

FORMACIÓN MÉDICA CONTINUADA

El proceso metastásico. III: Extravasación y proliferación en el órgano diana*

Resumen.—En esta tercera parte revisamos los procesos de extravasación y proliferación tumoral en el órgano diana, incidiendo en los diferentes fenómenos que acontecen a nivel de capilares y arteriolas, y de forma especial en el proceso de angiogénesis tumoral. Analizamos la secuencia que da lugar a la formación de nuevas asas vasculares y de una red circulatoria funcionante, así como los diferentes factores angiogénicos y antiangiogénicos conocidos y las importantes implicaciones terapéuticas atribuidas a estos últimos.

Repasamos los factores que contribuyen al estado de «tumor dormido»: ausencia de vascularización de las células tumorales, dependencia de los factores de crecimiento del huésped, y freno o contención inmunológica, y el papel que la heterogeneidad tumoral juega dentro del proceso metastásico.

Por último, comentamos algunos aspectos sobre cinética de la proliferación celular y crecimiento tumoral señalando la importancia de la fase G1 del ciclo, desde la que las células pueden entrar en estado de quiescencia (G0), evitando ser atacadas por la quimioterapia actual. Junto a lo anterior incidimos en algunos de los parámetros de agresividad tumoral haciendo hincapié en la actividad de la telomerasa, relacionada con la inmortalidad celular y el cáncer, e identificada en la mayoría de los tumores malignos.

Palabras clave: Metástasis. Angiogénesis tumoral. Tumor dormido. Heterogeneidad tumoral. Telomerasa.

CONCEPCIÓN ROMÁN CURTO
MIGUEL ARMIJO MORENO¹ †
Sección de Dermatología del Hospital Nuestra Señora de Sonsoles. Ávila. ¹Cátedra de Dermatología Médico-Quirúrgica y Venereología. Facultad de Medicina. Universidad de Salamanca. Salamanca.

*Esta revisión es una parte de la introducción de la Tesis Doctoral: Tumores cutáneos metastásicos. Estudio clínico, histológico y ultrares fructural que obtuvo el premio Smith-Klein Beecham 1997, a la mejor Tesis Doctoral.

Correspondencia:

CONCEPCIÓN ROMÁN CURTO. Álava, 1. 37001 Salamanca.

Aceptado el 17 de junio de 1997.

EXTRAVASACIÓN EN EL ÓRGANO DIANA (cuarta etapa)

Dentro del proceso de diseminación hemática una vez que las células tumorales se han detenido en el lecho vascular del órgano diana, deberán extravasarse para acceder al parénquima de dicho órgano.

Durante las primeras décadas de este siglo los debates se centraron en si eran las arteriolas (1) o los capilares (2) el lugar preferencial de extravasación de las células tumorales. Fueron Baserga y Saffiotti (3), quienes, basándose en estudios de microscopía óptica, demostraron que la extravasación podía tener lu-

gar en ambos lechos vasculares, siendo más frecuente (66%) a nivel de los capilares.

De estudios posteriores se deducen esencialmente dos patrones diferentes de extravasación: a) la que tiene lugar mediante migración activa de las células tumorales, por diapédesis, siguiendo la migración de los leucocitos (4, 5) o sin relacionarse con la extravasación de éstos (6), y b) la que se realiza a través de la disrupción mecánica de la pared vascular, causada por la proliferación intravascular de las células tumorales (7, 8).

Los estudios realizados por Chew y cols. (9) mediante microscopía electrónica revelaban, entre otros, los si-

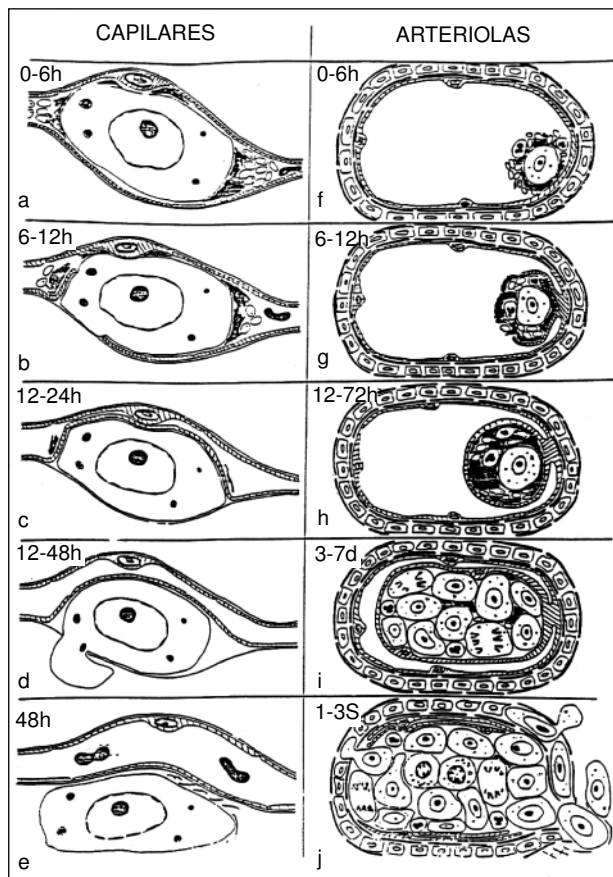


FIG. 1.—Proceso de extravasación tumoral en capilares y arteriolas. Modificado de Lapis y cols. (10).

guientes resultados: a) Las plaquetas se encontraban casi siempre asociadas a las células tumorales cuando llegaban a los vasos del órgano diana, observándose generalmente como una «cola» en un polo de la célula. b) La fibrina aparecía habitualmente en pequeños depósitos y generalmente se encontraba localizada en el centro de la masa plaquetaria. c) La masa plaqueta/fibrina se desintegraba cuando las células tumorales se paraban en el lecho vascular dejando a las células «desnudas», y éstas se adherían estrechamente al endotelio. Cuando se administraba fibrinolisina antes de la inyección de las células tumorales, se unían muy pocas plaquetas a ellas, y los depósitos de fibrina eran inestables. d) Después de un tiempo, diferente según los tipos tumorales, las células pasaban al espacio extravascular, no mediante diapédesis sino por destrucción primero del endotelio y después de la membrana basal en diferentes puntos. e) Había multiplicación de las células tumorales de forma continuada, durante todo el proceso, hasta que se formaba un grupo celular extravascular.

Aunque éste y otros estudios fueron aclarando, desde el punto de vista estructural, los mecanismos de ex-

travasación de las células tumorales, fueron Lapis y cols. (10) quienes mejor han sistematizado y sobre todo diferenciado los fenómenos que acontecen a nivel de los capilares y de las arteriolas durante el proceso de extravasación tumoral. Las observaciones realizadas mediante microscopía electrónica fueron las siguientes (Fig. 1).

Extravasación capilar

El primer fenómeno observado fue el depósito de fibrina entre la superficie libre de la célula tumoral detenida y la superficie luminal del endotelio; a él se sumaban las plaquetas en su mayoría degranuladas. Este trombo, rodeando a las células tumorales, podía persistir desde 5-30 minutos hasta 6-12 horas y la desaparición de la agregación plaquetaria iba seguida por la lisis de los depósitos de fibrina. En muchas ocasiones las células tumorales parecían no estar estrechamente unidas a las endoteliales ya que se observaba una fina hendidura entre los dos tipos celulares. En ningún momento se vieron figuras mitóticas de las células tumorales dentro de los capilares. Pasadas 6-12 horas las células neoplásicas inducían la retracción de las células endoteliales, habitualmente a nivel de las uniones entre dos células endoteliales vecinas, observándose células tumorales en íntimo contacto con la membrana basal (MB), al principio en pequeños puntos, y luego en más amplias superficies. Mientras tanto, una hilera endotelial carente de MB se iba desplazando hasta cubrir la superficie opuesta quedando en este momento la célula tumoral entre el endotelio y la MB. Hacia las 24 horas, las células tumorales inducían lisis focal de la MB y, mediante la emisión de pseudópodos pasaban al espacio extravascular jugando aquí la locomoción ameboide de las células tumorales un papel importante. A las 48 horas de la inyección, no se observaban células tumorales en los capilares encontrándose todas las supervivientes en una posición extravascular. Dos o tres días después, con la aparición de figuras mitóticas, se iniciaba la proliferación extravascular de dichas células apreciándose micrometástasis a los cuatro-cinco días de la extravasación.

Extravasación arteriolar

Los fenómenos que acontecen tras la parada del trombo tumoral a nivel de las arteriolas y grandes vénulas son completamente diferentes a los que suceden a nivel del lecho capilar.

