intracitoplásmicos y tractos discontinuos de lámina basal.

Todos estos hallazgos están en concordancia con los de nuestra serie. En ella, en dos de los cuatro tumores cultivados, el estudio ultraestructural del tejido demostró tractos discontinuos de lámina basal adosada a la superficie de la célula, generalmente en relación con áreas de densificación de la membrana que recuerdan hemidesmosomas, y además, en uno de estos dos casos, agregados de aspecto más granular y grosor superior al habitual en la lámina basal, que englobaban células o grupos celulares completos. La primera posibilidad es superponible a la hallada en los sarcomas sinoviales monofásicos, la segunda a la hallada en los liposarcomas. Además, en los cuatro casos se encontraron uniones intercelulares primitivas, así como una tenden-

cia de las células a la agrupación, formando pequeños haces o grupos en los que las membranas seguían un curso paralelo, separados por áreas de menor densidad electrónica correspondientes a matriz extracelular. Puede afirmarse por tanto, que el mesotelioma maligno sarcomatoso muestra rasgos electronmicroscópicos que sugieren fuertemente su naturaleza mesotelial, aunque no permitan aseverarla con total seguridad. El interés de nuestros hallazgos creemos reside en el hecho de la comprobación, en tumores cultivados, de resultados acordes a los de las descripciones originales, de rasgos ultraestructurales descritos por otros grupos de trabajo y en los que se ha encontrado el apoyo morfológico a la hipótesis inicial.

También tiene interés el señalar en este momento, que la ultraestructura de las células cultivadas no aporta datos relevantes para la discusión precedente, siendo de resaltar que las células no muestran una morfología que permita atribuir una histogénesis distinta a nuestros casos.

La introducción de la inmunohistoquímica en el estudio de estas neoplasias, ha aportado un enriquecimiento a los datos anteriores. En la mayoría de los trabajos en los que se ha intentado la demostración de marcadores epiteliales, muy especialmente citoqueratinas, en sarcomas supuestamente mesoteliales de la cavidad pleural, los resultados han sido negativos (215,228,229).

*Sin embargo, Carter y Otis (213) y Cagle y cols. (230) han referido 8 y 3 casos de mesoteliomas sarcomatosos reactivos para queratinas de bajo peso molecular. Estos hallazgos se confirman parcialmente en nuestra serie, si bien en ella sólo un caso mostró una positividad muy focal para queratina. La diferencia de reactividad entre distintas publicaciones, puede ser interpretada como indicativa de una mejor técnica de estudio, circunstancia que no puede dejar de ser tomada en cuenta y que probablemente es un factor importante para justificar las discrepancias. También puede interpretarse como un hecho real, de manera que la negatividad o positividad de los diferentes casos, sea simplemente expresión de la densidad de filamentos intermedios intracitoplásmicos demostrables mediante ultraestructura. Ambos hechos pueden ser justificación suficiente de la diferente reactividad en series distintas.*

*De acuerdo con lo anteriormente expuesto se puede establecer la hipótesis del siguiente esquema histogenético, que completa lo sugerido por Klima y Gyorkey (231) y por Carter y Otis (213) (Tabla X).*

TABLA X

## Tumores benignos

**"FIBROMA PLEURAL"**

(con formas intrapulmonares  
mediastínicas y extratorácicas)

ME.- Fibroblastos

IH.- K -

V +

CT.- Crecimiento monofásico  
fibroblástico

**"MESOTELIOMA FIBROSO BENIGNO" ?**

(entidad hipotética de  
demostración pendiente)

ME.- ?

IH.- Queratina + ?

Vimentina + ?

CT.- ?

## Tumores malignos

**FIBROSARCOMA PLEURAL**

(formas primarias y formas  
secundarias a malignización  
de fibroma pleural)

ME.- Fibroblastos

IH.- K -

V +

CT.- Crecimiento monofásico  
fibroblástico

**MESOTELIOMA SARCOMATOSO**

(formas primarias y formas  
secundarias ? a malignización  
de "MFB")

ME.- Rasgos sugerentes de

origen no fibroblástico y  
sí mesotelial)

IH .- Keratina +

Vimentina +

CT.- Crecimiento bifásico  
"mesotelial".

## II.B.- "ANGIOMAS ESCLEROSANTES".-

El término angioma esclerosante pulmonar fue acuñado por Liebow y Hubbel (232) para describir una serie de neoplasias pulmonares de curso benigno, situación periférica y aparición generalmente en mujeres, que están compuestas por tres componentes diferenciados a.- proliferación vascular, b.- áreas de esclerosis, c.- áreas de hemorragia. La conjunción de los tres criterios, de los cuales el primario era, en opinión de sus primeros descriptores, la proliferación vascular, daba lugar al cuadro histológico final, variable según el predominio de cada uno de los tres factores señalados. Este mostraba una cierta semejanza con los angiomas cutáneos con tendencia a la fibrosis espontánea, y con la variante de fibrohistiocitoma cutáneo, que en aquél momento era interpretado como una forma de éstos. Por este motivo recibió el nombre de angioma esclerosante, fibrohistiocitoma o xantoma pulmonar (232).

Si bien debe reconocerse a los autores originales el mérito del reconocimiento de este grupo de tumores como una entidad nosológica diferenciada, debe atribuirseles, al mismo tiempo, el confusionismo creado en la interpretación de su histogénesis y en su diferenciación con otros grupos de neoplasias. En efecto, la consideración de dicho tumor como una forma de proliferación celular mesenquimal endotelial, a la que se añadían otras variantes

celulares de manera reactiva a la hemorragia, (histiocitos, fibroblastos, linfocitos, células plasmáticas etc), hizo que durante un largo periodo de tiempo no fuera diferenciado de los pseudotumores inflamatorios pulmonares (granulomas de células plasmáticas).

En cuanto a la interpretación de su histogénesis, ya desde los primeros trabajos tras su descripción, llamó la atención de los investigadores la existencia de una proliferación de células de contorno poligonal, citoplasma claro y núcleo redondeado, sin atipias ni mitosis, que en parte bordeaban algunas de las cavidades supuestamente vasculares, formaban papilas o crecían como masas sólidas englobadas en mayor o menor medida en las áreas de esclerosis.

Estas células, tan abundantes que pueden conferir al tumor en campos una apariencia "pseudoadenomatosa", fueron estudiadas mediante microscopía electrónica. Si bien en los primeros trabajos se creyeron reconocer en ellas rasgos endoteliales (apoyo en una basal, cuerpos densos intracitoplásmicos sugerentes de cuerpos de Weibel-Palade) (233,234), en otros posteriores fueron consideradas de manera prácticamente unánime como de tipo epitelial. A pesar de que sus rasgos ultraestructurales no permitían establecer de qué tipo celular se trataba, la mayoría de los autores se inclinaban por una célula bronquiolo alveolar indiferenciada, no tipificada (235,236,237,238,239,240,241).

Los trabajos sucesivos de Katzenstein y colaboradores (242,243) supusieron un cambio importante en la concepción de dicho tumor. Por una parte, el estudio de una serie anatómico-clínica muy amplia permitió el establecimiento, de manera precisa, de sus rasgos biológicos generales, describiéndose las formas conectadas con la superficie pleural y las formas múltiples. Por otra parte, el empleo de métodos de análisis bioquímicos y ultraestructurales, permitió demostrar a estos autores la presencia de ácido hialurónico en el tumor, y la observación de células aparentemente transicionales entre los elementos poligonales descritos y otros de conformación más fusiforme, incluidos en el estroma y también englobados en lámina basal, que se interpretaron como formas transicionales de epitelio a mesénquima. Ambos hechos unidos a casos con conexión pleural y a la existencia en otros territorios, como el peritoneo o la albugínea testicular, de mesoteliomas monofásicos epiteliales de morfología papilar, llevaron a dichos autores a emitir la hipótesis de que el tumor era en realidad una forma de mesotelioma pleural, monofásico y de curso benigno, con diferenciación epitelial exclusiva.

La situación quedaba planteada pues como dos posibilidades. El angioma esclerosante pulmonar verosímilmente no era una neoformación de origen vascular, debatiéndose éste entre dos posibilidades, una mayoritariamente mantenida por los estudios

ultraestructurales, de que se trata de una neoplasia de origen epitelial bronquioloalveolar, o bien otra, más minoritaria, de que era una tumoración de origen mesotelial, según el criterio, aparentemente mejor fundado, que deriva de los estudios anatómicos, bioquímicos y ultraestructurales.

Dada la importancia que el cultivo tisular a corto plazo ha tenido en la identificación de las neoplasias mesoteliales, antes de la introducción de los métodos histoquímicos e inmunohistoquímicos, era posible esperar que en el caso del angioma esclerosante, el cultivo de tejidos produjera algún dato de valor para aclarar su histogénesis, máxime teniendo en cuenta su elevada madurez histológica. Sin embargo, en nuestros tres casos cultivados, si bien han tenido un patrón de comportamiento homogéneo, de éste no se pueden deducir datos para la interpretación de la histogénesis. Los tumores han mostrado el crecimiento de una serie de elementos de morfología fusocelular o estrellada interrelacionados, formando una red. Estos elementos nunca confluyeron cambiando su morfología y formando una placa epitelial, como hemos descrito que ocurre en los mesoteliomas y en los cultivos de mesotelio, por lo que las interpretaciones del hecho pueden ser reducidas a dos, la muy improbable de que correspondan a fibroblastos, histiocitos o células endoteliales, que en el caso concreto de estas neoformaciones muestren una morfología *in vitro* diferente a la que presentan en otros tumores de histogénesis y

estructura más claras, o bien a un crecimiento auténtico de elementos "parenquimatosos" tumorales, es decir de las células "claras", en cuyo caso éstas mostrarían un patrón *in vitro* característico, pero que no es útil para identificar su estirpe.

