

#### 3.4.4.1. Efecto del OH-TAM sobre el crecimiento y morfología de los esferoides MCF-7.

La Tabla 125 recoge los datos de crecimiento de un experimento tipo, en el cual los esferoides MCF-7 se cultivaron conjuntamente en medio conteniendo una concentración  $10^{-7}M$  de OH-TAM. Los datos de la citada Tabla resumen los valores medios obtenidos en 80 esferoides. Por otra parte, en las Tablas 126-145, se ofrecen los parámetros de crecimiento de grupos de 5 esferoides, aleatoriamente elegidos, que quedaron sometidos a la acción de diferentes concentraciones de OH-TAM (Rango  $10^{-6}M-10^{-9}$ ).

Un tratamiento matemático idéntico al efectuado para los esferoides mantenidos en medio no tratado con hormona exógena o 17 $\beta$ -estradiol, nos ha permitido analizar el ajuste de los parámetros de crecimiento de los esferoides MCF-7, en presencia de OH-TAM, a las ecuaciones de Gompertz, Verhulst-Pearl y Bertalanffy, tanto para esferoides cultivados conjuntamente como para esferoides individualizados. Los resultados obtenidos se recogen en las Tablas 146-150. Por otra parte, los valores de los "parámetros derivados", quedan reflejados en las Tablas 151-153.

TABLA 125

Parámetros de crecimiento de los esferoides MCF-7 mantenidos conjuntamente en discos Petri de 10 cm de diámetro en medio MEM+10% FBS suplementado con  $10^{-7}$  M de OH-TAM. Cada medida representa la media de 80 esferoides.

T(días)	a( $\mu\text{m}$ )	b( $\mu\text{m}$ )	$\Phi$ ( $\mu\text{m}$ )	V · 10 <sup>6</sup> ( $\mu\text{m}^3$ )
0	145	145	145	1.60
4	176	176	176	2.85
7	235	235	235	6.80
11	192	192	192	3.71
14	205	205	205	4.51
18	184	184	184	3.26

TABLA 126

Parámetros de crecimiento del esferoide 288T cultivado individualmente en medio MEM +10% FBS suplementado con  $10^{-6}$  M de OH-TAM. La medida de los diámetros ortogonales (a y b) se realizó en los intervalos de tiempo prefijados.

T(días)	a( $\mu\text{m}$ )	b( $\mu\text{m}$ )	$\Phi$ ( $\mu\text{m}$ )	V · 10 <sup>6</sup> ( $\mu\text{m}^3$ )
0	140	140	140.00	1.44
4	280	300	286.51	12.32
6	320	320	320.00	17.16
8	320	320	320.00	17.16
11	280	320	292.74	13.14
13	320	350	329.70	18.77
15	340	350	343.30	21.18

TABLA 127

Parámetros de crecimiento del esferoide 289T cultivado individualmente en medio MEM +10% FBS suplementado con  $10^{-6}$  M de OH-TAM. La medida de los diámetros ortogonales (a y b) se realizó en los intervalos de tiempo prefijados.

T(días)	a(μm)	b(μm)	Φ(μm)	V · 10 <sup>6</sup> (μm <sup>3</sup> )
0	290	290	290.00	12.77
4	350	360	353.30	23.09
6	370	370	370.00	26.52
8	350	370	356.54	23.73
11	310	350	322.80	17.61
13	300	300	300.00	14.14
15	300	330	309.68	15.55

TABLA 128

Parámetros de crecimiento del esferoide 290T cultivado individualmente en medio MEM +10% FBS suplementado con  $10^{-6}$  M de OH-TAM. La medida de los diámetros ortogonales (a y b) se realizó en los intervalos de tiempo prefijados.

T(días)	a(μm)	b(μm)	Φ(μm)	V · 10 <sup>6</sup> (μm <sup>3</sup> )
0	210	210	210.00	4.85
4	240	250	243.29	7.54
6	280	300	286.51	12.32
8	290	300	293.30	13.21
11	270	320	285.73	12.21
13	270	300	279.65	11.45
15	270	300	279.65	11.45

TABLA 129

Parámetros de crecimiento del esferoide 291T cultivado individualmente en medio MEM +10% FBS suplementado con  $10^{-6}$  M de OH-TAM. La medida de los diámetros ortogonales (a y b) se realizó en los intervalos de tiempo prefijados.

T(días)	a( $\mu$ m)	b( $\mu$ m)	$\Phi$ ( $\mu$ m)	V · 10 <sup>6</sup> ( $\mu$ m <sup>3</sup> )
0	280	290	283.29	11.90
4	330	340	333.30	19.39
6	350	350	350.00	22.45
8	350	360	353.30	23.09
11	370	370	370.00	26.52
13	350	350	350.00	22.45
15	360	400	372.87	27.14

TABLA 130

Parámetros de crecimiento del esferoide 388T cultivado individualmente en medio MEM+10% FBS suplementado con  $10^{-6}$  M de OH-TAM. La medida de los diámetros ortogonales (a y b) se realizó en los intervalos de tiempo prefijados.

T(días)	a( $\mu$ m)	b( $\mu$ m)	$\Phi$ ( $\mu$ m)	V · 10 <sup>6</sup> ( $\mu$ m <sup>3</sup> )
0	310	310	310.00	15.60
4	410	410	410.00	36.09
6	450	450	450.00	47.71
8	450	450	450.00	47.71
11	430	430	430.00	41.63
13	450	450	450.00	47.71
15	420	490	442.15	45.26

TABLA 131

Parámetros de crecimiento del esferoide 276T cultivado individualmente en medio MEM+10% FBS suplementado con  $10^{-7}$  M de OH-TAM. La medida de los diámetros ortogonales (a y b) se realizó en los intervalos de tiempo prefijados.