De 6 a 12 horas después de la inyección de células tumorales, el depósito de agregados plaquetarios decrece y algunos de los trombos se disuelven. No se observa en

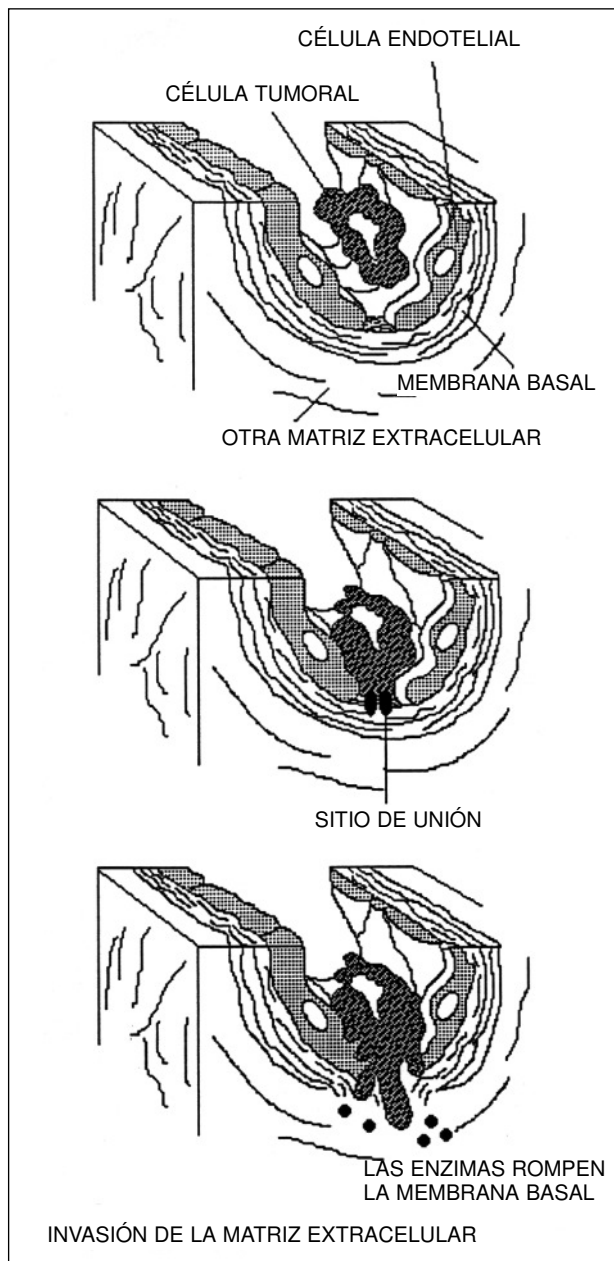


FIG. 2.—Mecanismo de extravasación de las células tumorales. Modificado de Liotta (11).

ningún punto la retracción endotelial que veíamos en el lecho capilar. En este período de tiempo las células endoteliales en contacto con el trombo persistente van cubriendo la superficie de éste, primero por extensión de sus procesos celulares y posteriormente por proliferación hasta que una hilera endotelial continua, carente de MB, lo rodea completamente. Esta nueva capa endotelial está en íntimo contacto con la hilera endotelial que rodea la luz del vaso en uno o varios puntos. A partir del tercer día, se aprecia proliferación de células tumorales, demostrada por la presencia de mitosis, y co-

mienza a aumentar el tamaño del trombo; de forma paralela se observa proliferación de las células endoteliales que lo cubren lo que permite que continúen rodeándolo en su totalidad. Las células tumorales siguen dividiéndose hasta llenar completamente la luz vascular; este proceso dura, a nivel de grandes arteriolas y pequeñas arterias, aproximadamente dos semanas. Transcurrido este tiempo, comienza a observarse necrosis en el centro del trombo tumoral y ruptura de la hilera endotelial en diferentes puntos, probablemente debido a una atrofia por compresión, lo que posibilita el contacto de las células tumorales con la MB y la lisis posterior de ésta, tras lo cual las células tumorales migran por diapédesis a través de hendiduras naturales de las elásticas interna y externa, al espacio extravascular. Aunque la disrupción de las elásticas parece producirse de forma mecánica no puede descartarse la intervención de enzimas proteolíticos.

Las células tumorales, para poder extravasarse, bien en los capilares continuos o en las arteriolas, deberán invadir la membrana basal. Liotta (11) sintetiza dicho proceso en tres pasos. El primero consiste en la adhesión a la membrana basal de las células tumorales, la cual se produce a través de receptores específicos de superficie de estas células para algunos componentes de dicha membrana. El segundo se basa en la destrucción o desestructuración de las moléculas de la membrana basal, mediante activación de enzimas proteolíticos. El tercer paso conlleva la migración de las células tumorales a través de la zona de lisis, efectuando movimientos ameboides mediante la emisión de pseudópodos (Fig. 2).

Estos tres pasos deben estar perfectamente sincronizados de manera que, en palabras del propio Liotta (11): «A medida que avanza el frente de la superficie celular tumoral y activa las enzimas destructivas para romper las moléculas de las proteínas que obstruyen su paso, la retaguardia tumoral debe permanecer firmemente asida a la matriz extracelular. Una vez que el camino por delante queda expedito, la célula tumoral debe dejar en suspenso la actividad destructiva de sus enzimas y permitir así su propio avance. Este cambio es necesario porque, para proseguir en su avance, la célula tumoral invasora debe asirse a la matriz en el sentido de la marcha, contraerse hacia delante y desenganchar cualquier tipo de uniones en su retaguardia. En otras palabras, una célula tumoral invasora debe simultáneamente perforar un túnel, agarrarse a las paredes de ese túnel y autopropulsarse hacia delante.»

Si bien dicho comportamiento invasivo es presumiblemente similar al utilizado por las células normales en la remodelación de tejidos o durante la embriogénesis, entre otros, la regulación del mismo en las células tumorales escapa a todo control (11).

PROLIFERACIÓN EN EL ESPACIO EXTRAVASCULAR (quinta etapa)

Una vez que las células tumorales se han extravasado y han alcanzado un tamaño en su conjunto de 0,5-1 mm³ necesitarán para su futuro crecimiento y desarrollo, además de la presencia de factores de crecimiento tanto paracrinos como autocrinos, la existencia de una nueva red vascular que asegure el aporte de nutrientes. De lo contrario, la pequeña colonia tumoral será destruida o permanecerá quiescente, en un estado de latencia conocido como «tumor dormido», del que luego nos ocuparemos.

Angiogénesis tumoral

La llamativa vascularización de los tumores sólidos era un hecho reconocido desde hacía casi un siglo, pero durante mucho tiempo los progresos realizados en el conocimiento de ese fenómeno fueron escasos debido a la falta de un sistema experimental válido que permitiera su estudio (12).

Para probar la teoría de que el crecimiento tumoral dependía de la angiogénesis se implantaron tumores, separados de su lecho vascular, en el seno de la cámara anterior del ojo de un conejo, flotando en el humor acuoso; a los 14 días alcanzaban volúmenes de 0,5-0,6 mm³ y detenían su crecimiento. Cuando esos tumores se implantaban en el lecho vascular del iris, se vascularizaban al tercer día, alcanzando un volumen medio de 330 mm³ en el mismo tiempo. Así pudo apreciarse la gran limitación que experimentaba el crecimiento tumoral en ausencia de vascularización. Con anterioridad Folkman y cols. (13) habían sugerido que la proliferación capilar en el seno de un tumor era algo mediado por un factor angiogénico segregado por la propia neoplasia. Dicho factor debía tener carácter difusible ya que la inducción de nuevos vasos continuaba cuando se interponía un filtro *millipore* entre el tumor y su lecho vascular. Tras las primeras observaciones, se desarrollaron diferentes modelos experimentales encaminados a reforzar la hipótesis y a encontrar técnicas cuantitativas adecuadas; todo ello desembocó en el concepto actual de neovascularización tumoral.

Hoy es universalmente aceptado que, una vez que las células tumorales tras extravasarse se implantan en el tejido del huésped, deberán tener un aporte nutritivo suficiente para proliferar. En etapas iniciales del desarrollo, pueden nutrirse por imbibición hasta alcanzar 1-2 mm de diámetro, precisando para su posterior crecimiento la presencia de una red vascular

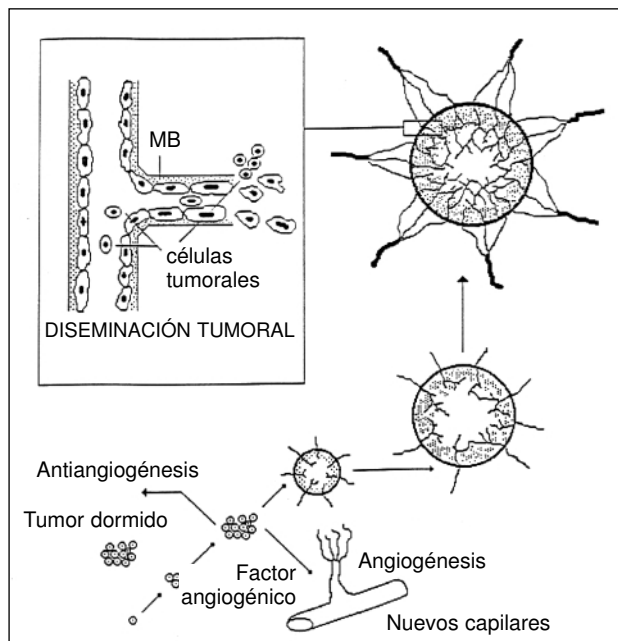


FIG. 3.—Angiogénesis tumoral. Modificado de Schirrmacher (12).

que se desarrolla mediante un complejo proceso denominado angiogénesis tumoral (14, 15, 16).