A este respecto, la única salida posible residiría en la utilización de marcadores neumocitarios o mesoteliales para su identificación en cultivo. En el tumor originario los marcadores endoteliales utilizados hasta el momento (fostatasa alcalina, ATPasa, antígeno relacionado con el Factor VIII de la coagulación, lectina del *Ulex europaeus* I) han dado todos resultados negativos, por lo que su naturaleza endotelial parece poder ser excluida con total seguridad (244). Por otra parte, el resto de los marcadores inmunohistoquímicos empleados (CEA, diferentes proteínas de la queratina, EMA), no dan resultados sugerentes de un origen mesotelial, especialmente por la negatividad de las tinciones para queratina, y compatibles, aunque no específicos, con un origen epitelial respiratorio modificado, por la positividad focal para la fosfatasa alcalina y la positividad para la vimentina.

La última hipótesis sobre el origen del angioma esclerosante, proviene hasta el momento de la utilización de anticuerpos monoclonales contra la apoproteína del surfactante pulmonar, los cuales han demostrado la existencia de una positividad en dichos

tumores, confirmando, al menos en algunos casos, su naturaleza epitelial neumocitaria ya previamente sugerida (239).

### **II.C.- GRANULOMA DE CELULAS PLASMATICAS.-**

El granuloma de células plasmáticas pulmonar (245), fue discriminado del grupo del angioma esclerosante pulmonar por sus mismos descriptores (246), tras de un periodo en el que en todas las publicaciones, que generalmente correspondían a series cortas, fueran incluidas ambas neoplasias en el mismo grupo.

Con este nombre se describen un grupo de lesiones pulmonares, de crecimiento intraparenquimatoso periférico que puede dar lugar a la infiltración de la pared torácica (247), del mediastino (248,249), de la superficie pleural (250,251), de las estructuras del hilio (252), y excepcionalmente también de la propia luz bronquial (253,254) o vascular (255), con proyección en su interior de mamelones de tejido neoformado. El tumor está compuesto por una proliferación de vasos sanguíneos y de las diferentes estirpes celulares integrantes del exudado inflamatorio, histiocitos (que pueden dominar y producir extensas áreas de aspecto xantomatoso), células plasmáticas, linfocitos, polinucleares y fibroblastos, estos últimos son casi la única variedad celular identificable en las áreas de esclerosis

intensa. Los diferentes componentes citados, que suelen dominar en mayor o menor grado según las áreas o según los casos, son los que han justificado las denominaciones de pseudotumor inflamatorio, fibroxantoma, xantoma, granuloma de células plasmáticas o histiocitoma pulmonar. Se han descrito casos aislados de procesos en los que dominaba la infiltración por células cebadas (256).

Los estudios ultraestructurales no han colaborado de manera substancial al esclarecimiento de su verdadera naturaleza, neoplásica o no (253,257,258,259, 260,261). En todos los casos referidos se han demostrado únicamente la presencia de los elementos ya citados, identificados en microscopía óptica, sin rasgos característicos. Es de resaltar que en ningún caso se ha encontrado, desde el punto de vista ultraestructural, microorganismo alguno.

El predominio de miofibroblastos en ciertas áreas o en tumores completos, ha llevado a Pettinato y cols. (249) a proponer como nueva denominación del proceso la de "tumor miofibroblástico inflamatorio".

El crecimiento *in vitro* de nuestro único caso cultivado, mostró un patrón absolutamente típico y diferenciable de otras neoplasias relacionadas, o con las que hipotéticamente pudiera compartir un mismo origen, especialmente con el angioma escler-

rosante pulmonar y el fibrohistiocitoma maligno pulmonar, así como con neoplasias de estirpe semejante localizadas en los tejidos blandos somáticos.

Este patrón de crecimiento es muy similar al del tejido de granulación, con un curso en tres fases. La primera de emigración de las células inflamatorias presentes en el explanto, fundamentalmente los leucocitos polinucleares. Sigue un segundo momento, en donde la desaparición de estas células emigradas coincidió con la aparición de una doble proliferación de fibroblastos e histiocitos. Una fase final en la que, generalmente en sitios diferentes del explanto o en explantos distintos, se observó un crecimiento de fibroblastos e histiocitos, estos últimos multinucleados y con aspecto involutivo.

Los hallazgos son en general superponibles a los publicados por Sherwin (256) en el caso de granuloma de células cebadas cultivado por él, y parecen por tanto suficientemente fiables como para permitir una discriminación entre este tumor y los grupos de neoplasias citadas.

Por tanto, las características *in vitro* del granuloma de células plásmáticas permiten aseverar su naturaleza inflamatoria, y hacen más adecuado el término "pseudotumor inflamatorio pulmonar".

En relación con esta afirmación, hay que citar los estudios recientes de correlación anatomoclínica de Matsubara y cols. (254), que sugieren un continuo morfológico entre las áreas de neumonía intersticial crónica de carácter focal y el pseudotumor inflamatorio pulmonar, añadiendo un nuevo énfasis a la opinión citada, a pesar de no haberse identificado agente causal por métodos microbiológicos en ninguno de los casos referidos. También, y en relación con la asociación o no del pseudotumor inflamatorio con agentes infecciosos, debe señalarse, que, si bien ésta no se ha descrito en las localizaciones extrapulmonares como la hepática (262), meníngea (263,264), gástrica (265,266), renal (267), ganglionar (268), y retroperitoneal (269,270), sin embargo en el pulmón hay referencias en relación con la fiebre Q (271), así como algún raro caso de lesión pulmonar prácticamente superponible en su morfología óptica al pseudotumor inflamatorio debida a infección por micobacterias ácido alcohol resistentes, no tipificadas por técnicas microbiológicas (272).

**II.D.- NEOPLASIAS MUSCULARES BENIGNAS Y MALIGNAS.-****II.D.1.- Leiomioma.-**

Entre los tumores primarios de composición exclusivamente fusocelular del pulmón, una de las variantes más infrecuentes es el leiomioma, de cual se han publicado hasta el momento unos 70 casos (273,274). Su rareza hace que los estudiados mediante técnicas especiales, sean muy escasos, no habiéndose referido ninguno cultivado y sólomente uno con estudio ultraestructural (273). Desde el punto de vista macroscópico, el leiomioma aparece bien como masas endoluminales capaces de descamar elementos identificables en el esputo (274), o como imágenes numulares periféricas, generalmente asintomáticas y estadísticamente más frecuentes. Nuestro caso y el previamente publicado presentaron rasgos ultraestructurales similares, con filamentos intermedios con cuerpos densos, hemidesmosomas, tractos discontinuos de lámina basal y núcleos indentados similares a los encontrados en leiomiomas de otras localizaciones (275).

La morfología del crecimiento in vitro en nuestro caso, así como el estudio ultraestructural, no fueron característicos de este tipo de tumores, al identificarse exclusivamente elementos de tipo fibroblástico y no musculares lisos. No podemos establecer por tanto, en base al presente trabajo, ningún tipo de criterio útil en el diagnóstico diferencial entre el leiomioma

pulmonar genuino, los sarcomas genitales de bajo grado metastatizantes en el pulmón y otras proliferaciones musculares del tracto respiratorio inferior.

#### **II.D.2.- Leiomiosarcoma.-**

Dentro del grupo de los sarcomas pulmonares son excepcionalmente raros los de origen muscular, tanto liso como estriado. Los leiomiosarcomas pulmonares identificados mediante estudio ultraestructural se reducen a cuatro casos (276, 277, 278, 279). Nuestro caso ofrece además como dato de interés, la acusada transformación mixoide presente en extensos campos, que se acompaña de un aspecto relativamente inocente, con baja celularidad y escasas figuras divisionales. Este aspecto lo hace superponible al del llamado leiomiosarcoma mixoide del área genital (280), del cual podría ser el primer ejemplo descrito en el tracto respiratorio inferior.

Su comportamiento *in vitro* no ofrece rasgos positivos, especialmente significativos desde el punto de vista de la microscopía óptica. Sin embargo sí tiene importancia el comprobar que una neoplasia, cuya naturaleza muscular lisa es indudable en base al estudio ultraestructural, tanto de los elementos originarios del tumor como de las células cultivadas, mostrara un patrón claramente distinto del obtenido en los mesoteliomas monofásicos,

en los fibromas pleurales, en el fibrohistiocitoma maligno pulmonar y en los restantes grupos de tumoraciones fusocelulares.

Podemos pues concretar el interés de este caso en dos puntos 1) supone la descripción en el pulmón de una variante de leiomiosarcoma identificada hasta ahora sólomente en el area genital y en otros territorios extrapulmonares, incluidas las partes blandas somáticas (281,282), 2) valida la especificidad del crecimiento de otras neoplasias, entre ellas, de manera muy singular, la de los tumores mesoteliales.

#### **II.E.- FIBROHISTIOCITOMAS.-**

El fibrohistiocitoma maligno de la serie tiene el interés de que, siendo un tumor compuesto preferentemente por células fusiformes con un patrón de asociación estoriforme, que podría plantear problemas de diagnóstico diferencial en biopsias de pequeño tamaño con otras neoplasias fusocelulares, mostró, sin embargo, un crecimiento completamente característico y similar al descrito en tumores de la misma estirpe localizados en las partes blandas somáticas (283), así como al encontrado en los mesoteliomas fibrosarcomatosos. El cultivo tisular no sólo permite por tanto su identificación rápida, sino además es un argumento más para validar la interpretación del patrón de crecimiento mesotelial como específico de dichos

tumores.