T(días)	a(μm)	b(μm)	Φ(μm)	V · 10 <sup>6</sup> (μm <sup>3</sup> )
0	140	150	143.26	1.54
6	280	280	280.00	11.49
8	320	320	320.00	17.16
10	390	390	390.00	31.06
12	440	440	440.00	44.60
14	510	510	510.00	69.46
16	550	560	553.31	88.70
19	640	640	640.00	137.26
21	650	690	663.07	152.64
23	680	700	686.60	169.48

TABLA 132

Parámetros de crecimiento del esferoide 277T cultivado individualmente en medio MEM+10% FBS suplementado con  $10^{-7}$  M de OH-TAM. La medida de los diámetros ortogonales (a y b) se realizó en los intervalos de tiempo prefijados.

T(días)	a(μm)	b(μm)	Φ(μm)	V · 10 <sup>6</sup> (μm <sup>3</sup> )
0	120	120	120.00	.90
6	230	230	230.00	6.37
8	310	310	310.00	15.60
10	400	400	400.00	33.51
12	470	470	470.00	54.36
14	570	570	570.00	96.97
16	610	620	613.32	120.80
19	660	680	666.60	155.09
21	700	700	700.00	179.59
23	700	730	709.86	187.29

TABLA 133

Parámetros de crecimiento del esferoide 283T cultivado individualmente en medio MEM +10% FBS suplementado con  $10^{-7}$  M de OH-TAM. La medida de los diámetros ortogonales (a y b) se realizó en los intervalos de tiempo prefijados.

T(días)	a(μm)	b(μm)	Φ(μm)	V · 10 <sup>6</sup> (μm <sup>3</sup> )
0	300	300	300.00	14.14
6	370	370	370.00	26.52
8	430	460	439.78	44.53
10	520	530	523.31	75.04
12	630	630	630.00	130.92
14	720	730	723.32	198.15
16	740	760	746.61	217.91
19	810	850	823.12	292.00
21	900	940	913.14	398.67
23	870	1000	911.34	396.31

TABLA 134

Parámetros de crecimiento del esferoide 284T cultivado individualmente en medio MEM+10% FBS suplementado con  $10^{-7}$  M de OH-TAM. La medida de los diámetros ortogonales (a y b) se realizó en los intervalos de tiempo prefijados.

T(días)	a(μm)	b(μm)	Φ(μm)	V · 10 <sup>6</sup> (μm <sup>3</sup> )
0	150	150	150.00	1.77
6	260	260	260.00	9.20
8	330	340	333.30	19.39
10	400	400	400.00	33.51
12	430	450	436.57	43.57
14	520	530	523.31	75.04
16	550	560	553.31	88.70
19	630	650	636.60	135.08
21	680	700	686.60	169.48
23	680	700	686.60	169.48

TABLA 135

Parámetros de crecimiento del esferoide 285T cultivado individualmente en medio MEM+10% FBS suplementado con  $10^{-7}$  M de OH-TAM. La medida de los diámetros ortogonales (a y b) se realizó en los intervalos de tiempo prefijados.

T(días)	a(μm)	b(μm)	Φ(μm)	V · 10 <sup>6</sup> (μm <sup>3</sup> )
0	130	140	133.25	1.24
6	160	160	160.00	2.14
8	330	330	330.00	18.82
10	400	400	400.00	33.51
12	480	480	480.00	57.91
14	570	570	570.00	96.97
16	600	600	600.00	113.10
19	680	700	686.60	169.48
21	730	730	730.00	203.69
23	750	770	756.61	226.78

TABLA 136

Parámetros de crecimiento del esferoide 292T cultivado individualmente en medio MEM+10% FBS suplementado con  $10^{-8}$  M de OH-TAM. La medida de los diámetros ortogonales (a y b) se realizó en los intervalos de tiempo prefijados.

T(días)	a(μm)	b(μm)	Φ(μm)	V · 10 <sup>6</sup> (μm <sup>3</sup> )
0	290	290	290.00	12.77
4	450	470	456.57	49.83
6	560	560	560.00	91.95
8	620	620	620.00	124.79
10	740	760	746.61	217.91
13	810	860	826.34	295.44
15	890	940	906.36	389.86
18	1100	1100	1100.00	696.91
21	1200	1200	1200.00	904.78
25	1200	1200	1200.00	904.78

TABLA 137

Parámetros de crecimiento del esferoide 293T cultivado individualmente en medio MEM+10% FBS suplementado con  $10^{-8}$  M de OH-TAM. La medida de los diámetros ortogonales (a y b) se realizó en los intervalos de tiempo prefijados.

T(días)	a( $\mu\text{m}$ )	b( $\mu\text{m}$ )	$\Phi$ ( $\mu\text{m}$ )	V · 10 <sup>6</sup> ( $\mu\text{m}^3$ )
0	400	400	400.00	33.51
4	580	580	580.00	102.16
6	650	690	663.07	152.64
8	700	710	703.32	182.16
11	730	750	736.61	209.27
13	750	790	763.10	232.67
15	790	810	796.61	264.69
18	850	860	853.32	325.34
21	910	920	913.32	398.90
25	880	980	912.14	397.37

TABLA 138

Parámetros de crecimiento del esferoide 294T cultivado individualmente en medio MEM+10% FBS suplementado con  $10^{-8}$  M de OH-TAM. La medida de los diámetros ortogonales (a y b) se realizó en los intervalos de tiempo prefijados.