La vascularización de la colonia metastásica se realiza a través de los vasos del huésped en respuesta a estímulos angiogénicos derivados fundamentalmente de las células tumorales, aunque también pueden proceder de las células del huésped (15). La secuencia de la angiogénesis tumoral consta de los siguientes pasos (12, 14, 15, 16) (Fig. 3): a) Activación de las células endoteliales existentes en los capilares o pequeñas vénulas del huésped, cercanos al nuevo implante tumoral. b) Degradación local de la MB por las propias células endoteliales, en el lado del vaso situado hacia el estímulo angiogénico. Estas células activadas por las sustancias angiogénicas producen enzimas degradativas (serino y metaloproteinasas), igual que las mismas células tumorales (15). c) Proliferación de células endoteliales y pericitos y migración quimiotáctica de las primeras en dirección al estímulo angiogénico. d) Alineación de las células endoteliales entre sí, con el objeto de formar un brote capilar, dando lugar a un crecimiento longitudinal término-terminal manteniendo su polarización continuamente y permaneciendo en contacto con la célula endotelial del vaso original, con la consiguiente formación de cordones sólidos (16). e) Creación de una luz vascular, mediante la formación de vacuolas autolíticas entre las células endoteliales (14). Dicha luz siempre permanece en conexión directa con la luz del vaso del que proceden. f) Formación de yemas vasculares que posteriormente se ex-

panden y asumen una estructura tubular (17). Una vez que se han formado, comienzan a producirse mitosis en las células endoteliales a nivel de la zona media de la yema mientras que las primeras células, situadas en el extremo distal del brote vascular, habitualmente no se dividen (15). g) La proliferación endotelial permite la formación de asas vasculares mediante anastomosis de una yemas con otras y el comienzo del flujo sanguíneo a ese nivel dando lugar a la formación de una red circulatoria funcionante (17). Mientras tanto, las asas continúan convergiendo sobre el foco de actividad angiogénica. h) Formación de capilares maduros cubiertos por una membrana basal bien definida y rodeada por algunos pericitos. Paku y Paweletz (16) asumen que durante el crecimiento de nuevos capilares, la lámina basal se sintetiza constantemente por las células endoteliales polarizadas y exhibe la misma densidad electrónica baja que la lámina basal alterada, que existe alrededor del vaso de origen en la zona de salida del nuevo brote capilar, así se garantiza un soporte para la migración y división de las células endoteliales. El final de la división y migración de éstas y de los pericitos puede deberse al desarrollo de una membrana basal electrodensa alrededor del vaso de origen y de los capilares neoformados.

De lo anterior se deduce que las células endoteliales, una vez que han recibido un estímulo angiogénico, pueden desarrollar un sistema que lleva a la formación de una red capilar completa. Dicho estímulo parece similar para señales angiogénicas procedentes tanto de células tumorales como de lesiones inflamatorias o de estímulos inmunológicos; sin embargo, mientras la angiogénesis inducida en estos dos últimos supuestos es limitada, la tumoral es ilimitada (15).

Además, conviene tener en cuenta que los capilares neoformados en el lecho tumoral, tal y como comentamos con anterioridad, tienden a ser más indiferenciados e inmaduros que los capilares en tejidos normales por lo que pueden ser invadidos con mayor facilidad por las células tumorales (15). Por lo tanto, a través de la red vascular desarrollada en un tumor secundario se facilita aún más la entrada de nuevas células tumorales en la circulación y con ello la formación de «metástasis de metástasis» o «remetástasis» (11).

Las metástasis, así como el crecimiento rápido e invasivo de las neoplasias malignas, parecen estar también relacionados con la neovascularización del tumor primitivo. Esto es muy evidente en el melanoma: aquellos tumores con un espesor de menos de 0,7 mm no están vascularizados, presentan un crecimiento lento y tiene escasas o nulas posibilidades de metastatizar, al contrario de lo que sucede con los vascularizados (15). De la misma forma, la angiogénesis, en ciertos casos,

sirve como marcador de transformación maligna en algunas lesiones benignas como la hiperplasia papilar de la mama, habiéndose demostrado que las lesiones con una gran capacidad de transformación maligna inducían angiogénesis en una proporción mucho mayor que las que presentaban escasa propensión a la malignización y además lo hacían mucho antes de que existiese cualquier signo morfológico de transformación maligna (18).

Se han descrito factores potenciadores e inhibidores de la angiogénesis tumoral. Entre los primeros se encuentran las células cebadas y la heparina que, aunque no logran inducir angiogénesis por sí mismas, pueden potenciar el crecimiento capilar, estimulando ambas la emigración de las células endoteliales (15). Otros factores angiogénicos conocidos en la actualidad son los factores de crecimiento fibroblástico (FGF) alfa y beta, el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), el factor de crecimiento de la célula endotelial derivado de las plaquetas (PD-ECGF), los factores de crecimiento transformante (TGF) alfa y beta, la angiogenina y el factor de necrosis tumoral (TNF) alfa (19).

Muchos agentes angiogénicos, como el factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF), tienen en común una triada específica de estimulación multifuncional de las células endoteliales, que afecta a la motilidad, proteólisis y crecimiento. La motilidad se precisa para la quimiotaxis de las células endoteliales hacia el lugar del estímulo angiogénico y la alineación de éstas durante la formación los brotes vasculares. La proteólisis es necesaria para que los brotes capilares puedan penetrar en la matriz extracelular y se produzca la expansión lateral que permita la formación de la luz vascular. Por último el crecimiento endotelial se precisa para el desarrollo de la red vascular. Estas propiedades son comunes a las de las células tumorales invasivas pero, a diferencia de éstas, las células endoteliales revierten a un estadio no angiogénico cuando desaparece el estímulo que indujo a la neoformación vascular (17).

Una vez demostrada la necesidad de un soporte vascular para el crecimiento tumoral, comenzó a pensarse en la posibilidad de hallar factores antiangiogénicos que pudieran frenar su desarrollo. Ciertas observaciones clínicas, como que el cartílago casi nunca era invadido por los tumores tanto primitivos como metastásicos que afectaban al hueso adyacente, llevaron a pensar que en caso de existir algún inhibidor de la angiogénesis podría encontrarse a dicho nivel, hecho que fue confirmado con posterioridad al demostrar que un implante de cartílago colocado en las proximidades de un tumor en la córnea de conejo in-

hibía el crecimiento de nuevos vasos hacia el tumor (20). Más tarde también se demostró que el cartílago contenía inhibidores de las colagenasas segregadas por las células tumorales, añadiéndose a su efecto antiangiogénico un efecto anti-invasivo (21).

Al igual que sucede con las células tumorales durante el proceso de invasión, los inhibidores de las serino y metaloproteinasas [especialmente el de la colagenasa tipo IV y el factor inhibidor derivado del cartílago (CDI)] pueden bloquear la angiogénesis e inhibir la proliferación endotelial (17, 21). Entre los inhibidores endógenos de la angiogénesis se encuentran la trombospondina, el factor inhibidor derivado del cartílago, los inhibidores tisulares de las metaloproteinasas TIMP1 y TIMP2, el factor plaquetario 4 y los interferones alfa y beta (22), que pueden actuar por múltiples mecanismos y en cuyo estudio detallado no nos vamos a detener; sólo comentar que mientras el interferón alfa ha dado buenos resultados en el tratamiento de hemangiomas en los niños, ha sido menos efectivo y más tóxico cuando se ha usado como agente antiangiogénico en pacientes mayores (23). A esto hay que añadir el que tanto la protamina, por su efecto inhibidor de la heparina (24), como la prostaciclina, que posee una acción antiagregante plaquetaria (25), y paradójicamente la combinación heparina-cortisona pueden inhibir la angiogénesis de forma experimental, habiéndose observado regresión completa en ciertos tumores animales cuando son tratados con estos últimos factores antiangiogénicos (26).

Junto a los anteriores parecen perfilarse como dos de los inhibidores endógenos más potentes de la angiogénesis: una proteína que bloquea una integrina localizada en la superficie de las células endoteliales en crecimiento (conocida como $\alpha_v\beta_3$) y la angiostatina (que es un fragmento del plasminógeno) (27, 28).

En los últimos años han sido muchos los esfuerzos realizados intentando en contrar agentes farmacológicos o estrategias que permitan frenar el crecimiento metastásico bloqueando la angiogénesis tumoral. Se basan en la hipótesis de que probablemente será más eficaz el control de las etapas finales del proceso metastásico, que el de las iniciales o intermedias y tienen en cuenta además la escasa frecuencia con la que se produce neoangiogénesis en los tejidos normales y por tanto la mínima repercusión que este tratamiento tendría en ellos (22).

Basándose en la capacidad antiangiogénica de la combinación heparina-cortisona e intentando evitar sus importantes efectos secundarios que los inhabilitan para el tratamiento en humanos, se han desarrollado varios compuestos sintéticos análogos a la heparina como el pentosan polisulfato (PPS) entre otros, sin haberse hallado

hasta el momento uno que posea la eficacia deseada unida a escasa o nula toxicidad. Entre los factores capaces de inhibir la angiogénesis por un mecanismo diferente al de la unión con la heparina se encuentran el antibiótico fumagilina y su análogo sintético el TNP-470, además de un anticuerpo monoclonal contra el bFGF capaz de suprimir tanto la angiogénesis como el crecimiento tumoral en ratones (22). La administración crónica a dosis no tóxicas del interferón alfa ha sido de utilidad. Por otro lado Szmurlo y cols. (29) han demostrado también de forma experimental el efecto antitumoral del Acitretin, pero no del tretinato, mediante inhibición de la angiogénesis tumoral.