#### II.F.- MIOBLASTOMA DE CELULAS GRANULOSAS.-

El tumor de células granulosas bronquial es también una neoplasia de observación infrecuente, cuyas características in vitro merecen un comentario. Sólomente el trabajo de Murray (284), y el de Alvarez Fernandez y Carretero Albiñana (285), han referido algunos casos de tumor de células granulosas in vitro. Los hallazgos son en líneas generales coincidentes, con ciertas diferencias. El tumor es capaz de crecer desde momentos muy precoces del cultivo, y las células granulosas tienen capacidad de multiplicación mitótica activa. Muestran gránulos de tamaño y morfología similares a los que existen en el tumor originario, unos de gran diámetro entre las 3 y las 7-8 micras, y otros, de dimensiones mucho menores, desde una micra hasta el límite de la visibilidad óptica. Su tendencia es a crecer como elementos aislados o a asociarse formando agrupaciones fasciculares toscas. En cultivo tisular, puede seguirse además la granulación progresiva de elementos indiferentes de estirpe no determinable en base a su morfología, hasta constituir células granulosas bien desarrolladas de aspecto característico.

Los hallazgos muestran como dato de interés, el hecho de que el crecimiento no sea similar al obtenido en tumores de las estirpes celulares a las que comúnmente se ha atribuido el

desarrollo del tumor (histiocitos, células de Schwann) (286,287). Que dicho crecimiento sea diferente del de otras neoplasias intrapulmonares, permite comprobar de una parte, la existencia de la llamada "célula granulosa precoz", descrita en el tejido tumoral originario por Sobel y cols. (74), de otra, descartar que la granulación celular fuese un fenómeno involutivo, al ser las células portadoras de inclusiones granulares capaces de crecimiento y multiplicación. Finalmente se describe por vez primera el crecimiento activo de células estromales con cuerpos angulados.

**conclusiones**

## CONCLUSIONES

### I.- NEOPLASIAS EPITELIALES MALIGNAS PULMONARES.-

El

cultivo de neoplasias epiteliales in vitro según el método de Kersting, presenta las siguientes características:

#### I.A.- Ventajas.-

- No exige disgregación celular, mecánica o enzimática, por lo que no origina alteraciones en los componentes de la superficie celular.

- Al implantar un fragmento tumoral se obtiene una representación más veraz de la heterogeneidad tumoral.

- El crecimiento medio tumoral fue del 58.5%, por tanto dentro del rango inferior de frecuencia en relación a otros medios de cultivo (50%-80%).

- El crecimiento comienza con cierta precocidad. El 78.8% aparece a partir del tercer día, frente a las dos o tres semanas necesarias en otros sistemas de cultivo.

- Es un método económico, con requerimientos de tiempo, personal y presupuesto muy moderados, en comparación con otros ensayos in vivo e in vitro.

**I.B.- Inconvenientes.-**

- Escasa intensidad de crecimiento tumoral en le 50-80% de los casos. En ningún momento se llegan a constituir colonias tumorales (más de 30-50 células).

- Corta duración del desarrollo neoplásico. A las tres semanas el 50% de los cultivos se han extinguido.

- Escasa reproductibilidad tumoral, con ocasionales desdiferenciaciones.

- Permisividad del crecimiento de células neoplásicas y normales. El método no es, por tanto, selectivo.

- Escasa rentabilidad, por bajo índice eficacia de crecimiento/coste

**I.C.-** El método carece de utilidad para estudios morfológicos de rediferenciación en neoplasias pulmonares, no permitiendo una mejor clasificación de los carcinomas indiferenciados no microcíticos.

**I.D.-** El método no es apropiado para el análisis de la quimiosensibilidad *in vitro*.

**I.E.-** El método no presenta utilidad para ensayos de biología tumoral.

## II.- NEOPLASIAS NO EPITELIALES PULMONARES.-

II.A.- El método de Kersting es de la máxima utilidad en la identificación de las neoplasias mesoteliales malignas de tipo monofásico fibrosarcomatoso. El crecimiento in vitro de estos tumores se puede considerar específico y permite su diagnóstico de una manera rápida y fiable. El estudio ultraestructural de los tumores cultivados muestra rasgos concordantes con la naturaleza mesotelial demostrable in vitro, siendo, en estos momentos, de menor rendimiento la inmunohistoquímica.

II.B.- En los llamados "mesoteliomas fibrosos benignos", el cultivo demuestra su naturaleza fibroblástica, en concordancia con los hallazgos ultraestructurales e inmunohistoquímicos.

II.C.- En otros sarcomas primarios pulmonares, como el fibrohistiocitoma maligno y el leiomiomasarcoma, cuyo aspecto en microscopía óptica podría ser confundido con el de los mesoteliomas malignos fibrosarcomatosos, el patrón de crecimiento obtenido es netamente distinto al de los tumores previamente señalados, lo que valida de una forma adicional los hallazgos de este procedimiento en los mesoteliomas.

II.D.- Por último en un grupo misceláneo de neoplasias, el método de Kersting ofrece hallazgos de variable interés que, o bien completan los obtenidos por otras técnicas, (la demostración de células granulares juveniles en el mioblastoma de células

granulosas, la demostración del crecimiento de las células portadoras de cuerpos angulados, el crecimiento como un tejido de granulación obtenido en el granuloma de células plasmáticas), o bien no aportan datos de relevancia en comparación con la ultraestructura o la inmunohistoquímica (el caso del llamado angioma esclerosante pulmonar).

## **bibliografía**

## BIBLIOGRAFIA.-

- 1.- Albert Solís y cols. Libro blanco de la Oncología en España. JIMS. Madrid 1988, 19-47
- 2.- Publicaciones periódicas del Instituto Nacional de Estadística. Años 1983, 1980, 1970, 1960, 1950, 1940, 1930, 1920, 1910, 1900.
- 3.- Veronesi U. Europe against Cancer News Letter. European School of Oncology, 1989;2:10-11.
- 4.- Silverberg E. Cancer Statistics, 1980, CA 30;2338
- 5.- Howson C y cols. The decline in gastric cancer. Epidemiology of an unplanned triumph. Epidemiological Reviews 1986;8:1-27.
- 6.- Gsell O. Cancer bronchique et tabac. Les Bronches 1966;5:325-338.
- 7.- Monturiol Rodriguez JM. Aspectos epidemiológicos del Carcinoma Bronquial. Hospital General 1976;16:341-352.
- 8.- Belcher JR. World-wide differences in the sex ratio of bronchogenic carcinoma. Brit J Dis Chest 1971;65:205-221.
- 9.- Monturiol Rodriguez JM, García Gómez R. Aspectos epidemiológicos del Cáncer Bronquial. Actas del XII Congreso Nacional de la Separ. Valladolid. Liade, 1980.
- 10.- Collins WP, Loeffler RK, Tivey H. Observations on growth rates of human tumors. Am J Roentgen Radium Ther Nuclear Med 1956;76:988-1000.
- 11.- García Gómez R, Madrigal Alonso P, Pérez Modrego S. Revisión del carcinoma bronquial después de diez años en el Hospital Oncológico de Madrid. Oncología 1982;5:47-58.
- 12.- Santabarbara P, Estapé J. Historia natural del cáncer de pulmón. Revisiones en Cáncer 1987;15:161-169.
- 13.- Carney DN, De Leij L. Lung Cancer Biology. Seminars in Oncology. 1988;15:199-214.
- 14.- Carmack E. Surgical Adjuvant chemotherapy in non-small cell

Lung Cancer. *Seminars in Oncology* 1988;15:255-260.

15.- Minna JD, Higgins GA, Glatstein EJ. Cáncer de pulmón. Cáncer. Principios y práctica de Oncología. De Vita VT, Hellman S, Rosenberg SA. Ed. Salvat, Barcelona, 1984, T.I, 371-445.

16.- Staging of Lung Cancer. 1979. American Joint Committee for Cancer Staging and End-Results Reporting Task Force on Lung Cancer.

17.- Mountain CF, Hermes KE. Management Implications of Surgical staging studies. *Prog Cancer Res Therp* 1979;11:233-242.

18.- Mountain CF. Biologic, physiologic and technical determinants in surgical therapy for lung cancer. En Strauss MJ Edit. Lung cancer: clinical, diagnosis and treatment. New York, Grune Stratton, 1977:185-198.

19.- Pearson FG, Lung Cancer. The past twenty five years. *Chest* 1986;89:200S-205S.

20.- Mountain CF. A new International Staging system for lung Cancer. *Chest* 1986;89:225S-233S.

21.- Pearson FG, Delarne NC, Ilves R, et al. Significance of positive superior mediastinal nodes identified at mediastinoscopy in patients with resectable cancer of the lung. *J Thorac Cardiovasc. Surg* 1982;83:1-11.

22.- Paulson DL, Reisch JS. Long term survival after resection for bronchogenic carcinoma. *Ann Surg* 1976;184:324-332.

23.- Mountain CF, Greenberg SD, Fraire AE. Tumor stage in non-small cell carcinoma of the lung. *Chest* 1991;99:1258-1260.

24.- Mountain CF. Prognostic Implications of International Staging System for Lung Cancer. *Seminars in Oncology* 1988;15:236-245.

25.- Kirsh MM, Rotman H, Argenta L, et al. Carcinoma of the lung. Results of treatment over ten years. *Ann Thorac Surg* 1976;21:371-377.

26.- Katlic M, Carter D. Prognostic implication of histology, size and location of primary tumors. *Prog Cancer Res Therap* 1979;11:143-150.

27.- Auerbach O, Garfinkel L, Parks VR. Histologic types of lung cancer in relation to smoking habits, year of diagnosis and sites of metastases. *Chest* 1975;67:382-387.