T(días)	a( $\mu\text{m}$ )	b( $\mu\text{m}$ )	$\Phi$ ( $\mu\text{m}$ )	V · 10 <sup>6</sup> ( $\mu\text{m}^3$ )
0	190	190	190.00	3.59
4	310	320	313.30	16.10
6	390	390	390.00	31.06
8	430	440	433.31	42.60
11	490	500	493.31	62.86
13	560	560	560.00	91.95
15	610	630	616.60	122.74
18	700	710	703.32	182.16
21	840	860	846.61	317.73
25	850	850	850.00	321.55



TABLA 139

Parámetros de crecimiento del esferoide 295T cultivado individualmente en medio MEM+10% FBS suplementado con  $10^{-8}$  M de OH-TAM. La medida de los diámetros ortogonales (a y b) se realizó en los intervalos de tiempo prefijados.

T(días)	a( $\mu$ m)	b( $\mu$ m)	$\Phi$ ( $\mu$ m)	V · 10 <sup>6</sup> ( $\mu$ m <sup>3</sup> )
0	200	200	200.00	4.19
4	320	330	323.30	17.69
6	390	400	393.31	31.86
8	440	450	443.31	45.62
11	490	500	493.31	62.86
13	540	550	543.31	83.97
15	570	600	579.83	102.07
18	660	660	660.00	150.53
21	740	740	740.00	212.17
25	700	730	709.86	187.29

TABLA 140

Parámetros de crecimiento del esferoide 297T cultivado individualmente en medio MEM +10% FBS suplementado con  $10^{-8}$  M de OH-TAM. La medida de los diámetros ortogonales (a y b) se realizó en los intervalos de tiempo prefijados.

T(días)	a( $\mu$ m)	b( $\mu$ m)	$\Phi$ ( $\mu$ m)	V · 10 <sup>6</sup> ( $\mu$ m <sup>3</sup> )
0	210	210	210.00	4.85
4	300	300	300.00	14.14
6	320	340	326.53	18.23
8	370	370	370.00	26.52
11	390	390	390.00	31.06
13	420	450	429.77	41.56
15	450	450	450.00	47.71
18	470	470	470.00	54.36
21	520	550	529.81	77.87
25	530	540	533.31	79.42

TABLA 141

Parámetros de crecimiento del esferoide 311T cultivado individualmente en medio MEM+10% FBS suplementado con  $10^{-9}$  M de OH-TAM. La medida de los diámetros ortogonales (a y b) se realizó en los intervalos de tiempo prefijados.

T(días)	a( $\mu\text{m}$ )	b( $\mu\text{m}$ )	$\Phi$ ( $\mu\text{m}$ )	V · 10 <sup>6</sup> ( $\mu\text{m}^3$ )
0	370	380	373.30	27.24
2	420	430	423.31	39.72
4	490	490	490.00	61.60
6	490	490	490.00	61.60
8	580	580	580.00	102.16
11	590	590	590.00	107.54
13	630	650	636.60	135.08
15	650	670	656.60	148.22
17	650	720	672.54	159.28
20	800	800	800.00	268.08
22	800	860	819.52	288.19
23	710	880	762.66	232.27
27	940	1000	959.59	462.65
29	980	1050	1002.80	528.01
31	970	1025	988.00	504.97
34	1050	1150	1082.33	663.86
38	1100	1150	1116.42	728.59

Parámetros de crecimiento del esferoide 313T cultivado individualmente en medio MEM+10% FBS suplementado con  $10^{-9}$  M de OH-TAM. La medida de los diámetros ortogonales (a y b) se realizó en los intervalos de tiempo prefijados.

T(días)	a( $\mu\text{m}$ )	b( $\mu\text{m}$ )	$\Phi$ ( $\mu\text{m}$ )	V · 10 <sup>6</sup> ( $\mu\text{m}^3$ )
0	150	150	150.00	1.77
4	310	320	313.30	16.10
6	370	390	376.55	27.96
8	420	420	420.00	38.79
11	450	450	450.00	47.71
13	480	480	480.00	57.91
15	520	520	520.00	73.62
18	520	570	536.16	80.70
21	600	600	600.00	113.10
25	650	700	666.26	154.85

TABLA 143

Parámetros de crecimiento del esferoide 315E cultivado individualmente en medio MEM+10% FBS suplementado con  $10^{-9}$  M de OH-TAM. La medida de los diámetros ortogonales (a y b) se realizó en los intervalos de tiempo prefijados.

T(días)	a( $\mu\text{m}$ )	b( $\mu\text{m}$ )	$\Phi$ ( $\mu\text{m}$ )	V · $10^6$ ( $\mu\text{m}^3$ )
0	210	210	210.00	4.85
4	320	350	329.70	18.77
6	420	420	420.00	38.79
8	480	480	480.00	57.91
11	520	540	526.58	76.45
13	570	580	573.31	98.67
15	620	640	626.60	128.81
18	700	700	700.00	179.59
21	770	780	773.32	242.14

TABLA 144

Parámetros de crecimiento del esferoide 316T cultivado individualmente en medio MEM+10% FBS suplementado con  $10^{-9}$  M de OH-TAM. La medida de los diámetros ortogonales (a y b) se realizó en los intervalos de tiempo prefijados.