Proliferación de la colonia metastásica

Una vez conseguida una red vascular capaz de nutrir la, la nueva colonia tumoral deberá proliferar utilizando tanto factores de crecimiento paracrinos, existentes en el órgano colonizado, como autocrinos, producidos por las propias células tumorales. Existe además una sensibilidad alterada por parte de las células neoplásicas tanto a los factores normales de crecimiento como a sus inhibidores que hace que el crecimiento en algunos tumores sea aún mayor de lo que cabría esperar (30).

La nueva colonia tumoral también deberá evadirse del sistema defensivo del huésped burlando la vigilancia de macrófagos, células *natural killer*, y linfocitos T activados, lo que puede conseguir, entre otros medios perdiendo o bloqueando los antígenos tumorales específicos (17).

TUMOR DORMIDO

Tumor dormido es aquel que persiste durante un período prolongado de tiempo sin incrementar su tamaño, o haciéndolo de forma muy escasa, en un huésped clínicamente normal. Son muchos los ejemplos existentes en la literatura de metástasis detectadas varios años e incluso décadas después de la extirpación del tumor primitivo (31-33).

El estado de tumor dormido puede producirse al menos por tres mecanismos diferentes: a) falta de vascularización de las células tumorales lo que limita su desarrollo debido al déficit de nutrientes; b) dependencia constitucional de los factores de crecimiento del huésped; y c) freno o contención inmunológica que hace que la relación de crecimiento iguale a la de muerte celular, con lo que el tamaño tumoral no se modifica (12).

El secuestro de las células tumorales en una cápsula formada por los tejidos del huésped puede inhibir también la proliferación o invasión tumoral. En estos tumores, el compartimento intersticial parece ser un medio adecuado para la viabilidad pero no para el crecimiento de su población celular (34); sin embargo, al modificarse las condiciones de dicho medio, por maniobras quirúrgicas, traumatismos o radioterapia se ha observado un crecimiento llamativo de las metástasis.

El control inmunológico del tumor dormido supone un delicado balance que depende de las propiedades del huésped (microambiente local, *estatus* del sistema inmune) y de las inherentes al tumor (inmunogenicidad, capacidad metastásica), pudiendo revertir de dicho estado no sólo mediante inmunosupresión sino también mediante inmunoestimulación, lo que tiene importantes connotaciones terapéuticas.

Por último, se ha demostrado experimentalmente que las metástasis pueden crecer cuando disminuyen los niveles de factores antiangiogénicos endógenos. Así O'Reilly y cols. (28) observaron que la angiostatina liberada por un gran tumor primitivo en el ratón frenaba el crecimiento de una metástasis pulmonar; tras la extirpación del tumor primitivo la angiostatina circulante disminuyó ostensiblemente y el crecimiento de la metástasis se disparó. Todo lo anterior concuerda con lo observado en ocasiones en la clínica. Aunque sea de forma excepcional, casi todos hemos tenido ocasión de comprobar que tras la extirpación de un tumor primitivo (sirva como ejemplo un melanoma de varios años de evolución) comienzan a desarrollarse metástasis hasta entonces latentes.

Este intrigante fenómeno demuestra que las interacciones huésped-tumor pueden mantenerse en un estado de equilibrio durante períodos prolongados de tiempo. El conocimiento profundo de estas interacciones y de los factores que condicionan la finalización del estado de tumor dormido podrían ser de gran ayuda para el control del proceso metastásico (12).

HETEROGENEIDAD TUMORAL

Las características que constituyen el sello de identidad del proceso metastásico son su heterogeneidad, inestabilidad y redundancia (22).

La heterogeneidad tumoral tiene una gran trascendencia dentro del proceso metastásico, especialmente por las implicaciones terapéuticas que comporta, ya que dicha heterogeneidad puede constituir el mayor obstáculo para el tratamiento eficaz de los tumores diseminados (35).

Koch (véase Fidler y Hart (36)) fue el primero en sugerir que células con alto potencial metastásico podían ser aisladas a partir de un tumor heterogéneo mediante un proceso de selección. Pero fueron Fidler y Kripke (37) los que aportaron la primera evidencia experimental de que los tumores malignos contenían subpoblaciones celulares con diferente capacidad metastásica. Para ello dividieron en dos partes una suspensión celular de melanoma B16, una de ellas se administró vía intravenosa a ratones singénicos C57BL/6 y la otra se utilizó para producir clones (cada uno derivado de una célula individual aislada desde el tumor primario) que a continuación fueron administrados por la misma vía a idéntico tipo de ratones. Si el tumor hubiera estado formado por células con el mismo potencial metastásico cada una de las líneas clonales hubiese producido el mismo número de metástasis en los diferentes animales; sin embargo difirieron notablemente en su capacidad metastásica, observándose además en las poblaciones clonales grandes diferencias en cuanto al número y localización de las metástasis extrapulmonares. A través de estos estudios quedó demostrada la heterogeneidad del tumor primitivo y la existencia en él de variantes de células tumorales altamente metastásicas. Dichos resultados fueron corroborados con posterioridad mediante estudios experimentales en jóvenes ratones desprotegidos (*nude*), usando varias líneas tumorales humanas y tumores aislados en fresco (4, 38). Poste y Fidler (39) demostraron además que las sublíneas clonales obtenidas no del tumor primitivo sino de las propias metástasis presentaban un potencial metastásico mucho más uniforme, lo que en principio sugería que las metástasis, al contrario que el tumor primitivo, estaban constituidas por una población celular más homogénea y con capacidad metastásica semejante.

Múltiples experimentos llevados a cabo en diferentes sistemas tumorales han demostrado que, durante los sucesivos procesos de selección que ocurren *in vivo* se origina en los focos metastásicos una población celular en general con potencial metastásico mayor que el existente en las células de la población celular de origen. En este tipo de selección que sucede *in vivo*, el incremento del potencial metastásico es atribuido al gran enriquecimiento de células metastásicas con cada uno de los pasos sucesivos del proceso tumoral (40). Aunque lo anterior es innegable, también hemos de tener en cuenta que durante los procesos de evolución y progresión tumoral, que ocurren a nivel del tumor primitivo y de sus metástasis, pueden generarse tanto poblaciones celulares con mayor como con menor potencial metastásico. Esto se hace aún más evidente en las líneas celulares con mayor capacidad me-

tastásica debido a la incrementada relación de mutaciones espontáneas que condiciona una mayor inestabilidad genética del fenotipo metastásico (35).

Se ha demostrado que las poblaciones celulares tumorales policlonales o heterogéneas presentan una estabilidad genética mayor que las clonales u homogéneas, probablemente debido a que las diferentes subpoblaciones celulares, en las primeras, actúan estabilizando sus proporciones relativas e imponiendo un equilibrio en el conjunto tumoral. La destrucción del efecto estabilizante mediante el aislamiento de clones o tras el tratamiento con quimioterapia, dará lugar a una rápida diversificación de las poblaciones que resurjan lo que se conoce como «estímulo yatrogénico de heterogeneidad» (38). El mantenimiento de la heterogeneidad tumoral puede tener las ventajas de la multiformidad sin las desventajas de la sobreespecialización (35).

Estudios experimentales han demostrado el origen clonal (monoclonal) de muchas metástasis producidas por la proliferación de una única célula tumoral (41). La heterogeneidad celular con relación al fenotipo metastásico se produce pronto tanto en tumores de origen multicelular, como el carcinoma de colon, como en los de origen unicelular siendo atribuible en estos últimos al proceso de evolución y progresión tumoral (35).

Se ha observado también heterogeneidad entre el tumor primitivo y sus metástasis en relación a diferentes características como cariotipo celular, contenido de receptores hormonales, inmunogenicidad o antigenicidad, y respuesta a los agentes quimioterápicos (42), habiéndose detectado también dicha diversidad biológica entre las diferentes metástasis que proliferan en un mismo huésped e incluso en un mismo órgano (4).

La heterogeneidad tumoral, como comentábamos antes, tiene importantes implicaciones en el tratamiento debido a la diferente respuesta de las lesiones primarias y las metastásicas frente a los agentes terapéuticos. Los métodos para definir la sensibilidad a un fármaco en las tumoraciones animales experimentales, basadas en la concepción de que los tumores transplantables son homogéneos y responden de forma uniforme al tratamiento con fármacos deberán ser abandonados. Además, la respuesta de las células tumorales a los agentes citotóxicos puede estar influida por el lugar de crecimiento lo que deberá tenerse en cuenta a la hora de evaluar experimentalmente cualquier tratamiento. Clínicamente se observa con relativa frecuencia la remisión de algunas metástasis en un órgano mientras que otras, en diferentes órganos del mismo individuo, no responden a la misma terapéutica (36).

Por otro lado la heterogeneidad inmunológica existente entre las células del tumor primitivo y las de sus metástasis generará importantes problemas para el tratamiento mediante inmunoterapia específica, existiendo más posibilidades para la inmunoterapia inespecífica. En esta línea se han demostrado las propiedades tumorocidas de los macrófagos activados que, puesto que lisan las células tumorales con independencia del fenotipo celular, podrán burlar o superar la heterogeneidad tumoral, abriendo una vía importante en el tratamiento inmunoterápico de las metástasis (43).

Un notable problema derivado de la heterogeneidad tumoral es que la destrucción de la población celular dominante (quimiosensible) en un tumor pueda permitir o promover la posterior proliferación desenfrenada de las células resistentes al fármaco. El carcinoma de células pequeñas del pulmón, constituye entre otros, un ejemplo de esta forma fenotípica de resistencia farmacológica ya que mientras el tumor primitivo es generalmente sensible a la quimioterapia sus frecuentes recidivas suelen ser resistentes al tratamiento (36).