28.- Hansen HH. Tratamiento del carcinoma microcítico de pulmón. *Revisiones en Cáncer. Cáncer de Pulmón.* 1987;1:179-184.

29.- Spiro SG. Chemotherapy of small-cell Lung Cancer. Clinics in Oncology. 1985;4:105-120.

30.- Carmack E, Hill LD, Gail M. A randomized comparison of the effects of adjuvant therapy on resected stages II and III non-small cell cancer of the lung. Ann Surg 1985;2:335-341.

31.- Lad T. The benefit of adjuvant treatment for resected locally advanced non-small cell lung cancer. J Clin Oncol 1988;6:9-17.

32.- Eagan RT, Ruud CH, Lee RE, et al. Pilot study of induction therapy with cyclophosphamide, doxorubicin, and cisplatin (CAP) and chest irradiation prior to thoracotomy in initially inoperable stage III MO non-small cell lung cancer. Cancer Treatment Report 1987;10:895-900.

33.- Kris MG, Gralla RJ, Wertheim MS et al. Trial of the combination of mitomycin, vindesine and cisplatin in patients with advanced non-small cell lung cancer. Cancer Treatment Report 1986;70:1091-1096.

34.- Kris MG, Cohen E, Gralla R. An analysis of 134 phase II trials in non-small cell lung cancer. Proceedings of the IV World Conference on Lung Cancer. Toronto, Canada 1985;4:39.

35.- Pérez CA, Stanley K, Grundy G. Impact of irradiation technique and tumor extent on tumor control on survival of patients with unresectable non-oat cell carcinoma of the lung. Report by the Radiation Therapy Oncology Group. Cancer 1982;50:1091-1099.

36.- Mulshine JL, Glatstein E, Ruckdeschel JC. Treatment of non-small cell lung cancer. J Clin Oncol 1986;4:1704-1715.

37.- Klasterky J. Tratamiento del cáncer de pulmón avanzado no célula pequeña. Revisiones en Cáncer. Cáncer de Pulmón. 1987;1:170-178.

38.- Sanderson D, Tockman M, Martini N. Lung Cancer Screening: IV World Conference in Lung Cancer. Chest, 1986;89:324S-325S.

39.- Kern DH, Campbell MA, Cochran AJ, et al. Cloning of human solid tumours in soft agar. Int J Cancer 1982;30:725-729.

40.- Fergusson RJ, Smyth JF. Studying lung cancer in the laboratory. 1.- Development of model systems. Thorax 1987;42:753-758.

41.- Pettengill OS, Sorenson GD, Wurstei-Hill DH. Isolation and growth characteristics of continuous cell lines from small cell

carcinoma of the lung. *Cancer* 1980;45:906-918.

42.- Gazdar AF, Carney DN, Russell EK. Establishment of continuous clonable cultures of small cell carcinoma of the lung which have amine precursor uptake and decarboxylation cell properties. *Cancer Res* 1980;40:3502-3507.

43.- Carney DN, Bunn PA, Gazdar AF et al. Selective growth in serum-free hormone-supplemented medium of tumour cells obtained by biopsy from patients with small cell carcinoma of the lung. *Proc Nat Ac Sc USA* 1981;78:3185-3189.

44.- Greene HSN. The heterologous transplantation of human lung cancer. *Cancer Res* 1953;13:347-349.

45.- Toolan HW. Growth of human tumors in cortisone treated laboratory animals. The possibility of obtaining permanently transplantable human tumors. *Cancer Res* 1953;13:389-394.

46.- Fergusson RJ, Carmichael J, Smyth JF. Human tumours xenografts growing in immunodeficient mice. A useful model for assessing drugs in bronchial carcinoma. *Thorax* 1986;41:376-380.

47.- Sutherland R. Importance of critical metabolites and cellular interactions in the biology of microregions of tumors. *Cancer* 1986;58:1668-1680.

48.- Cole SPC. Rapid chemosensitivity testing of human lung tumour cells using the MTT assay. *Cancer Chemother Pharmacol* 1986;17:259-263.

49.- Volm M, Wayss K, Kauffman M, et al. Pretherapeutic detection of tumor resistance and the results of tumor chemotherapy. *Europ J Cancer* 1979;15:983-993.

50.- Park CH, Bergsagel DE, McCulloch EA. Mouse myeloma tumour stem cell. A primary cell culture assay. *J Nat Cancer Inst* 1971;46:411-422.

51.- Hamburger AW, Salmon SE. Primary bioassay of human tumor stem cell. *Science* 1977;197:461-463.

52.- Courtenay VD, Mills J. And in vitro colony assay for human tumour grown in immunosupressed mice and treated in vivo with cytotoxic agents. *Brit J Cancer* 1978;37:261-268.

53.- Fergusson RJ, Smyth JF. Studying Lung Cancer in the Laboratory. 2: Chemosensitivity testing. *Thorax* 1987;42:833-837.

54.- Von Hoff DD, Clark GM, Stogdill BJ et al. Prospective clinical trial of a human tumor cloning system. *Cancer Res* 1983;43:1926-1931.

- 55.- Von Hoff DD, Clark GM, Forseth BJ, et al. Simultaneous in vitro drug sensitivity testing in tumours from different sites in the same patient. *Cancer* 1986;58:1007-1013.
- 56.- Shimosato Y, Kameya T, Nagai K et al. Transplantation of human tumor in nude mice. *J Nat Cancer Inst* 1976;56:1251-1260.
- 57.- Sorenson GD, Pettenhill OS, Brinck-Johnson T et al. Hormone production by cultures of small cell carcinoma of the lung. *Cancer* 1981;47:1289-1296.
- 58.- Carney DN, Marangos PJ, Ihde DC et al. Serum neuron specific enolase. A marker for disease extent and response to therapy of small cell lung cancer. *Lancet* 1982;1:583-585.
- 59.- Gazdar AF, Zweig MH, Carney DN, et al. Levels of creatine kinase and its BB isoenzyme in lung cancer specimens and cultures. *Cancer Res* 1981;41:2773-2777.
- 60.- Wurster-Hill DH, Cannizzaro LA, Pettenhill OS et al. Cytogenetics of small cell carcinoma of the lung. *Cancer Genet Cytogenet* 1984;13:303-330.
- 61.- Whang-Peng J, Kao-Shun CS, Lee EC. Specific chromosome defect associated with human small cell lung cancer: deletion 3p(14-23). *Science* 1982;215:181-182.
- 62.- Griffin CA, Baylin SB, Expression of the c-myc oncogen in human small cell lung carcinoma. *Cancer Res* 1985;45:272-275.
- 63.- Iannuzzi MC, Scoggin CH. State of Art. Small cell lung cancer. *Am Rev Resp Dis* 1986;134:593-608.
- 64.- Enzinger FM, Weiss SW. *Soft Tissue Tumors*, 2nd ed., CV Mosby C. St. Louis, 1988, pp. 1-42, 83-102..
- 65.- En Young RH. *Pathology of the urinary bladder. Contemporary issues in surgical pathology.* Churchill Livingstone. New York, 1989.
- 66.- Stout AP, Murray M. Localized pleural mesothelioma. Investigation of its characteristics and histogenesis by the method of tissue culture. *Arch Path* 1942;34:951-964.
- 67.- Spencer H. *Pathology of the Lung*, 4th ed., Pergamon Press, Edimburgh, Oxford, 1985, pp. 983-1020.
- 68.- Gey GO, Gey MK. The maintenance of human normal cells and tumors in continuous cultures. I.- Preliminary report. Cultivation of mesoblastic tumors and normal tissue and notes on methods of cultivation. *Am J Cancer* 1936;27:45-76.

- 69.- Kersting G. Tissue culture of human gliomas. En: *Progress in Neurological Surgery*. Ed S. Karger. Basel, 1968;2:165-202.
- 70.- Lillie RD. *Histopathologic technique and practical histochemistry*. 3rd ed.. Mac Graw Hill. New York, 1965, pp 316-320.
- 71.- Dubowitz V, Brooke MM. *Muscle biopsy. A modern approach*. Saunders Philadelphia, 1973, pp 32-33..
- 72.- The World Health Organization *Histological typing of lung tumors*. *Am J Clin Path* 1982;77:123-136.
- 73.- Willmer EN. *Morphological problems of cell type, shape and identification*. En Willmer EN (Ed) *Cell and tissues in culture*. Vol 1. Academic Press. London, 1965.
- 74.- Sobel HJ, Marquet E, Avrin E, Schwartz K. *Granular cell myoblastoma. An electronmicroscopic and cytochemical study illustrating the genesis of granules and aging of myoblastoma cells*. *Am J Path* 1971;65:59-65.
- 75.- Mould RF. *Cancer Statistics*. Bristol. Adam Hilger, 1983.
- 76.- Pavelic ZP, Slocum HK, Rustum YM et al.. *Colony growth in soft agar of melanoma, sarcoma and lung carcinoma cells disaggregated by mechanical and enzymatic methods*. *Cancer Res* 1980;40:2160-2164.
- 77.- Selby P, Buick RN, Tannock I. *A critical appraisal of the human tumor stem-cell assay*. *New England J Med* 1983;308:129-133.
- 78.- Von Hoff D. "Send this patient's tumor for culture and sensitivity". *New England J Med* 1983;308:154-155.
- 79.- Bertoncetto I, Bradley TR, Campbell JJ et al. *Limitations of the clonal agar assay for the assesment of primary human ovarian tumor biopsies*. *Brit J Cancer* 1982;45:803-811.
- 80.- Hamburger AW. *The Salmon-Hamburger "Stem cell" assay*. En: *Human tumor drug sensitivity testing in vitro*. Edit. Deandy PP, Hill BT. Academic Press New York, 1983, 113-119.
- 81.- Von Hoff DD, Harris GJ, Johson G. *Initial experience with the human tumor stem cell assay: potential and problems*. En *Cloning of human stem cell*. Edit. Salmon SE. Alan R Liss New York 1980; 120.
- 82.- Brower M, Carney DN, Oie HK, et al. *Growth of cell lines and clinical specimens of human non small cell lung cancer in a serum free defined medium*. *Cancer Res* 1986;46:798-806.
- 83.- Simms E, Gazdar AF, Abrams PG et al. *Growth of human small*

cell (oat cell) carcinoma of the lung in serum-free growth factor supplemented medium. *Cancer Res* 1980;40:4356-4363.