T(días)	a( $\mu\text{m}$ )	b( $\mu\text{m}$ )	$\Phi$ ( $\mu\text{m}$ )	V · $10^6$ ( $\mu\text{m}^3$ )
0	290	290	290.00	12.77
4	420	430	423.31	39.72
6	500	500	500.00	65.45
8	550	570	556.59	90.28
11	590	620	599.84	113.00
13	650	650	650.00	143.79
15	650	700	666.26	154.85
18	660	700	673.07	159.66
21	660	790	700.76	180.18
25	750	760	753.32	223.84

TABLA 145

Parámetros de crecimiento del esferoide 319T cultivado individualmente en medio MEM+10% FBS suplementado con  $10^{-9}$  M de OH-TAM. La medida de los diámetros ortogonales (a y b) se realizó en los intervalos de tiempo prefijados.

T(días)	a( $\mu\text{m}$ )	b( $\mu\text{m}$ )	$\Phi$ ( $\mu\text{m}$ )	V · 10 <sup>6</sup> ( $\mu\text{m}^3$ )
0	410	410	410.00	36.09
2	490	490	490.00	61.60
4	550	550	550.00	87.11
7	620	620	620.00	124.79
9	760	780	766.61	235.90
11	760	760	760.00	229.85
14	810	820	813.32	281.70
17	900	910	903.32	385.94
21	960	990	969.90	477.72

TABLA 146

Ajuste de los parámetros de crecimiento de los esferoides MCF-7 mantenidos conjuntamente en medio MEM+10% FBS suplementado con  $10^{-7}M$  de OH-TAM, a la Ecuación de los modelos de Gompertz, Verhulst-Pearl y Bertalanffy.

GOMPERTZ

A	a ( $10^{-7}$ )	Coefficiente de correlación
0,035	7,81	<0,100

VERHULST-PEARL

$\delta$	D ( $10^{-16}$ )	Coefficiente de correlación
0,0	3,55	<0,100

BERTALANFFY

B	B	Coefficiente de correlación
-	-	-

TABLA 147

Ajuste de los parámetros de crecimiento de los esferoides MCF-7, mantenidos individualmente en medio MEM+10% FBS suplementado con diferentes concentraciones de OH-TAM ( $10^{-6}$  a  $10^{-9}$ M), a la Ecuación del modelo de Gompertz.

[OH-TAM] Cod.Esf.	t (días)	A	a ( $10^{-2}$ )	Coef. Correl.
$10^{-6}$				
288T	15	0.855	31.7	0.670
289T	15	0	0	<0.10
290T	15	0.053	0.00	<0.10
291T	15	0.180	21.5	0.720
388T	15	0.058	0.00	<0.10
$10^{-7}$				
276T	23	0.413	6.91	0.994
277T	23	0.509	7.66	0.974
281T	23	0.478	6.63	0.965
284T	23	0.380	6.11	0.989
285T	23	0.357	3.67	0.928
$10^{-8}$				
292T	25	0.402	7.92	0.978
293T	25	0.315	12.1	0.955
294T	25	0.407	7.62	0.978
295T	25	0.427	10.1	0.947
297T	25	0.283	9.03	0.975
$10^{-9}$				
311T	25	0.428	9.99	0.974
313T	25	0.566	12.4	0.916
314T	25	0.465	11.6	0.987
315T	21	0.412	9.18	0.987
316T	25	0.366	12.4	0.955

TABLA 148

Ajuste de los parámetros de crecimiento de los esferoides MCF-7, mantenidos individualmente en medio MEM+10% FBS suplementado con diferentes concentraciones de OHTAM ( $10^{-6}$  a  $10^{-9}$ M), a la Ecuación del modelo de Verhulst-Pearl.

[OH-TAM] Cod.Esf.	t (días)	$\delta$	D ( $10^{-10}$ )	Coef. Correl.
$10^{-6}$				
288T	15	0.533	252.0	0.642
289T	15	0.008	0.000	0.022
290T	15	0.520	0.000	0.571
291T	15	0.271	99.10	0.724
388T	15	0.057	0.000	0.547
$10^{-7}$				
276T	23	0.312	17.40	0.994
277T	23	0.365	18.60	0.997
281T	23	0.355	5.480	0.985
284T	23	0.298	15.52	0.992
285T	23	0.300	9.371	0.941
$10^{-8}$				
292T	25	0.304	3.221	0.967
293T	25	0.251	6.194	0.913
294T	25	0.306	9.200	0.948
295T	25	0.316	14.92	0.699
297T	25	0.230	27.81	0.954
$10^{-9}$				
311T	25	0.298	6.651	0.977
313T	25	0.356	23.50	0.749
314T	25	0.312	6.921	0.941
315T	21	0.307	12.52	0.926
316T	25	0.262	11.72	0.856

TABLA 149

Ajuste de los parámetros de crecimiento de los esferoides MCF-7, mantenidos individualmente en medio MEM+10% FBS suplementado con diferentes concentraciones de OH-TAM ( $10^{-6}$  a  $10^{-9}$ M), a la Ecuación del modelo de Bertalanffy.