De todo lo anterior se deduce que tras la teórica respuesta completa de un tumor al tratamiento inicial, para evitar la rápida diversificación celular de las posibles micrometástasis y conseguir su erradicación total, deberán utilizarse pronto y sucesivamente diferentes alternativas terapéuticas (38).

INMUNIDAD Y METÁSTASIS

Regresión tumoral espontánea

La desaparición completa de un tumor confirmado histológicamente, en ausencia de tratamiento, constituye el mejor ejemplo de control del desarrollo tumoral por parte del huésped. Se han observado casos de regresión espontánea en la mayoría de los tumores humanos, concentrándose sin embargo dicho fenómeno fundamentalmente en cuatro tipos tumorales: melanoma maligno, hipernefroma, coriocarcinoma y neuroblastoma. Tanto en el melanoma maligno como en el hipernefroma los fenómenos regresivos se han asociado con rechazo inmunológico; así los fenómenos de regresión parcial o total de los melanomas malignos conllevan la presencia de un denso infiltrado linfocitario subyacente que desaparece después de la regresión tumoral. Otros eventos, como inducción a la diferenciación, observada en neuroblastomas y linfomas, o la privación de nutrientes también pueden explicar los cambios regresivos (12).

Inmunidad celular y metástasis

Se ha intentado establecer el papel de la antigenicidad de las células tumorales en la formación de las metástasis. Mediante estudios experimentales con tumores de diferente capacidad inmunógena en ratones singénicos, normales, inmunodeprimidos y con restitución inmunológica se ha llegado a la conclusión de que no pueden efectuarse generalizaciones acerca de la naturaleza de la diseminación metastásica ni de la respuesta inmune (44). Dichos experimentos apoyan no obstante la teoría emitida por Prehn (45) de que la respuesta del sistema inmunitario frente a los tumores es fundamentalmente de dos tipos (43): cuando el tumor es escasamente inmunógeno o en estadios iniciales del proceso tumoral la respuesta es estimulante, mientras que en tumores altamente antigénicos el sistema inmune produciría una inhibición del crecimiento tumoral. Estas observaciones experimentales tienen una gran importancia clínica a la hora del tratamiento inmunoterápico de los tumores malignos, ya que si son débilmente inmunógenos la estimulación del sistema linfocítico T podría desencadenar el efecto contrario al deseado y producir un aumento importante de la progresión tumoral (36).

Inmunidad inespecífica

La respuesta inmunitaria natural o inespecífica es llevada a cabo por los macrófagos, anticuerpos naturales, leucocitos polimorfonucleares y células *natural killer* (NK) (12).

La función de las células NK no está restringida por el complejo mayor de histocompatibilidad y carecen de memoria. Su acción es selectiva, ya que se realiza habitualmente frente a las células tumorales o a células alteradas por cultivos prolongados, intensa y precoz, porque su presencia en sangre periférica se observa a los cuatro o cinco días de la estimulación antigénica. Son estimuladas por el interferón y la interleucina-2 e inhibidas por la prostaglandina E₂ (46).

Si el sistema inmune controlase el desarrollo tumoral, los animales inmunodeficientes (timectomizados o desprotegidos) deberían presentar un aumento ostensible de neoplasias, lo que de forma experimental se ha demostrado que no sucede. Ello se atribuye al llamativo aumento y a la incrementada actividad en estos animales de las células NK. Los niveles de células NK aumentan con la edad, se ha observado que el implante subcutáneo, intramuscular o intravenoso de células tumorales en ratones desprotegidos de tres semanas dan lugar a la posterior formación de metástasis, sin embargo en animales de edad superior o igual a las seis

semanas, momento en que se elevan los niveles de dichas células, las metástasis disminuyen llamativamente. Esto se ha corroborado estimulando artificialmente la actividad de las células NK con interferón en ratones de tres semanas y observando la disminución de las metástasis que acompañan a dicha estimulación (36).

Por otro lado se ha demostrado que las células NK son capaces de destruir las células tumorales circulantes *in vivo* antes de su extravasación mientras que ejercen un efecto inhibitorio mínimo una vez que se han establecido las micrometástasis (47). Además no todas las células tumorales son susceptibles a la lisis mediada por las células NK y se ha observado un aumento de resistencia a estas células citotóxicas por parte de las células aisladas de las lesiones metastásicas cuando se las compara con las de los tumores primitivos. Las células tumorales pueden protegerse durante su diseminación por el torrente circulatorio de las NK mediante la agregación plaquetaria y el revestimiento por fibrina. Incluso ha llegado a sugerirse que los fármacos anticoagulantes pueden ejercer más su efecto antimetastásico haciendo a las células tumorales más vulnerables a la acción de las células NK, que bloqueando su unión al endotelio vascular (12).

Aunque experimentalmente se ha demostrado que los leucocitos polimorfonucleares y los anticuerpos naturales pueden contribuir a las reacciones de defensa natural del organismo en algunos tumores metastásicos, mucha mayor importancia tiene el papel desempeñado por el sistema fagocítico mononuclear. Los macrófagos tienen una potente actividad antitumoral, poseen receptores para el fragmento Fc de las inmunoglobulinas y son capaces de liberar el factor de necrosis tumoral, pero para poder ejercer sus funciones citostáticas y/o tumoricidas deben ser activados por linfocinas derivadas de las células T como el factor activador macrófágico (MAF) u otros factores. Una de las estrategias más prometedoras para controlar la activación tumoricida de los macrófagos *in situ* la constituye el uso de liposomas que con tienen factores activadores macrófágicos, tanto MAF como muramil dipéptidos. La colocación de dichos liposomas a nivel de los focos tumorales se contempla como una herramienta importante en el tratamiento antimetastásico (48).

La heterogeneidad tumoral implica también a las propiedades inmunológicas de las células neoplásicas. Se han hallado diferencias antigénicas entre los tumores primitivos y sus metástasis, probablemente debido a la selección inmune efectuada durante el desarrollo tumoral (12). El estudio de los datos de diferentes sistemas tumorales sugiere además la coe-

xistencia de determinantes inmunogénicos y supresogénicos en un mismo tumor.

Por otro lado las células tumorales son capaces de desarrollar mecanismos que les permitan escapar de la vigilancia inmunológica, destacando entre otros: a) el enmascaramiento antigénico que se produce cuando algunas moléculas se unen a determinantes antigénicos con lo cual no pueden ser reconocidas; b) la liberación antigénica, según la cual los antígenos liberados pueden saturar la respuesta inmune que no podría actuar contra las células tumorales; c) la tolerancia inmunológica, que se puede ir adquiriendo a través del desarrollo tumoral; y d) la presencia de factores bloqueantes, como la formación de complejos antígeno tumoral-anticuerpo específico que al unirse a los linfocitos T evitan que estos intervengan en la destrucción tumoral (49).

Inmunidad específica

Está mediada fundamentalmente por linfocitos T y se caracteriza por su especificidad y memoria (la segunda exposición a los antígenos tumorales induce una respuesta mayor y más rápida que la exposición inicial), su acción tiene lugar tras el reconocimiento del sistema mayor de histocompatibilidad (50). Datos experimentales en animales sugieren que los linfocitos T en general y los linfocitos T citotóxicos (CTL) en particular pueden jugar un papel importante en el control y rechazo de las metástasis (51).

Los linfocitos T activados son capaces de desarrollar una doble acción; a) la citotóxica, que puede ser directa y específica, desarrollada por los linfocitos T citotóxicos a través de un contacto inmediato, o indirecta a través de los macrófagos o las linfocitotoxina solubles; y b) la productora de linfocinas entre las cuales se puede situar al interferón. Una ampliación de la respuesta inmune se obtiene con la participación de los linfocitos T cooperadores cuya función consiste en favorecer la cooperación entre los elementos inmunocompetentes (linfocitos T, B y macrófagos) mientras que los linfocitos T supresores ejercen una acción supresora directa o indirecta, de tipo específico o inespecífico, regulando su intervención la intensidad de la respuesta inmunitaria (46).

La presencia de infiltrado inflamatorio predominantemente linfocítico en las áreas de regresión de algunos tumores como los melanomas, ha llevado a plantear estrategias terapéuticas mediante cultivo y expansión con interleucina 2 de los linfocitos asociados a tumor y su posterior reintroducción en el paciente a nivel tumoral (52).

Inmunidad humoral

El papel desarrollado por la inmunidad humoral en la evolución de las metástasis no está bien establecido. Se han detectado anticuerpos dirigidos contra antígenos tumorales en muchos tumores experimentales pero en pocos humanos. Algunos estudios han sugerido un papel negativo de la respuesta humoral en el desarrollo de las metástasis, que se produciría a través de factores bloqueantes existentes en el suero de pacientes portadores de tumor, los cuales serían capaces de revertir la citotoxicidad linfocitaria (36). Mediante plasmaféresis se han intentado eliminar los inmuno-complejos formados por exceso de antígeno en el torrente circulatorio para desbloquear la respuesta inmunitaria (46).

CINÉTICA DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR. CRECIMIENTO TUMORAL

Los tumores malignos están formados desde el punto de vista de la cinética celular, por una población en proliferación constante, en la que existe no un crecimiento anormal, ya que las células se dividen mediante los mismos mecanismos que las normales, sino una anomalía en la regulación de dicho crecimiento (53).