84.- Sigma cell culture Reagents. Catalog. Sigma Chemical Company. St Louis MO, 1988, 178.

85.- Flow Laboratories Ltd. Irvine, Ayrshire, UK, 1980.

86.- Pollard EB, Tio F, Myers JW et al. Utilization of a human tumor cloning system to monitor for marrow involvement with small cell carcinoma of the lung. *Cancer Res* 1981;41:1015-1020.

87.- Cowan JD, Von Hoff DD, Dinesman A et al. Use of a human cloning system to screen retinoids for antineoplastic activity. *Cancer* 1983;51:92-96.

88.- Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ et al. In vitro cultivation of human tumor: Establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Nat Cancer Inst* 1973;51:1417-1423.,

89.- Anger B, Bockman, R, Andreeff M et al. Characterization of two newly established human cell lines from patients with large cell anaplastic lung cancer. *Cancer* 1982;50:1518-1529.

90.- Von Hoff DD, Casper J, Bradley E et al. Association between human tumor colony forming assay results and response of an individual patient's tumor to chemotherapy. *Am J Med* 1981; 70: 1027-1032.

91.- Mattern J, Jager S, Sonka J et al. Growth of human bronchial carcinoma in nude mice. *Brit J Cancer* 1985;51:195-200.

92.- Salmon S, Hamburger AW, Soehnlén B et al. Quantitation of differential sensitivity of human tumor stem cell to anticancer drugs. *New England J Med* 1978;298:1321-1327.

93.- Carney DN, Gazdar AF, Bunn PA et al. Demonstration of the stem cell nature of clonogenic tumor cell from lung cancer patient's. *Stem Cells* 1981;1:149-164.

94.- Cole SPC, Campling BG, Dexter DF et al. Establishment of a human large cell lung tumor line (QU-DB) with metastatic properties in athymic mice. *Cancer* 1986;58:917-923.

95.- Rabson AS, Rosen SW, Tashjian AH et al. Production of human chorionic gonadotropin in vitro in a cell line derived from a carcinoma of the lung. *J Nat Cancer Inst* 1973;50:669-674.

96.- Pettenhill OS, Faulkner CS, Wurster-Hill DH et al. Isolation and characterization of a hormone-producing cell line from human small cell anaplastic carcinoma of the lung. *J Nat Cancer Inst* 1977;58:511-517.

- 97.- Wurster-Hill DH, Maurer LH. Cytogenetics and diagnosis of Cancer: Abnormalities of chromosomes and polyploid levels in the bone marrow of patients with small cell anaplastic carcinoma of the lung. *J Nat Cancer Inst* 1978;61:1065-1075.
- 98.- Carney DN, Gazdar AF, Minna JD. Positive correlation between histological tumor involvement and generation of tumor cell colonies in agarose in specimens taken directly from patients with small cell carcinoma of the lung. *Cancer Res* 1980;40:1820-1823.
- 99.- Pavelic ZP, Slocum HK, Rustum YM et al. Growth of cell colonies in soft agar from biopsies of different human solid tumors. *Cancer Res* 1980;40:4151-4158.
- 100.- Gazdar AF, Carney DN, Sims HL et al. Heterotransplantation of small-cell carcinoma of the lung into nude mice. Comparison of intracranial and subcutaneous routes. *Inter J Cancer* 1981;28:777-783.
- 101.- Friedman HM, Glaubiger DL. Assesment of in vitro drug sensitivity of human tumor cell using [H3] thymidime incorporation in a modified human tumor stem cell assay. *Cancer Res* 1982;42:4683-4689.
- 102.- Gazdar AF, Carney DN, Nau MM, et al. Chrarakterization of variant subclasses of cell lines derived from small cell lung cancer having distinctive biochemical, morphological and growth properties. *Cancer Res* 1985;45:2924-2930.
- 103.- Carney DN, Mitchell JB, Kinsella TJ, In vitro radiation and chemotherapy sensitivity of established cell lines of human small cell lung cancer and its large cell morphological variants. *Cancer Res* 1983;43:2806-2811.
- 104.- Carney DN, Broder L, Edelstein M et al. Experimental studies of the biology of human small cell lung cancer. *Cancer Treat Rep* 1983;67:27-33.
- 105.- Saksela K, Bergh P, Lehto VP et al. Amplification of the c-myc oncogen in a subpopulation of human small cell lung cancer. *Cancer Res* 1985;45:1823-1827.
- 106.- Thiede K, Momburg F, Zangemiester V. et al. Growth and metastasis of human tumors in nude mice following tumor cell inoculation into a vascularized polyurethane sponge matrix. *Int J Cancer* 1988;42:939-945.
- 107.- Kitten CM, Von Hoff DD, Bennett EV et al. Growth of lung cancer in human tumor clonogenic system. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1982;83:363-371.
- 108.- Mattox DE, Von Hoff DD, Clark GM, et al. Factors that

influence head and neck squamous carcinoma in the soft agar cloning assay. *Cancer* 1984;53:1736-1740.

109.- Mattox DE, Von Hoff DD. In vitro stem cell assay in head and neck squamous carcinoma. *Am J Surg* 1980;140:527-530.

110.- Bockman RS, Bellin A, Repo M et al. In vivo and in vitro biological activities of two human cell lines derived from anaplastic lung cancers. *Cancer Res* 1983;43:4571-4576.

111.- Von Hoff DD, Weisenthal LM, Ihde DC et al. Growth of lung cancer colonies from bronchoscopy washings. *Cancer* 1981;48:400-403.

112.- Novak K, Peckham MJ, Steel GG. Variation in response of xenografts of colorectal carcinoma to chemotherapy. *Brit J Cancer* 1978;37:576-584.

113.- Woodhouse ME, Hillyard C, Dowsett M et al. Immunoreactive calcitonin production by human lung carcinoma cells in culture. *Brit J Cancer* 1975;32:373-379.

114.- Giovanella BC, Stehlin JS, Williams LJ et al. Heterotransplantation of human cancers into nude mice. *Cancer* 1978;42:2269-2281.

115.- Haji-Karim M, Carlson J. Proliferation and viability in cellular spheroids of human origin. *Cancer Res* 1978;38:1457-1464.

116.- Twentyman PR. Response to chemotherapy of EMT6 spheroids as measured by growth delay and cell survival. *Brit J Cancer* 1980;42:297-304.

117.- Hanna N, Fiedler IJ. Role of natural killer cells in the destruction of circulating tumor emboli. *J Nat Cancer Inst* 1980;65:801-809.

118.- Kyriazis AP, DiPersio L, Michel GJ et al. Growth patterns and metastatic behavior of human tumor growing in athymic mice. *Cancer Res* 1978;38:3186-3190.

119.- Douple EB, Cate CH, Cuphey TJ et al. Evaluation of drug efficacy in vitro using human small cell carcinoma of the lung spheroids. *Cancer* 1985;56:1918-1925.

120.- Selby PJ, Courtenay VD, Mc Elwain TJ et al. Colony growth and clonogenic cell survival in human melanoma xenografts treated with chemotherapy. *Brit J Cancer* 1980;42:438-447.

121.- Ambrose EJ, Andrews RD, Easty DM et al. Drug assays on cultures of human tumor biopsies. *Lancet* 1962;6:24-25.

- 122.- Weisenthal LM, Lippman M. Clonogenic and non clonogenic in vitro chemosensitivity assays. *Cancer Treat Rep* 1985;69:615-632.
- 123.- Francis GE, Broadbent JE, Johnson N et al. Clonal growth of metastatic carcinoma of bronchus in bone marrow culture. *Blood* 1979;54:534-539.
- 124.- Courtenay VD, Selby PJ, Smith IE, et al. Growth of human tumor cell colonies from biopsies using two soft agar techniques. *Brit J Cancer* 1978;38:77-81.
- 125.- Twentyman PR. Predictive chemosensitivity testing. *Brit J Cancer* 1985;51:295-299.
- 126.- Salmon SE, Von Hoff DD. In vitro evaluation of anticancer drugs with the human tumor stem cell assay. *Sem Oncol* 1981;8:377-385.
- 127.- Shutherland R, Carlsson J, Durand R et al. Spheroids in cancer research. *Cancer Res* 1981;41:2980-2984.
- 128.- Shoemaker RH, Walpert-DeFilipes MK, Kern DH et al. Application of a human tumor colony-forming assay to new drug screening. *Cancer Res* 1985;45:2145-2153.
- 129.- Hofer KG, Warters RL, Rolfes TH, et al. Viability of tumor cells in mechanically and enzymatically prepared tissue suspensions. *Eur J Cancer* 1974;10:49-56.
- 130.- Pasternak CA, Summer MC, Collin Ro. Surface changes during the cell cycle. In Pidilla GM, Cameron IL, Zimmerman A, Edit. *Cell cycle control*. New York Academic Press. 1974.
- 131.- Lieve LA. Nonspecific increased in permeability in *Escherichia Coli* produced by EDTA. *Proc Nat Acad Sci USA* 1965;53:745-750.
- 132.- Kramer P. Complex carbohydrates of animal cell biochemistry and physiology of the cell periphery. In Manson LA, Edit. *Biomembranes*. New York, Plenum Press 1971;231-243.
- 133.- Houck JC, Cheng R. Isolation of a macromolecule from serum stringently required by human fibroblasts. *Fed Proc* 1971;30:1257.
- 134.- Bossman HB. Mechanism of cellular drug resistance. *Nature* 1971;233:566-569.
- 135.- Sefton BN, Rubin H. Release from density dependent growth inhibition by proteolytic enzymes. *Nature* 1970;227:843-845.
- 136.- Barranco SC, Bolton VE, Novak JK. Time dependent changes in drug sensitivity expressed by mammalian cells after exposure to trypsin. *J Nat Cancer Inst* 1980;64:913-916.