[OH-TAM] Cod.Esf.	t (días)	B	$\beta$ ( $10^{-2}$ )	Coef. Correl.
$10^{-6}$				
288T	15	0.990	0.075	0.734
289T	15	0.300	1.691	0.050
290T	15	0.891	0.259	0.556
291T	15	0.300	7.551	0.786
388T	15	0.300	26.50	0.759
$10^{-7}$				
276T	23	0.943	1.210	0.992
277T	23	0.900	3.902	0.972
281T	23	0.920	2.921	0.966
284T	23	0.953	0.925	0.987
285T	23	0.900	3.614	0.965
$10^{-8}$				
292T	25	0.916	1.492	0.978
293T	25	0.630	5.651	0.974
294T	25	0.926	1.374	0.982
295T	25	0.857	2.432	0.966
297T	25	0.725	3.612	0.983
$10^{-9}$				
311T	25	0.772	6.742	0.981
313T	25	0.842	3.841	0.979
314T	25	0.794	4.662	0.975
315T	21	0.872	2.310	0.994
316T	25	0.651	7.251	0.979



TABLA 150

Ajuste de los parámetros de crecimiento de los esferoides MCF-7 mantenidos en medio MEM+10% FBS suplementado con diferentes concentraciones de OH-TAM ( $10^{-6}$  a  $10^{-9}$ M) a las Ecuaciones de los modelos de Gompertz, Verhulst-Pearl y Bertalanffy. Se expresan los valores medios y desviación estándar de las constantes y el rango del coeficiente de correlación en cada caso.

<u>GOMPERTZ</u>			
[OH-TAM]	A	a ( $10^{-2}$ )	Coefficiente de correlación
$10^{-6}$ M	0,160±0,310	7,6±13,3	<0,100-0,720
$10^{-7}$ M	0,300±0,140	3,4±3,20	0,9280,989
$10^{-8}$ M	0,330±0,120	9,1±3,80	0,947-0,978
$10^{-9}$ M	0,420±0,090	11,1±1,5	0,916-0,987
<u>VERHULST-PEARL</u>			
	$\delta$	D ( $10^{-3}$ )	Coefficiente de correlación
$10^{-6}$ M	0,133±0,190	5,01±9,63	<0,100-0,724
$10^{-7}$ M	0,250±0,080	7,14±0,76	0,941-0,997
$10^{-8}$ M	0,260±0,070	1,10±0,80	0,699-0,967
$10^{-9}$ M	0,292±0,041	1,20±0,73	0,856-0,977
<u>BERTALANFFY</u>			
	B	B ( $10^{-2}$ )	Coefficiente de correlación
$10^{-6}$ M	0,480±0,310	5,00±9,01	<0,100-0,789
$10^{-7}$ M	0,940±0,032	1,41±1,40	0,965-0,992
$10^{-8}$ M	0,841±0,131	2,01±1,82	0,966-0,983
$10^{-9}$ M	0,760±0,123	4,80±2,53	0,975-0,994

TABLA 151

Parámetros derivados de la aplicación de las ecuaciones de Gompertz, Verhulst-Pearl y Bertalanffy al crecimiento de los esferoides MCF-7 mantenidos individualmente en medio MEM+10% FBS, suplementado con diferentes concentraciones de OH-TAM ( $10^{-6}$  a  $10^{-9}$ M). Valor estimado del Volumen Máximo ( $V_{max}$ ). Volúmenes expresados en  $\mu\text{m}^3 \cdot 10^6$  y tiempo en días.

[OHTAM] Cod.Esf	Parámetros Experimentales			Parámetros derivados ( $V_{max}$ )		
	t	$V_0$	$V_{max}$	G	V-P	B
$10^{-6}$						
288T	15	1.44	21.2	21.4	21.5	1440000
289T	15	12.74	15.5	-	-	37.2
290T	15	.81	11.4	-	-	3745
291T	15	11.9	27.1	27.5	27.3	34.6
388T	15	15.6	45.2	-	-	45.4
$10^{-7}$						
276T	23	1.54	169	607	179	8315
277T	23	0.90	187	691	196	900
281T	23	2.57	606	5070	646	5019
284T	23	1.77	169	889	192	17048
285T	23	1.24	226	20798	322	1240
$10^{-8}$						
292T	25	12.7	904	2044	950	21545
293T	25	33.5	397	452	411	266
294T	25	3.59	321	749	332	8859
295T	25	4.19	187	287	212	1432
297T	25	4.85	79	111	83	232
$10^{-9}$						
311T	25	9.20	438	667	448	776
313T	25	1.77	154	169	151	448
314T	25	10.3	448	570	452	1183
315T	21	4.85	242	431	245	2312
316T	25	12.7	243	244	224	300

TABLA 152

Parámetros derivados de la aplicación de la Ecuación de Gompertz al crecimiento de los esferoides MCF-7, mantenidos individualmente en medio MEM+10% FBS suplementado con diferentes concentraciones de OH-TAM ( $10^{-6}$  a  $10^{-9}$ M). Valores estimados para el tiempo de Inflexión ( $T_I$ ) y diámetro, volumen y tiempo de duplicación ( $T_D$ ) en dicho instante. Volúmenes expresados en  $\mu\text{m}^3 \cdot 10^6$  diámetro en  $\mu\text{m}$  y tiempo en días.