Se conoce como ciclo celular al intervalo de tiempo transcurrido entre dos mitosis consecutivas y se divide clásicamente en cuatro fases o estadios: G1 (pre-síntesis), S (síntesis), G2 (premitótica) y M (mitosis). *La fase G1:* Es la fase de reposo tras la mitosis. Su duración es muy variable constituyendo la fase más larga del ciclo y es en ella donde las células de ciclo largo pueden detenerse durante un gran período de tiempo (fase G1 prolongada) o pasar a la fase no proliferativa o quiescente (fase G0) desde la cual pueden reincorporarse al ciclo entrando nuevamente en fase G1 (53-56). Se conoce como punto de restricción al lugar de G1 en que se toma la decisión entre la proliferación y la quiescencia. Las condiciones externas, al menos en las células en cultivo, determinan el mantenimiento de las células en proliferación o su paso a una fase de reposo. Cuanto más adverso sea el medio, mayor será el alargamiento de G1, aun sin entrar en fase G0 (55).

Se considera a la fase G1 como la más importante para el control del crecimiento celular. Los fármacos específicos de ciclo y fase de que disponemos no pueden atacar a la célula durante este estadio, lo que supone que las células en G0 o con un G1 tan prolongado que les sea imposible abandonar dicha fase durante el tiempo de aplicación de la quimioterapia,

sin riesgos vitales para el paciente, sobrevivirán a dicho tratamiento con lo que el tumor no podrá ser erradicado en su totalidad (53, 55). Intentando obviar este problema, se están ensayando en los últimos tiempos nuevos agentes terapéuticos que actúan como modificadores biológicos a diferentes niveles del ciclo celular más que como agentes citotóxicos no selectivos (57).

Por otro lado el efecto protector de la fase G0 puede servir de gran ayuda para la supervivencia de ciertos pacientes tras el tratamiento de algunos procesos malignos. Así, el que las células *stem* de la médula ósea se encuentren en dicha fase permite que se hallen protegidas durante la quimioterapia aplicada en pacientes con leucemias o tumores metastásicos. La deplección de la médula ósea causada por el tratamiento quimioterápico estimula que las células *stem* protegidas entren en ciclo celular y por consiguiente repueblen la médula (56).

Desde el punto de vista cinético los tumores malignos están constituidos por una población celular en proliferación constante que tiene similitudes con las del compartimento de células en proliferación continua existente en los mamíferos. Se ha comprobado que en las primeras etapas del desarrollo tumoral las células se multiplican de forma exponencial, lo que supone que todas se encuentran en estadio proliferativo y no existen pérdidas; pero a medida que el tumor aumenta de tamaño lo hace también el tiempo de duplicación, es decir, tarda más en duplicar su volumen de lo que cabría esperar si creciera de forma exponencial pudiendo llegar incluso a un aplanamiento de la curva de crecimiento, lo que matemáticamente se conoce como una función gompertziana.

Entre los diversos factores barajados para explicar el alargamiento del tiempo de duplicación tumoral se encuentran (54): a) Alargamiento del ciclo celular. b) Disminución de la fracción de crecimiento (FC) representada por la proporción de células tumorales en estadio proliferativo consecutiva a un aumento de la proporción de células maduras y/o quiescentes (G0) dentro del tumor. c) Aumento de pérdida celular debido a: i) Fenómenos necróticos, muy frecuentes en tumores grandes por nutrición inadecuada de las células más alejadas de los capilares. No debe olvidarse que se ha comprobado que los tumores presentan zonas de necrosis a unas 150 micras de distancia de los capilares nutrientes. ii) Mitosis defectuosas. iii) Mecanismos defensivos del huésped que, a veces, ocasionan destrucción celular. iv) Desprendimiento de grupos celulares a partir del tumor primitivo para dar lugar a focos metastásicos.

El conocimiento de la curva de crecimiento tumoral tiene importantes connotaciones terapéuticas y pronósticas ya que, cuando un tumor presenta una curva

exponencial de crecimiento, gran número de células serán sensibles a los fármacos específicos de ciclo y de fase, tal y como sucede en los primeros estadios (casi siempre en fase subclínica) de la mayoría de los tumores sólidos y en las leucemias agudas, entre otros.

Las lesiones metastásicas tienen también una curva de crecimiento gompertziana aunque, salvo excepciones, tienden a crecer más rápidamente que el tumor primitivo debido posiblemente, entre otras razones, a estar compuestas por células con mayor potencial maligno y menor capacidad de diferenciación (54).

Es lógico pensar que el tratamiento de los tumores sólidos mejoraría mucho si tuviéramos fármacos eficaces frente a las células quiescentes, o si pudiésemos hacer que éstas entrasen en ciclo, lo que se conoce como fenómeno de reclutamiento. Esto se está intentando de forma experimental reduciendo la masa tumoral para condicionar que las células residuales adquieran una curva de crecimiento exponencial. En esta circunstancia tiene su justificación la cirugía reductora (53).

PARÁMETROS DE AGRESIVIDAD TUMORAL

Como comentábamos en el primer artículo de esta serie, entre un 50 y un 60% de los pacientes presentan ya micrometástasis, la mayor parte de las veces indetectables con los procedimientos diagnósticos actuales, en el momento en que se identifica el tumor primitivo (11, 17, 58, 59). Éstas son habitualmente múltiples y aumentan progresivamente, de manera que la identificación clínica de una de mayor tamaño en algún órgano va acompañada casi indefectiblemente de la existencia de otras micrometástasis ocultas en distintos órganos. Las diferencias en cuanto a tamaño, tiempo de evolución y localización, unido a la heterogeneidad celular que presentan las diferentes metástasis, hacen muy difícil su erradicación por los métodos terapéuticos actuales, de ahí la importancia de encontrar nuevos parámetros pronósticos sobre la capacidad metastásica de un determinado tumor (58).

Un parámetro clásico, utilizado desde hace años y de importancia para ciertos tipos de tumores lo constituye el tamaño tumoral. Así, en los cánceres de mama, colon, recto y en el melanoma, existe una clarísima correlación entre el tamaño tumoral y la existencia de metástasis, mientras que neoplasias como el tumor de células pequeñas de pulmón o el carcinoma prostático, entre otros, presentan una rápida diseminación antes de adquirir un tamaño considerable. La vascularización tumoral podría explicar la correlación entre tamaño y ca-

pacidad metastásica, ya que el número de células tumorales que penetra en la circulación guarda relación directa con el volumen tumoral y la superficie total que presentan los vasos tumorales. No obstante, el hecho comprobado de que la presencia de células tumorales circulantes no indica necesariamente el establecimiento de un foco secundario, hace plantearse otras posibilidades que expliquen dicha correlación. Así se postula el que células con mayor potencial agresivo puedan dar lugar a tumores más activos y de mayor tamaño, o bien que los tumores más grandes presenten al sistema inmunocompetente una masa con mayor capacidad antigénica que la de las células tumorales diseminadas, con lo que se facilitaría el desarrollo de estas últimas, que podrían así escapar a la vigilancia del sistema inmunocompetente (58). Sin embargo el tamaño tumoral no puede considerarse un parámetro de agresividad *per se* ya que no nos permite explicar la diferente capacidad invasiva existente entre tumores como el leiomioma uterino, neoformación benigna que alcanza importantes dimensiones, y los tumores malignos de gran volumen.

Multitud de parámetros como localización anatómica de los tumores, tasa de crecimiento tumoral, cariotipo, cinética de las células tumorales, y mecanismos bioquímicos involucrados en la cascada metastásica, entre otros, están siendo estudiados en orden a poder predecir, con la mayor exactitud posible, la capacidad metastásica de un determinado tumor.

Tras el descubrimiento de genes supresores tumorales como el p53, p16, RB1 (proteína supresora tumoral del retinoblastoma), prohibitina y estatina, entre otros (56), otro evento de especial importancia en el terreno de las metástasis lo constituyó el hallazgo de una proteína potencialmente supresora de la metastatización, conocida como nm23 (no metastásica 23), asociada a un gen que se encontraba ausente o estaba inactivo en las células metastásicas (60), localizado en el brazo corto del cromosoma 17. Niveles bajos de dicha proteína se asociaron inicialmente con la aparición de metástasis en tumores primitivos mamaros, entre otros (61), llegándose a plantear que la determinación de nm23 podría constituir un parámetro de utilidad clínica a la hora de identificar a los pacientes con mayor riesgo para presentar metástasis; sin embargo, estudios posteriores en diferentes tipos tumorales han revelado resultados contradictorios (62).

Uno de los hallazgos más prometedores fue publicado en diciembre de 1994 por Kim y cols. (63); dichos autores asociaron de forma específica la actividad de la telomerasa humana con la inmortalidad celular y el cáncer, pudiendo ser éste el parámetro de agresividad más específico de los descritos hasta el momento actual.

Para una mejor comprensión de ello hemos de recordar que los telómeros son estructuras especializadas situadas en los extremos de los cromosomas, funcionando presumiblemente en su protección y replicación. Se componen de cientos de miles de dobles repetidos de la secuencia TTAGGG y proteínas asociadas. Por cada división celular los cromosomas pierden entre 50 y 200 nucleótidos de la secuencia telomérica; se ha propuesto que este acortamiento de los telómeros sea el reloj mitótico por el que las células cuentan sus divisiones, de manera que un telómero lo suficientemente corto podría ser la señal para la senescencia replicativa en las células normales. Las células inmortales no pierden la secuencia telomérica con la división celular, lo que sugiere que el mantenimiento de los telómeros es un requerimiento para que las células escapen de la senescencia replicativa y proliferen indefinidamente.