- 137.- Cox SM, Baur PS, Haenelt B. Retention of the glycocalix after cell detachment by EDTA. *J Histochem Cytochem* 1977;25:1368-1372.
- 138.- Fogh J. Reduced tumor-producing capacity of mycoplasma modified lines of FL human amnion cell in the cheek pouch of cortisonized hamster. *Cancer Res* 1969;29:1721-1731.
- 139.- Fogh J, Fogh H. Chromosome changes in PPLO-infected FL human amnion cells. *Proc Soc Exp Biol Med* 1965;119:233-238.
- 140.- Fogh J, Fogh H. Irreversibility of major chromosome changes in a mycoplasma modified line of FL human amnion cells. *Proc Soc Exp Biol Med* 1967;126:67-74.
- 141.- Toolon HW. Successful subcutaneous growth and transplantation of human tumors in X-irradiated laboratory animals. *Proc Soc Exp Biol Med* 1951;77:572-578.
- 142.- Floersheim GL, Nassenstein D, Torhosrt J. Growth of human tumours in mice after short-term immunosuppression with procarbazine cyclophosphamide and anti-lymphocyte serum. *Transplantation* 1980;30:275-280.
- 143.- Steel GG, Courtenay VD, Rostom AI. Improved immunosuppression techniques for the xenografting of human tumors. *Brit J Cancer* 1978;37:224-230.
- 144.- Jordan RK, Owen JJT, Raff MC. Organ culture studies of nude mouse thymus. *Europ J Immunol* 1977;7:736-743.
- 145.- Fogh J, Tiso J, Orefo T et al. Thirty four lines of six human tumor categories established in nude mice. *J Nat Cancer Inst* 1980;64:745-751.
- 146.- Shorthouse AJ, Peckham MJ, Smith JF et al. The therapeutic response of bronchial carcinoma xenografts: a direct patient xenograft comparison. *Brit J Cancer* 1980;41:142-145.
- 147.- Steel GG, Courtenay VD, Peckham MJ. The response to chemotherapy of a variety of human tumor xenografts. *Brit J Cancer* 1983;47:1-13.
- 148.- Beutler B, Cerami A, Cachectin and tumor necrosis factor as two sides of the same biological coin. *Nature* 1986;320:584-588.
- 149.- Fidler IJ. Rationale and methods for the use of nude mice to study the biology and therapy of human cancer metastasis. *Cancer Metast Rev* 1986;5:29-49.
- 150.- Kyriazis AA, Kyriazis AP. Preferential site of growth of human tumors in nude mice following subcutaneous transplantation.

Cancer Res 1980;40:4509-4511.

151.- Flanagan SP. "Nude" a new hairless gene with pleiotropic effects in the mouse. *Genet Res Camb* 1966;8:295-309.

152.- Pantelouris EM. Absence of thymus in the mouse mutant. *Nature* 1968;217:370-371.

153.- Fogh J, Giovanella BC. *The nude mouse in experimental and clinical research*. New York Academic Press, 1978.

154.- De Sousa MA, Parrot DVM, Pantelouris EM. The lymphoid tissues of mice with congenital aplasia of the thymus. *Clin Exper Immunol* 1969;4:637-644.

155.- Pritchard H, Micklem HS, Hematopoietic stem cell and progenitors of functional T-lymphocytes in the bone marrow of "nude" mice. *Clin Exper Immunol* 1973;14:597-607.

156.- Koene R, Ceslay R, Jansen J et al. Rejection of skin grafts in the nude mouse. *Nature* 1974;251:69-70.

157.- Pettengill OS, Curphey TJ, Cate CC et al. Animal model for small cell carcinoma of the lung. Effect on immunosuppression and sex of mouse on tumor growth in nude athymic mice. *Exper Cell Byol* 1980;48:278-297.

158.- Sorenson GD, Pettengill OS, Cate ChC. Studies on xenografts of small cell carcinoma of the lung. En: *Small cell lung cancer* Edt. Greco FA, Oldham RK, Bum PA. *Clinical Oncol Monographs*. Grune Stratton 1981;95-121.

159.- Reed ND, Manning DD. Present status of xenotransplantation of non malignant tissue to the nude mice. In Fogh J, Giovanella BC (Edit) *The nude mouse in experimental and clinical research*. Academic Press New York, 1978;167.

160.- Sharkey FF, Fogh JM, Hadju SI. Experience in surgical pathology with human tumor growth in the nude mouse. In Fogh J, Giovanella BC (Edits). *The nude mice in experimental and clinical research*. Academic Press New York, 1978: 187.

161.- Mattern J. Different growth rates of lung tumors in man and their xenografts in nude mice. *Europ J Cancer* 1980;16:289-291.

162.- Engelholm SA, Spang-Thomsen M, Vindelov LL et al. Comparison of characteristics of human small cell carcinoma of the lung in the patients in vitro and transplanted into nude mice. *Acta Pathol Microbio Immunol Scand Sect A* 1986;94:325-336.

163.- Evans DD, Smith IE, Shorthouse AJ et al. A comparison of the response of human lung carcinoma xenografts to vindesine and vincristine. *Brit J Cancer* 1982;45:466-468.

- 164.- Kopper L, Steel GG. The therapeutic response of three human tumor lines maintained in immunosuppressed mice. *Cancer Res* 1975;35:2704-2713.
- 165.- Giovanella BC, Stehlin JS, Williams LJ. Heterotransplantation of human malignant tumor in nude thymusless mice. Malignant tumors induced by injection of cell cultures derived from human solid tumors. *J Nat Cancer Inst* 1974;52:921-929.
- 166.- Fogh J, Fogh JM, Orfeo M, One hundred and twenty seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *J Nat Cancer Inst* 1977;59:221-225.
- 167.- Shorthouse AJ, Smyth JF, Steel GG et al. The human tumor xenograft. A valid model in experimental chemotherapy ?. *Brit J Surg* 1980;67:715-722.
- 168.- Mendelshon ML, Dethlefsen La. Tumor growth and cellular kinetics. In: *The proliferation and spread of neoplastic cells*. Williams Wilkins, Baltimore, 1968,197-212.
- 169.- Tepper J. Clonogenic potential of human tumor: a hypothesis. *Acta Radiol Oncol Phys Biol* 1981;20:283-288.
- 170.- MacKillop WJ, Steward SS, Buick RN. Density volume analysis in the study of cellular heterogeneity in human ovarian carcinoma. *Brit J Cancer* 1982;45:812-820.
- 171.- Shoemaker RH, Wolpert-DeFilippes MK, Venditi JM. Potentials and drawbacks of the human tumor stem cell assay. *Behring Ins Mitteilungen* 1984;74:262-274.
- 172.- Meyskens FL, Thomsom SP, Hickie RA. Potential biological explanation of stimulation of colony growth in semisolid agar by cytotoxic agents. *Brit J Cancer* 1983;48:863-868.
- 173.- Hamburger AW. Use of in vitro tests in predictive cancer chemotherapy. *J Nat Cancer Inst* 1981;66:981-988.
- 174.- Lenhard RE, Woo KB, Abeloff MD. Predictive value of regression rates following chemotherapy of small cell carcinoma of the lung. *Cancer Res* 1983;43:3013-3017.
- 175.- Kyriazis AA, Kyriazis AP, Kereiakes JG. Histopathologic evaluation of response to treatment of human tumors grown in the nude mice. *Exp Cell Biol* 1983;51:83-95.
- 176.- Knock FE. Qualitative and quantitative in vitro sensitivity tests for cancer chemotherapy. *Nat Cancer Inst Monographs* 1971;34:247-249.
- 177.- Livingstone RB, Titus GA, Heilbrum LK. In vitro effects on DNA synthesis as a predictor of biological effect from

chemotherapy. *Cancer Res* 1980; 40:2209-2212.

178.- Steel GG. The growth and therapeutic response of human tumors in immunodeficient mice. *Bull Cancer* 1978;65:465-472.

179.- Houghton JA, Taylor DM. Maintenance of biological and biochemical characteristics of human colorectal tumors during serial passage in immunodeprived mice. *brit J Cancer* 1978;37:199-212.

180.- Castro JE. Human tumours growth in mice. *Nature* 1972;239:83-84.

181.- Fergusson RJ, Anderson LE, Smith JF. Effect of interferon on the activity of cytotoxic agents in human lung cancer xenografts. *Thorax* 1986;41:233.

182.- Freireich EJ, Gehan EA, Rall DP et al. Quantitative comparison of toxicity of anticancer agents in mouse, rat, hamster, dog, monkey and man. *Cancer Chemotherp Rep* 1966;50:219-243.

183.- Steel GG, Courtenay VD, Phelps TA, et al. The therapeutic response of human tumor xenografts. In *Symposium on Immunodeficient animal in Cancer Research*. MacMillan London, 1980.