[OHTAM]	Parámetros Experimentales			Parámetros Derivados		
	$V_0$	$V_{\text{max}}$	$T_I$	$\phi_I$	$V_I$	$T_D$
Cod.Esf						
$10^{-6}$						
288T	1.4	21.2	1.3	191	3.70	1.6
289T	12.7	15.5	-	-	-	-
290T	4.8	11.4	-	-	-	-
291T	11.9	27.1	-	276	11.2	6.7
388T	15.6	45.2	-	-	-	-
$10^{-7}$						
276T	1.5	169	11.2	420	38.8	4.2
277T	0.9	187	10.7	414	37.3	3.5
283T	2.5	606	13.9	747	217	3.9
284T	1.7	169	12.9	467	53.4	4.6
285T	1.2	226	26.9	1020	556	5.7
$10^{-8}$						
292T	12.7	904	8.9	682	166	4.0
293T	33.5	397	3.4	537	81.2	4.2
294T	3.5	321	9.5	476	56.7	4.1
295T	4.1	187	6.1	385	29.9	3.6
297T	4.8	79	5.4	315	16.5	4.9
$10^{-9}$						
311T	9.2	438	6.3	507	68.4	3.6
313T	1.7	154	5.3	312	16.0	2.8
314T	10.3	448	5.1	495	63.5	3.2
315T	4.8	242	7.1	430	41.6	3.8
316T	12.7	243	3.8	419	38.6	3.7

TABLA 153

Parámetros derivados de la aplicación de la Ecuación de Gompertz al crecimiento de los esferoides MCF-7 mantenidos individualmente en medio MEM+10% FBS suplementado con diferentes concentraciones de OH-TAM ( $10^{-6}$  a  $10^{-9}$ M). Valor estimado del Volumen Máximo ( $V_{max}$ ) y el número máximo de duplicaciones ( $n_{max}$ ). Volúmenes expresados en  $\mu\text{m}^3 \cdot 10^6$  y tiempo en días.

OHTAM Cod.esf	<u>Parámetros Experimentales</u>				<u>Parámetros derivados</u>	
	t	$V_0$	$V_{max}$	$n_{max}$	$V_{max}$	$n_{max}$
$10^{-6}$						
288T	15	1.44	21.2	3	21.4	3.9
289T	15	12.74	15.5	1	-	-
290T	15	4.811	11.4	2	-	-
291T	15	.9	27.1	1	27.5	1.2
388T	15	15.6	45.2	1	-	-
$10^{-7}$						
276T	23	1.54	169	6	607	8.6
277T	23	0.90	187	7	691	9.5
283T	23	2.57	606	7	5070	10.9
284T	23	1.77	169	6	889	8.9
285T	23	1.24	226	7	20798	14.0
$10^{-8}$						
292T	25	12.7	904	6	2044	7.3
293T	25	33.5	397	3	452	3.7
294T	25	3.59	321	6	749	7.7
295T	25	4.19	187	5	287	6.1
297T	25	4.85	79	4	111	4.5
$10^{-9}$						
311T	25	9.20	438	5	667	6.1
313T	25	1.77	154	6	169	6.5
314T	25	10.3	448	5	570	5.7
315T	21	4.85	242	5	431	6.4
316T	25	12.7	243	4	244	4.2

3.4.4.2. Efecto del cambio de medio y la adición del  
17 $\beta$ -estradiol sobre los esferoides MCF-7 cultivados en  
medio MEM+10% FBS conteniendo 10<sup>-7</sup> M de OHTAM.

Las Tablas 154-158 recogen datos de crecimiento de algunos esferoides cultivados inicialmente en medio conteniendo antiestrógenos, sometidos a "rescate" posterior mediante el cambio de dicho medio por otro "basal" libre del antiestrógeno. Por otra parte, en las Tablas 159-163 se muestran los datos del reclutamiento de esferoides MCF-7 con medio MEM+10% FBS suplementado con 10<sup>-7</sup>M de 17 $\beta$ -estradiol.

Los valores medios de los parámetros de ajuste del crecimiento de los esferoides a las ecuaciones de los modelos matemáticos considerados, se muestran en las Tablas 164-167.

TABLA 154

Parámetros de crecimiento del esferoide 82TM cultivado individualmente en medio MEM +10% FBS suplementado con  $10^{-7}$  M de OH-TAM durante 8 días y a continuación rescatado con MEM+10% FBS. La medida de los diámetros ortogonales (a y b) se realizó en los intervalos de tiempo prefijados.

T(días)	a( $\mu$ m)	b( $\mu$ m)	$\bar{\Phi}$ ( $\mu$ m)	V $\cdot 10^6$ ( $\mu$ m <sup>3</sup> )
0	360	380	366.55	25.79
1	400	400	400.00	33.51
3	430	430	430.00	41.63
6	410	440	419.77	38.73
7	420	440	426.56	40.64
8	360	410	375.95	27.82
10	400	410	403.31	34.35
13	420	420	420.00	38.79
15	400	410	403.31	34.35
17	370	430	389.01	30.82
20	420	430	423.31	39.72
22	430	450	436.57	43.57
24	430	450	436.57	43.57
27	450	500	466.08	53.01

TABLA 155

Parámetros de crecimiento del esferoide 83TM cultivado individualmente en medio MEM+10% FBS suplementado con  $10^{-7}$  M de OH-TAM durante 8 días y a continuación rescatado con MEM+10% FBS. La medida de los diámetros ortogonales (a y b) se realizó en los intervalos de tiempo prefijados.