Por su parte la telomerasa, identificada por Greider y Blackburn (64), es la ribonucleoproteína que sintetiza el DNA telomérico y está directamente involucrada en el mantenimiento del telómero quedando por lo tanto ligada a la inmortalidad celular. La actividad de la telomerasa es al menos mil veces mayor en las células inmortales que en las mortales.

La actividad de la telomerasa ha sido positiva en líneas celulares derivadas de tejidos germinales (ovario y testículos) y en la gran mayoría de los tumores malignos testados (hepatocarcinoma, carcinoma de colon, neuroblastoma, tumor pulmonar de células pequeñas,...) siendo negativa en los tejidos próximos a las neoplasias y en tumores benignos rápidamente proliferantes como los leiomiomas. Estos datos confirman la fuerte represión de la telomerasa en tejidos somáticos normales sugiriendo que la progresión maligna puede depender de la activación de la telomerasa y que la inmortalidad celular es requerida para mantener el crecimiento tumoral. De lo anterior se deduce que la medición de la actividad de la telomerasa puede ser de gran ayuda diagnóstica y que su represión a nivel tisular podría reducir la probabilidad de padecer cáncer (63). El conocimiento de que los telómeros de las células tumorales son más cortos que los de las células normales amplía sus posibilidades terapéuticas, ya que los agentes inhibidores de la telomerasa podrían producir la pérdida de los telómeros en las células tumorales y su muerte, antes de que las células normales pierdan una cantidad de telómero lo suficientemente grande como para que sufran un daño importante (65).

No obstante en los últimos tiempos se ha llegado a saber que algunos tumores avanzados carecen de telomerasa, que ciertas células somáticas (macrófagos,

linfocitos) sintetizan dicha enzima y que a veces las células pueden compensar su pérdida. Si en las neoplasias humanas se produjese frecuentemente la activación de una ruta alternativa recuperadora de telómeros la terapia dirigida contra la telomerasa podría no resultar eficaz (65).

Abstract.—In this part three, we review the mechanisms of extravasation and proliferation in the target organ. The phenomena that occurs at the level of capillaries and arterioles, and mainly the tumoral angiogenesis, are summarized. We analyze the formation of new capillary loops, the different known angiogenic and antiangiogenic factors and their therapeutic consequences.

We review the factors that contribute to the stage of tumor dormancy: non-vascularization of the tumor cells, host growth factors dependency, immunologic contention, and tumoral heterogeneity.

Finally, we discuss some aspects of the cell kinetics and tumor growth, mainly quiescent stage (G0) during which cells elude chemotherapy attacks. We study some aspects of tumoral aggressiveness, mainly telomerase activity and its relationship with cell immortality and cancer.

Román Curto C, Armijo Moreno M. On the metastatic process. III: Extravasation and proliferation in the target organ. *Actas Dermosifiliogr* 1999;90:343-357.

Key words: Metastasis. Tumor angiogenesis. Tumor dormancy. Tumor heterogeneity. Telomerase.

BIBLIOGRAFÍA

- Iwasaki T. Histological and experimental observations on the obstruction of tumor cells in the blood vessels. *J Pathol Bacteriol* 1915;20:85-105.
- Warren S, Gates O. The fate of intravenously injected tumor cells. *Am J Cancer* 1936;27:485-92.
- Baserga R, Saffiotti U. Experimental studies of histogenesis of blood-borne metastases. *Arch Pathol* 1955;59:26-34.
- Fidler LT. Cancer metastasis. *Br Med Bull* 1991b;47:157-77.
- Wood S. Pathogenesis of metastasis formation observed *in vivo* in the rabbit ear chamber. *Arch Pathol* 1958;66:550.
- Kinjo M. Lodgement and extravasation of tumor cells in blood-borne metastasis: an electron microscopy study. *Br J Cancer* 1978;38:293-301.
- Machado EA, Gerard DA, Mitchell JR, Liozo BB, Liozo CB. Arrest and extravasation of neoplastic cells. An electron microscopic study of serial sections at sequential stages. *Virchow Archiv Path Anat* 1982;396:73-89.
- Ishikawa M, Koga Y, Hosokawa M, Kobayashi H. Augmentation of B₁₆ melanoma lung colony formation of C₅₇BL/6 mice having marked granulocytosis. *Int J Cancer* 1986;37:919-24.
- Chew EC, Josephson RL, Wallace AC. Morphologic aspects of the arrest of circulating cancer cells. En: Weiss L, (ed.). *Fundamental aspects of metastasis*. Amsterdam: North-Holland Publishing Co.; 1976. p. 120-50.
- Lapis K, Pakus S, Liotta LA. Endothelialization of embolized tumor cells during metastasis formation. *Clin Expl Metastasis* 1988;6:73-89.
- Liotta LA. Invasión de células cancerosas y metástasis. *Investigación y Ciencia* (abril) 1992;24:32.
- Schirmacher V. Cancer metastasis: experimental approaches, theoretical concepts and impacts for treatment strategies. En: Klein G, Weinhouse S (eds.). *Advances in cancer research*. Vol 43. Orlando: Academic Press; 1985. p. 1-73.
- Folkman J, Merler E, Abernathy C, Williams G. Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. *J Exp Med* 1971;133:275-88.
- Folkman J, Haudenschild C. Angiogenesis *in vitro*. *Nature* 1980;288:551-6.
- Folkman J. Angiogénesis y sus inhibidores. En: De Vita VT, Hellman S, Rosenberg SA, (eds.). *Avances en oncología*. Barcelona: Editorial Espaxs S.A.; 1985. p. 67-90.
- Paku S, Paweletz N. First steps of tumor-related angiogenesis. *Lab Invest* 1991;65:334-46.
- Liotta LA, Stetler-Stevenson WG. Principles of molecular cell biology of cancer: Cancer metastasis. En: De Vita VT, Hellman S, Rosenberg SA (eds.). *Cancer: Principles and practice of oncology*. Filadelfia: Lippincott Co; 1993. p. 134-49.
- Brem SS, Gullino PM, Medina D. Angiogenesis: a marker for neoplastic transformation of mammary papillary hyperplasia. *Science* 1977;195:880-2.
- Ríos Buceta L, Fernández Herrera J. Angiogénesis peritumoral y metástasis. *Piel* 1995;10:178-86.
- Brem H, Folkman J. Inhibition of tumor angiogenesis mediated by cartilage. *J Exp Med* 1975;141:427-39.
- Kuettner KE, Pauli BU, Sable I. Morphological studies on the resistance of cartilage to invasion by osteosarcoma cells *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Res* 1978;38:277-87.
- Weinstat-Saslow D, Steeg P. Angiogenesis and colonization in the tumor metastatic process: basic and applied advances. *FASEB J* 1994;8:401-7.
- Ezekowitz RAB, Mulliken JB, Folkman J. Interferon alfa-2a therapy for life threatening hemangiomas of infancy. *N Engl J Med* 1992;326:1456-63.
- Taylor S, Folkman J. Protamina is an inhibitor of angiogenesis. *Nature* 1982;297:307-12.
- Honn KV, Cicone B, Skoff A. Prostacyclin: a potent anti-metastatic agent. *Science* 1981;212:1270-2.
- Folkman J, Langer R, Linhart RJ, Haudenschild C, Taylor S. Angiogenesis inhibition and tumor regression caused by heparin or a heparin fragment in the presence of cortisone. *Science* 1983;221:719-25.
- Folkman J. Cáncer y suministro sanguíneo. *Investigación y Ciencia* (noviembre) 1996;242:101-4.