184.- Bailey M, Jones A, Raghavan D. Limitation of human tumour xenografts in individual patients drug sensitivity testing. *Brit J Cancer* 1980;43:725.

185.- Wright JC, Cobb JP, Gumpert SL, et al. Investigation of the relationship between clinical and tissue culture response to chemotherapeutic agents on human cancer. *New Engl J Med* 1957;257:1207-1211.

186.- Richardson RL, Greco FA, Oldman RK, et al. Tumor products and potential markers in small cell lung carcinoma. *Semi Oncol* 1978;5:253-262.

187.- Egan RT, Maurer LH, Forcier RJ, et al. Small cell carcinoma of the lung: staging, paraneoplastic syndromes, treatment and survival. *Cancer* 1974;33:527-532.

188.- Rees LH, Ratcliffe JG. Ectopic hormone production by non endocrine tumor. *Clin Endocrinol* 1974;3:263-299.

189.- Roof BS, Carpenter B, Fink DJ et al. Some thoughts on the nature of ectopic parathyroid hormones. *Am J Med* 1971;50:686-691.

190.- Hattori M, Imura H, Matsukura S. Multiple hormone producing lung carcinoma. *Cancer* 1979;43:2429-2437.

- 191.- Kirschner MA, Cohen FB, Jespersson D. Estrogen production and its origin in man with gonadotropin producing neoplasms. *J Clin Endocrinol Met* 1974;39:112-118.
- 192.- Wright WC, Daniels WP, Fogh J. Distinction of seventy one cultured human tumor cell lines by polymorphic enzyme analysis. *J Nat Cancer Inst* 1981;66:239-247.
- 193.- Muggia FM, Krezosky SK, Hansen HH. Cell kinetic studies in patients with small cell carcinoma of the lung. *Cancer* 1974;34:1683-1690.
- 194.- Little CD, Nau MM, Carney DN, et al. Amplification and expression of the c-myc oncogen in human lung cancer cell lines. *Nature* 1983;306:194-196.
- 195.- Mark GE, Rapp VR. Primary structure of V-raf: relatedness to the src family of oncogenes. *Science* 1984;224:285-289.
- 196.- Land H, Pasada LF, Weinberg RA. Cellular oncogenes and multistep carcinogenesis. *Science* 1983;222:771-778.
- 197.- Fergusson RJ, Smyth JF. Studying lung cancer in the laboratory: 3.- Use of cell lines to investigate the biology of lung cancer. *Thorax* 1987;42:922-925.
- 198.- Radice PA, Matthews MJ, Ihde DC et al. The clinical behavior of "mixed" small cell/large cell broncogenic carcinoma compared to "pure" small cell subtypes. *Cancer* 1982;50:2894-2902.
- 199.- Hirsch FR, Osterlind K, Hansen HH. The prognostic significance of histopathologic subtyping of small cell carcinoma of the lung according to the classification of the World Health Organization. A study of 375 consecutive patients. *Cancer* 1983;52:2144-2150.
- 200.- Hirsch FR, Mathews MJ, Aisner S, et al. Histopathologic classification of small cell lung cancer. Changing concepts and terminology. *Cancer* 1988;62:973-977.
- 201.- Carney DN, Mathews MJ, Ihde DC et al. Influence of histologic subtype of small cell carcinoma of the lung on clinical presentation, response to therapy and survival. *J Nat Cancer Inst* 1980;65:1225-1230.
- 202.- Maximow A. Über das Mesothel (Deckzellen der Serösen Häute) und die Zellen der Serösen Exsudate. *Arch Exper Zellforsch* 1927;4:1-42.
- 203.- Stout AP. Solitary fibrous mesothelioma of the peritoneum. *Cancer* 1950;3:820-825.
- 204.- Stout AP, Himadi GM. Solitary (localized) mesothelioma of

the pleura. *Ann Surg* 1951;133:50-64.

205.- Hernández FJ, Fernández BB. Localized fibrous tumor of pleura: A light and electronmicroscopic study. *Cancer* 1974;34:1667-1674.

206.- Osamura RI. Ultrastructure of localized fibrous mesothelioma of the pleura: Report of a case with histogenetic considerations. *Cancer* 1977;39:139-142.

207.- Kawai T, Mikata A, Torikata CH, Yakumaru K, Kageyama K, Shimosato Y. Solitary (localized) pleural mesothelioma. *Am J Surg Path* 1978;2:365-375.

208.- Dalton WR, Zolliker AS, McCaughey WTE, Jacques J, Kannerstein M. Localized primary tumor of the pleura: an analysis of 40 cases. *Cancer* 1979;44:1465-1475.

209.- Briselli M, Mark EJ, Dickersin R. Solitary fibrous tumor of the pleura. Eight new and review of 360 cases in the literature. *Cancer* 1981;47:2678-2689.

210.- Burring KF, Kastendieck H. Ultrastructural observations on the histogenesis of localized fibrous tumor of the pleura (benign mesothelioma). *Virchows Arch (Pathol Anat)* 1984;403:413-424.

211.- Dervan PA, Tobin B, O'Connor M. Solitary (Localized) fibrous mesothelioma: evidence against mesothelial cell origin. *Histopathol* 1986;10:867-875.

212.- Keating S, Simon GT, Alexopoulou I, Kay JM. Solitary fibrous tumors of the pleura: an ultrastructural and immunohistochemical study. *Thorax* 1987;42:976-979.

213.- Carter D, Otis MC. Three types of spindle cell tumors of the pleura. Fibroma, sarcoma and sarcomatoid mesothelioma. *Am J Surg Path* 1988;12:747-754.

214.- El-Nagaar AK, Ro JY, Ayala AG, Ward R, Ordoñez NG. Localized fibrous tumors of the serosal cavities. Immunohistochemical, electronmicroscopic and flow-cytometric DNA study. *Am J Clin Path* 1989;92:561-565.

215.- England DM, Hochholzer L, McCarthy MJ. Localized benign and malignant fibrous tumors of the pleura. A clinicopathologic review of 223 cases. *Am J Surg Path* 1989;13:640-658.

216.- Alvarez Fernández E, Diez Nau MD. Malignant fibrosarcomatous mesothelioma and benign plural fibroma (localized fibrous mesothelioma) in tissue culture. *Cancer* 1979;43:1658-1663.

- 217.- Yousem SA, Flynn SD. Intrapulmonary localized fibrous tumor. *Am J Clin Path* 1988;89:365-369.
- 218.- Witkin GB, Rosai J. Solitary fibrous tumor of the mediastinum. A report of 14 cases. *Am J Surg Path* 1989;13:547-557.
- 219.- Kim H, Damjanov I. Localized fibrous mesothelioma of the liver: report of a giant tumor studied by light and electron microscopy. *Cancer* 1983;52:1662-1665.
- 220.- Zukerberg LR, Rosenberg AE, Randolph G, Pilch BZ, Goodman ML. Solitary fibrous tumor of the nasal cavity and paranasal sinuses. *Am J Surg Path* 1991;15:126-130.
- 221.- Takebayashi K, Fujioka Y, Nagashima K, Nagakawa T, Kubota M. Immunohistological studies of fibrous pseudotumor of the testicular tunica vaginalis. *Acta Pathol Jpn* 1989;39:810-813.
- 222.- Sano ME, Weiss E, Gault ES. Pleural mesothelioma. Further evidence of its histogenesis. *J Thorac Surg* 1950;9:783-788.
- 223.- Alvarez Fernández E, Escalona Zapata J. Intrapulmonary mesotheliomas. *Virchows Archiv (Anat Pathol)* 1982;395:331-343.
- 224.- Kay S, Silverberg SG. Ultrastructural studies of a malignant fibrous mesothelioma of the pleura. *Arch Path* 1971;92:449-455.
- 225.- Klima M, Mossart M. Sarcomatous type of malignant mesothelioma. *Ultrastruct Pathol* 1983;4:349-358.
- 226.- Yang H, Weaver LL, Foti PR. Primary malignant fibrous histiocytoma of the pleura. A case report. *Acta Cytol* 1983;27:683-687.
- 227.- Fukuda T, Ishikawa H, Ohnishi Y, Tachikawa S, Oguma F, Kasuya S, Sakashita I. Malignant spindle cell tumor of the pericardium. Evidence of sarcomatous mesothelioma with aberrant antigenic expression. *Acta Pathol Jpn* 1989;39:750-754.
- 228.- Bader H, Altsmannsberger M, Osborn M. Typing of intermediate filaments in malignant fibrous pleural tumors. *J Cancer Res Clin Oncol* 1984;107:42-47.
- 229.- Al-Izzi M, Thurlow NP, Corrin B. Pleural mesothelioma of connective tissue type, localized fibrous tumour of the pleura and reactive submesothelial hyperplasia. An Immunohistochemical comparison. *J Pathol* 1989;158:41-44.
- 230.- Cagle PT, Truong LD, Roggli VL, Greenberg SD. immunohistochemical differentiation of sarcomatoid mesotheliomas from other spindle cell neoplasms. *Am J Clin Pathol* 1989;92:566-

571.

231.- Klima M, Gyorkey F. Benign pleural lesiosn and malignant mesothelioma. *Virchows archiv (Anat Pathol)* 1977;376:181-193.

232.- Liebow AA, Hubbel DS. Sclerosing hemangioma (histiocytoma, xanthoma) of the lung. *Cancer* 1975;36:146-156.

233.- Haas JE, Yunis EJ, Totten RS. Ultrastructure of a sclerosing hemangioma of the lung. *Cancer* 1972;30:512-518.

234.- Kay S, Still WJS, Borochowitz D. Sclerosing hemangioma of the lung: an endothelial or epithelial neoplasm. *Hum Pathol* 1977;8:468-474.