T(días)	a( $\mu$ m)	b( $\mu$ m)	$\Phi$ ( $\mu$ m)	V $\cdot 10^6$ ( $\mu$ m <sup>3</sup> )
0	330	330	330.00	18.82
1	350	360	353.30	23.09
3	350	350	350.00	22.45
6	350	350	350.00	22.45
7	340	360	346.54	21.79
8	330	340	333.30	19.39
10	360	400	372.87	27.14
13	370	400	379.74	28.67
15	350	380	359.73	24.37
17	350	380	359.73	24.37
20	350	380	359.73	24.37
22	400	400	400.00	33.51
24	370	380	373.30	27.24
27	390	400	393.31	31.86

TABLA 156

Parámetros de crecimiento del esferoide 85TM cultivado individualmente en medio MEM +10% FBS suplementado con  $10^{-7}$  M de OH-TAM durante 8 días y a continuación rescatado con MEM+10% FBS. La medida de los diámetros ortogonales (a y b) se realizó en los intervalos de tiempo prefijados.

T(días)	a(μm)	b(μm)	Φ(μm)	V · 10 <sup>6</sup> (μm <sup>3</sup> )
0	320	320	320.00	17.16
3	290	330	302.76	14.53
4	290	350	308.76	15.41
5	300	320	306.52	15.08
7	320	350	329.70	18.77
10	300	310	303.30	14.61
12	350	380	359.73	24.37
14	320	360	332.81	19.30
17	380	450	402.03	34.02
19	400	470	422.09	39.37
21	370	460	397.85	32.97
23	420	450	429.77	41.56



TABLA 157

Parámetros de crecimiento del esferoide 86TM cultivado individualmente en medio MEM +10% FBS suplementado con  $10^{-7}$  M de OH-TAM durante 8 días y a continuación rescatado con MEM+10% FBS. La medida de los diámetros ortogonales (a y b) se realizó en los intervalos de tiempo prefijados.

T(días)	a( $\mu\text{m}$ )	b( $\mu\text{m}$ )	$\Phi$ ( $\mu\text{m}$ )	V · 10 <sup>6</sup> ( $\mu\text{m}^3$ )
0	200	200	200.00	4.19
1	230	230	230.00	6.37
3	240	240	240.00	7.24
6	220	240	226.47	6.08
7	220	250	229.58	6.34
8	230	250	236.48	6.92
10	250	250	250.00	8.18
13	250	260	253.29	8.51
15	250	300	265.66	9.82
17	220	260	232.60	6.59
20	260	280	266.50	9.91
22	270	280	273.29	10.69

TABLA 158

Parámetros de crecimiento del esferoide 87TM cultivado individualmente en medio MEM +10% FBS suplementado con  $10^{-7}$  M de OH-TAM durante 8 días y a continuación rescatado con MEM+10% FBS. La medida de los diámetros ortogonales (a y b) se realizó en los intervalos de tiempo prefijados.

T(días)	a( $\mu\text{m}$ )	b( $\mu\text{m}$ )	$\bar{\Phi}$ ( $\mu\text{m}$ )	V · 10 <sup>6</sup> ( $\mu\text{m}^3$ )
0	400	410	403.31	34.35
3	490	490	490.00	61.60
6	520	520	520.00	73.62
7	530	540	533.31	79.42
8	510	530	516.58	72.18
10	530	540	533.31	79.42
13	480	500	486.58	60.32
15	510	510	510.00	69.46
17	510	520	513.31	70.82
20	520	570	536.16	80.70
22	560	570	563.31	93.59
24	540	580	553.02	88.56
27	550	600	566.19	95.03

TABLA 159

Parámetros de crecimiento del esferoide 96TE cultivado individualmente en medio MEM+10% FBS suplementado con  $10^{-7}$  M de OH-TAM durante 8 días y a continuación rescatado con MEM+10% FBS suplementado con  $10^{-7}$  M de 17 $\beta$ -estradiol. La medida de los diámetros ortogonales (a y b) se realizó en los intervalos de tiempo prefijados.

T(días)	a( $\mu$ m)	b( $\mu$ m)	$\Phi$ ( $\mu$ m)	V $\cdot 10^6$ ( $\mu$ m <sup>3</sup> )
0	320	320	320.00	17.16
3	400	400	400.00	33.51
6	400	410	403.31	34.35
7	400	410	403.31	34.35
8	380	400	386.55	30.24
10	430	450	436.57	43.57
13	550	610	569.31	96.62
15	610	620	613.32	120.80
17	650	710	669.41	157.07
20	770	860	798.90	266.98
22	820	880	839.53	309.82
24	860	960	892.12	371.76
27	880	1030	927.40	417.64
29	960	1125	1012.12	542.87

TABLA 160

Parámetros de crecimiento del esferoide 97TE cultivado individualmente en medio MEM+10% FBS suplementado con  $10^{-7}$  M de OH-TAM durante 8 días y a continuación rescatado con MEM+10% FBS suplementado con  $10^{-7}$  M de 17 $\beta$ -estradiol. La medida de los diámetros ortogonales (a y b) se realizó en los intervalos de tiempo prefijados.