28. O'Reilly MS, Holmgren L, Chen C, Folkman J. Angiostatin induces and sustain dormancy of human primary tumors in mice. *Nature medicine* 1996;2:689-92.
29. Szmurlo A, Marczak M, Jablonska S, Bollag W. Antitumor action of retinoids: inhibition of tumor cell line-induced angiogenesis and prevention of tumors in mice. *Dermatology* 1992;184:116-9.
30. Brodlang DG, Zitelli JA. Mechanisms of metastasis. *J Am Acad Dermatol* 1992;27:18.
31. Michel PJ, Colson P, Pipard C, Grimand P. Epithélioma ulcéré du dos de la main, métastase exceptionnelle par sa localisation et restée unique pendant plusieurs années d'un cancer du sein opéré 30 ans auparavant. *Bull Soc Fr Dermat Syph* 1967;74:780-3.
32. Thiers H, Moulin G, Perrot H. Métastase cutanée céphalique vingt ans après un cancer du sein. *Bull Soc Fr Dermatol Syph* 1967;74:639-41.
33. Michel PJ, Cretin J, Grimand PS. A propos de certaines métastases cutanées isolées et tardives des cancers du sein. *Ann Dermat Syph* 1971;98:63-70.
34. Scanlon EF. The process of metastasis. *Cancer* 1985;55:1163-6.
35. Fidler IJ, Hart IR. Biologic diversity in metastatic neoplasms: origins and implications. *Science* 1982;217:998-1003.
36. Fidler IJ, Hart IR. Principios de la biología del cáncer: biología de las metástasis. En: De Vita VT, Hellman S, Rosenberg SA, (eds.). *Cáncer: principios y práctica de oncología*. Barcelona: Salvat Editores S.A.; 1984. p. 76-88.
37. Fidler IJ, Kripke ML. Metastasis results from preexisting variant cells within a malignant tumor. *Science* 1977;197:893-5.
38. Fidler IJ. Origin and biology of cancer metastasis. *Cytometry* 1989;10:673-80.
39. Poste G, Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis. *Nature* 1979;283:139-46.
40. Fidler IJ. Tumor heterogeneity on the biology of cancer invasion and metastasis. *Cancer Res* 1978;38:2651-60.
41. Fidler IJ, Talmadge JE. Evidence that intravenously derived murine pulmonary melanoma metastases can originate from the expansion of a single tumor cell. *Cancer Res* 1986;46:5167-71.
42. Trope C. Different sensitivity to cytostatic drugs of primary tumor and metastasis of the Lewis carcinoma. *Neoplasma* 1975;22:171-80.
43. Fidler IJ. Inhibition of pulmonar metastasis by intravenous injection of specifically activated macrophages. *Cancer Res* 1974b;34:1074-8.
44. Fidler IJ, Gersten DM, Kripke ML. Influence of immune status on the metastasis of three murine fibrosarcomas of different immunogenicities. *Cancer Res* 1979;39:3816-21.
45. Prehn RT. The immune reaction as a stimulator of tumor growth. *Science* 1972;176:170-1.
46. Bernardo MR, Robustelli della Cuna G. Inmunidad y tumores. En: Bonadonna G, Robustelli della Cuna G (eds.). *Manual de Oncología Médica*. Barcelona: Editorial Masson SA.; 1983. p. 26-35.
47. Hanna N. Role of natural killer cell in control of cancer metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 1982;1:45-64.
48. Fidler IJ. Macrophages and metastasis: A biological approach to cancer therapy. *Cancer Res* 1985;45:4714-8.
49. Sugarbaker EV, Weingrad DN, Roseman JM. Mechanism of metastasis formation. En: Pilch YH (ed.). *Surgical Oncology*. Nueva York: Editorial McGraw-Hill Book Company; 1984. p. 198-230.
50. Miller FR. Immune mechanisms in the sequential steps of metastasis. *Crit Rev Oncogenesis* 1993;4:293-311.
51. Schirmmacher V. Protective immunity against metastasis: basic studies and clinical application. En: Rabes H, Peters PE, Munk K (eds.). *Metastasis: basic research and its clinical applications*. Contrib Oncol 44. Basilea: Karger; 1992. p. 300-11.
52. Rosenberg SA, Packard BS, Abbersold PM y cols. Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med* 1988;319:1676-80.
53. Bonadonna G. Principios de proliferación celular. En: Bonadonna G, Robustelli della Cuna G, (eds.) *Manual de oncología médica*. Barcelona: Editorial Masson, S.A.; 1983a. p. 11-8.
54. Hellman S, De Vita VT. «Principios biológicos del cáncer: cinética de la proliferación celular». En: De Vita VT, Hellman S, Rosenberg SA (eds.). *Cáncer. Principios y práctica de oncología*. Barcelona: Salvat Editores S.A.; 1984. p. 70-5.
55. Pardee AB. «Principios biológicos del cáncer: biología y bioquímica celular del cáncer». En: De Vita VT, Hellman S, Rosenberg SA, (eds.). *Principios y práctica de oncología*. Barcelona: Salvat Editores S.A.; 1984. p. 56-69.
56. Baserga R. Principles of molecular cell biology of cancer: The cell cycle. En: De Vita VT, Hellman S, Rosenberg SA. (eds.). *Cancer: Principles and practice of oncology*. Filadelfia: Lippincott Co; 1993. p. 60-6.
57. Hartwell LH, Kastan MB. Cell cycle control and cancer. *Science* 1994;266:1821-8.
58. Liotta LA. Mecanismos de la invasión cancerosa y las metástasis. En: De Vita VT, Hellman S, Rosenberg SA, (eds.). *Avances en oncología*. Barcelona: Editorial ESPAXS S.A.; 1985. p. 49-65.
59. Puricelli LI, Gómez DE, De Kier Joffe EB. Análisis del proceso metastásico. *Medicina (Buenos Aires)* 1987;47:313-6.
60. Steeg PS, Bevilacqua G, Kopper L y cols. Evidence for a novel gene associated with low tumor metastatic potential. *J Natl Cancer Inst* 1988;80:200-4.
61. Bevilacqua G, Sobel ME, Liotta LA, Steeg PS. Association of low nm-23RNA levels in human primary infiltrating ductal breast carcinomas with lymph node involvement and other histopathological indicators of high metastatic potential. *Cancer Res* 1989;49:5185-90.
62. Igawa M, Rukstalis DB, Tanabe T, Chodak GW. High levels of nm-23 expression are related to cell proliferation in human prostate cancer. *Cancer Res* 1994;54:1313-8.
63. Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR y cols. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 1994;266:2011-4.

64. Greider CW, Blackburn EH. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in tetrahymena extracts. *Cell* 1985;43:405-13.
65. Greider CW, Blackburn EH. Telómeros, telomerasa y cáncer. *Investigación y Ciencia* (abril). 1996. p. 20-6.

Addendum

El proceso metastásico fue revisado intentando tener una visión global sobre la enfermedad metastásica que nos sirviera de soporte y nos permitiera comprender e interpretar, en el contexto adecuado, las observaciones clínicas e histopatológicas, que sobre las metástasis cutáneas íbamos obteniendo durante la realización de nuestra tesis doctoral. Fue escrito exclusivamente para ello y en ningún momento pretendió ver la luz en una publicación (a modo de artículo en revista o libro). Sólo se ha publicado íntegro tras la decisión del Dr. Sánchez Yus (al que expreso mi agradecimiento) siendo nosotros los primeros sorprendidos.

Aunque desde que acabamos la revisión bibliográfica, a finales de 1996, los conceptos básicos sobre el tema no se hayan modificado, en esencia no podemos obviar que en éste como en otros muchos campos, más aún cuando de investigación básica se trata, se ha seguido avanzando conociéndose nuevos factores y/o desentrañándose mejor algunos de los mecanismos implicados. Si bien no vamos a entrar detenidamente en ellos, quisiéramos realizar a modo de ejemplo dos comentarios:

1. Cada día se consolida más el papel esencial jugado por la angiogénesis en la progresión tumoral de la mayoría de las neoplasias sólidas, existiendo no obstante un estudio al menos que demuestra que los carcinomas orales son menos dependientes de ella, probablemente debido a mutaciones genéticas (1). Además, se han hallado nuevos factores angiogénicos como los factores de crecimiento endotelial vascular B y C (VEGF-B, VEGF-C), estando este último asociado al desarrollo de vasos linfáticos (2), y factores antiangiogénicos entre los que se encuentran el U-995 (3) y el MV833 (4). Experimentalmente se ha probado la eficacia de la terapia génica antiangiogénica mediante: a) la inserción de un vector adenoviral AdEx-Tek capaz de bloquear la activación de la Tie2 (receptor tirosinasa quinasa específico del endotelio con capa-

cidad angiogénica) (5); y b) del gen sFLT-1 capaz de inhibir el factor de crecimiento endotelial vascular y aumentar la supervivencia (6).

2. Por otro lado cada vez son más los estudios contradictorios sobre el papel predictor del nm-23 con relación a la capacidad metastásica tumoral, habiéndose asociado su expresión incluso con metástasis distantes de carcinoma gástrico (7), lo que nos dificulta el poder utilizarlo como un marcador fiable de identificación de los pacientes con mayor riesgo de padecer metástasis.

Por último (aunque no lo último) dejar constancia de que el principal impulsor de este proyecto doctoral, sin cuya orientación y rigor no hubiera podido llevarse a cabo, fue el profesor Armijo, y que, por error involuntario que pretendemos desde aquí subsanar, no fue incluido como autor en la primera parte. Aprovecho estas líneas para rendir mi más profundo y respetuoso homenaje al hombre y al **maestro** que aún hoy, desde la otra orilla de la existencia, sigue siendo el profesor Armijo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Gleich LL, Zimmerman N, Wang YO, Gluckman JL. Angiogenic inhibition for the treatment of head and neck cancer. *Anticancer Res* 1998;18:2607-9.
2. Salven P, Lymboussaki A, Heikkila P y cols. Vascular endothelial growth factors VEGF-B and VEGF-C are expressed in human tumors. *Am J Pathol* 1998;153:103-8.
3. Sheu JR, Fu CC, Tsai ML y cols. Effect of U-995, a potent shark cartilage-derived angiogenesis inhibitor, on anti-angiogenesis and anti-tumor activities. *Anticancer Res* 1998;18:4435-41.
4. Asano M, Yukita A, Matsumoto T y cols. An anti-human VEGF monoclonal antibody, MV833, that exhibits potent antitumor activity *in vivo*. *Hybridoma* 1998;17:185-90.
5. Lin P, Buxton JA, Acheson A y cols. Antiangiogenic gene therapy targeting the endothelium-specific receptor tyrosine kinase Tie2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:8829-34.
6. Goldman CK, Kendall RL, Cabrera G y cols. Paracrine expression of a native soluble vascular endothelial growth factor receptor inhibits tumor growth, metastasis and mortality rate. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:8795-8.
7. Wang CS, Lin KH, Hsu YC y cols. Distant metastasis of gastric cancer is associated with elevated expression of the antimetastatic nm-23 gene. *Cancer Lett* 1998;128:23.