235.- Hill GS, Eggleston JC. Electron microscopic study of so-called pulmonary sclerosing hemangioma. *Cancer* 1972;30:1092-1106.

236.- Kennedy A. Sclerosing hemangioma of the lung: an alternative view of its development. *J Clin Pathol* 1973;6:360-361.

237.- Okada V, Akamine Y, Into M. Electron microscopic observation on so-called pulmonary sclerosing hemangioma. *J Clin Electron Microsc* 1973;6:360-361.

238.- Navas Palacios JJ, Martín Escribano P, Toledo J. y cols. Sclerosing hemangioma of the lung : an ultrastructural study. *Cancer* 1979;44:949.955.

239.- Alvarez Fernández E, Escalona Zapata J. Sclerosing hemangioma of the lung: a histochemical, electronmicroscopical, tissue culture and time lapse cinematographic study. *Histopathol* 1981;5:579-588.

240.- Chan KW, Gibbs AR, Lo WS, y cols. Benign sclerosing pneumocytoma of the lung (sclerosing hemangioma). *Thorax* 1982;37:404-412.

241.- Nagata N, Dairaku M, Ishida T y cols. Sclerosing hemangioma of the lung. Immunohistochemical characterization of its origin as related to surfactant apoprotein. *Cancer* 1985;55:116-123.

242.- Katzenstein AL, Gmelich JT, Carrington CB. Sclerosing hemangioma of the lung. A clinicopathologic study of 51 cases. *Am J Surg Path*, 1980;4:343-356.

243.- Katzenstein AL, Fulling K, Weise DI y cols. So-called sclerosing hemangioma of the lung: evidence for mesothelial origin. *Am J Surg Pathol* 1983;7:3-14.

244.- Alvarez Fernández E, Carretero Albiñana L, Menarguez Palanca J. Sclerosing hemangioma. An Immunohistochemical study

of intermediate filaments and endothelial markers. *Arch Path Lab Med* 1989;113:121-124.

245.- Spencer H. The pulmonary plasma cell-histiocytoma complex. *Histopathol* 1984;8:903-916.

246.- Bahadori M, Liebow AA. Plasma cell granulomas of the lung. *Cancer* 1973;31:191-208.

247.- Muraoka S, Sato T, Takahashi T, Ando N, Shimoda H. Plasma cell granuloma of the lung with extrapulmonary extension. Immunohistochemical and electron microscopical study. *Acta Path Jpn* 1985;35:933-944.

248.- Childress WG, Adie GC. Plasma cell tumor of the mediastinum and lung: report of two cases. *J Thorac Surg* 1950;19:794-799.

249.- Pettinato G, Manivel JC, de Rosa N, Dehner LP. Inflammatory myofibroblastic tumor (plasma cell granuloma). Clinicopathologic study of 20 cases with immunohistochemical and ultrastructural observations. *Am J Clin Path* 1990;94:538-546.

250.- Mäkelä V, Mattila S, Mäkinen J. Plasma cell granuloma (histiocytoma) of the lung and pleura. *Acta Path Microbiol Scand (A)* 1972;80:634-640.

251.- Brown WJ, Johnson LC. Post inflammatory tumor of the pleura: three cases of pleural fibroma of the interlobar fissure. *Milit Surg* 1951;109:415- .

252.- Case records of the Massachusetts General Hospital: case 10 *New England J Med* 1982;206:596-598.

253.- Buell R, Wang NS, Seemayer TA y cols. Endobronchial plasma cell granuloma (xanthomatous pseudotumor): a light and electron microscopic study. *Hum Pathol* 1976;7:411-426.

254.- Matsubara O, Tan-Liu NS, Kennedy RM y cols. Inflammatory pseudotumor of the lung: progression from organizing pneumonia to fibrous histiocytoma or to plasma cell granuloma in 32 cases. *Hum Pathol* 1988;19:807-814.

255.- Warter A, Satge D, Roeslin N. Angioinvasive plasma cell granuloma of the lung. *Cancer* 1987;59:435-443.

256.- Sherwin RP, Kern WH, Jones JC. Solitary mast cell granuloma (histiocytoma) of the lung. A histopathologic, tissue culture and time-lapse cinematographic study. *Cancer* 1965;18:634-641.

257.- Wentworth P, Lynch MJ, Fallis JC, Turner JAP, Lowden JA, Conen PE. Xanthomatous pseudotumor of lung. A case report with electron microscope and lipid studies. *Cancer* 1968;28:345-355.

- 258.- Kuzela DC. Ultrastructural study of a post inflammatory "tumor" of the lung. *Cancer* 1975;36:149-156.
- 259.- Shirakusa T, Miyazaki N, Kitagawa T y cols. Ultrastructural study of pulmonary plasma cell granulomas: report of a case. *Brit J Dis Chest* 1979;73:289-296.
- 260.- Alvarez Fernández E, Escalona Zapata J. Pulmonary plasma cell granuloma-an electron microscopic and tissue culture study. *Histopathology* 1983;7:279-286.
- 261.- Chen HP, Lee SS, Berardi RS. Inflammatory pseudotumor of the lung. Ultrastructural and light microscopic study of a mixomatous variant. *Cancer* 1984;54:861-865.
- 262.- Someren A. "Inflammatory pseudotumor" of the liver with occlusive phlebitis. *Am J Clin Pathol* 1978;69:176-181.
- 263.- Eimoto T, Yanaka M, Kurosawa M y cols. Plasma cell granuloma (inflammatory pseudotumor) of the spinal cord meninges. *Cancer* 1978;41:1929-1936.
- 264.- West SG, Pittman DL, Coggin JT. Intracranial plasma cell granuloma. *Cancer* 1980;46:330-335.
- 265.- Soga J, Saito K, Suzuki N y cols. Plasma cell granuloma of the stomach. A report of a case and review of the literature. *Cancer* 1970;25:618-625.
- 266.- Isaacson P, Buchanan R, Mephram BL. Plasma cell granuloma of the stomach. *Hum Pathol* 1978;9:355-358.
- 267.- Fish EA, Brodey PA. Plasma cell granuloma of the kidney. *Urology* 1976;8:89-91.
- 268.- Davis RE, Warnke RA, Dorfman RF. Inflammatory pseudotumor of lymph nodes. Additional observations and evidence for an inflammatory etiology. *Am J Surg Pathol* 1991;15:744-756.
- 269.- Pisciotto PT, Gray GF, Miller DR. Abdominal plasma cell pseudotumor. *J Pediatr* 1978;93:628-630.
- 270.- Wu JP, Yunis EJ, Fetterman G y cols. Inflammatory pseudotumor of the abdomen: plasma cell granulomas. *J Clin Pathol* 1973;26:943-948.
- 271.- Janigan DT, Marrie TJ. An inflammatory pseudotumor of the lung in Q fever pneumonia. *New Engl J Med* 1983;308:86-88.
- 272.- Loo KT, Seneviratne S, Chan JK. Mycobacterial infection mimicking inflammatory "pseudotumor" of the lung. *Histopathol* 1989;14:217-219.

- 273.- Vera Román JM, Sobonya RE, Gómez García JL y cols. Leiomyoma of the lung. *Cancer* 1983;52:936-941.
- 274.- White SH, Ibrahim NBN, Forrester CP y cols. Leiomyomas of the lower respiratory tract. *Thorax* 1985;40:306-311.
- 275.- Henderson DW, Papadimitriou JM, Coleman M. Ultrastructural appearances of tumours. 2nd ed. Churchill Livingstone Edimburgh 1986, pp 231-238.
- 276.- Wang NS, Seemayer TA, Ahmed MN y cols. Pulmonary leiomyosarcoma associated with an arteriovenous fistula. *Arch Path Lab Med* 1974;98:100-105.
- 277.- Pritchett PS, Fu YS, Kay S. Unusual ultrastructural features of a leiomyosarcoma of the lung. *Am J Clin Pathol* 1975;63:901-908.
- 278.- Wick MR, Scheithauer BW, Piehler Jm y cols. Primary pulmonary leiomyosarcomas. *Arch Path Lab Med* 1982;106:510-514.
- 279.- Jiménez JF, Uthman EO, Townsend JW y cols. Primary bronchopulmonary leiomyosarcoma in childhood. *Arch Path Lab Med* 1986;110:348-351.
- 280.- King ME, Dickersin GR, Scully RE. Myxoid leiomyosarcoma of the uterus. A report of six cases. *Am J Surg Pathol* 1982;6:589-598.
- 281.- Salm R, Evans DJ. Myxoid leiomyosarcoma. *Histopathol* 1985;9:159-169.
- 282.- Enzinger FM, Weiss SW, Soft tissue tumors. CV Mosby St Louis, 2nd ed, 1988, pp. 407-411.
- 283.- Escalona Zapata J, Diez Nau MD. Estudio del fibrohistiocitoma maligno por medio del cultivo, con especial énfasis en las formas monofásicas. *Patologia* 1990;23:19-27.
- 284.- Murray M. Tissue cultural characteristics of granular cell myoblastoma. *Cancer* 1951;4:857-865.
- 285.- Alvarez Fernández E, Carretero Albiñana L. Bronchial granular cell tumor. Presentation of three cases with tissue culture and ultrastructural study. *Arch Path Lab Med* 1987;111:1065-1069.
- 286.- Escalona Zapata J. Cytology and growth pattern of fibrosarcomas and related tumors En Escalona Zapata J, Ozello L. Ed Tissue culture in the study of tumors. *Pathol Res Practice* 1979;165:32-38.
- 287.- Escalona Zapata J. The nature of macrophages (foam cells) in neurinomas. Tissue culture study. *Acta Neuropathol (Berlin)* 1978;44:71-75.