T(días)	a( $\mu$ m)	b( $\mu$ m)	$\bar{\Phi}$ ( $\mu$ m)	V $\cdot 10^6$ ( $\mu$ m <sup>3</sup> )
0	400	400	400.00	33.51
1	420	420	420.00	38.79
3	450	450	450.00	47.71
6	420	470	436.05	43.41
7	410	420	413.31	36.97
8	380	400	386.55	30.24
10	430	450	436.57	43.57
13	500	530	509.81	69.38
15	570	600	579.83	102.07
17	580	660	605.53	116.25
20	700	750	716.28	192.42
22	760	790	769.87	238.92
24	760	850	788.89	257.07
27	780	920	824.12	293.07
29	910	990	935.92	429.26

TABLA 161

Parámetros de crecimiento del esferoide 99TE cultivado individualmente en medio MEM+10% FBS suplementado con  $10^{-7}$  M de OH-TAM durante 8 días y a continuación rescatado con MEM+10% FBS suplementado con  $10^{-7}$  M de 17 $\beta$ -estradiol. La medida de los diámetros ortogonales (a y b) se realizó en los intervalos de tiempo prefijados.

T(días)	a( $\mu$ m)	b( $\mu$ m)	$\Phi$ ( $\mu$ m)	V $\cdot 10^6$ ( $\mu$ m <sup>3</sup> )
0	350	350	350.00	22.45
1	380	400	386.55	30.24
3	400	420	406.56	35.19
6	420	440	426.56	40.64
7	430	460	439.78	44.53
8	400	430	409.76	36.02
10	480	480	480.00	57.91
13	540	550	543.31	83.97
15	600	600	600.00	113.10
17	600	650	616.22	122.52
20	700	720	706.60	184.73
22	740	770	749.87	220.78
24	770	810	783.11	251.46
27	840	880	853.13	325.12
29	920	990	942.77	438.74

TABLA 162

Parámetros de crecimiento del esferoide 101TE cultivado individualmente en medio MEM+10% FBS suplementado con  $10^{-7}$  M de OH-TAM durante 8 días y a continuación rescatado con MEM+10% FBS suplementado con  $10^{-7}$  M de 17 $\beta$ -estradiol. La medida de los diámetros ortogonales (a y b) se realizó en los intervalos de tiempo prefijados.

T(días)	a( $\mu$ m)	b( $\mu$ m)	$\bar{r}$ ( $\mu$ m)	V $\cdot 10^6$ ( $\mu$ m <sup>3</sup> )
0	220	220	220.00	5.58
3	340	340	340.00	20.58
4	350	350	350.00	22.45
5	340	340	340.00	20.58
7	380	410	389.75	31.00
10	480	500	486.58	60.32
12	530	530	530.00	77.95
14	580	600	586.59	105.68
17	670	680	673.32	159.83
19	740	750	743.32	215.04
21	820	820	820.00	288.70
24	870	900	879.89	356.68
26	940	950	943.32	439.52

TABLA 163

Parámetros de crecimiento del esferoide 103TE cultivado individualmente en medio MEM+10% FBS suplementado con  $10^{-7}$  M de OH-TAM durante 8 días y a continuación rescatado con MEM+10% FBS suplementado con  $10^{-7}$  M de 17 $\beta$ -estradiol. La medida de los diámetros ortogonales (a y b) se realizó en los intervalos de tiempo prefijados.

T(días)	a( $\mu$ m)	b( $\mu$ m)	$\bar{x}$ ( $\mu$ m)	V $\cdot 10^6$ ( $\mu$ m <sup>3</sup> )
0	350	350	350.00	22.45
3	390	390	390.00	31.06
6	410	430	416.56	37.85
7	420	420	420.00	38.79
8	420	420	420.00	38.79
10	480	500	486.58	60.32
13	580	600	586.59	105.68
15	640	660	646.60	141.55
17	650	690	663.07	152.64
20	790	800	793.32	261.42
22	830	840	833.32	302.99
24	930	950	936.62	430.22
27	970	1020	986.39	502.51
29	1200	1200	1200.00	904.78

TABLA 164

Ajuste a la Ecuación del modelo de Gompertz de los parámetros de crecimiento de esferoides MCF-7, mantenidos individualmente en medio MEM+10% FBS suplementado con  $10^{-7}$  M durante 8 días y a continuación rescatado con MEM+10% FBS (T→M) o el mismo medio suplementado con  $10^{-7}$  M de 17 $\beta$ -estradiol (T→E<sub>2</sub>).

Cod. Esf.	t(días)	A	a ( $10^{-2}$ )	Coef. Correl.
TAM M				
82TM	8/20	0.046	5.19	0.732
83TM	8/20	0.150	27.50	0.123
85TM	7/15	0.063	0.00	0.001
86TM	8/14	0.052	9.27	0.552
87TM	8/20	0.018	0.00	0.001
TAM E <sub>2</sub>				
96TE	8/21	0.259	8.39	0.987
97TE	8/21	0.180	5.05	0.979
99TE	8/21	0.127	2.32	0.992
101TE	7/19	0.213	4.86	0.997
103TE	7/22	0.195	3.40	0.976



TABLA 165

Ajuste a la Ecuación del modelo de Verhulst-Pearl de los parámetros de crecimiento de los esferoides MCF-7, mantenidos individualmente en medio MEM+10% FBS suplementado con  $10^{-7}M$  durante 8 días y a continuación rescatado con MEM+10% FBS (T→M) o el mismo medio suplementado con  $10^{-7}M$  de 17 $\beta$ -estradiol (T→E<sub>2</sub>).

Cod. Esf.	t (días)	$\delta$	D ( $10^{-10}$ )	Coef. Correl.
TAM M				
82TM	8/20	0.081	13.3	0.727
83TM	8/20	0.343	103.0	0.116
85TM	7/15	0.061	0.0	0.774
86TM	8/14	0.123	104.0	0.551
87TM	8/20	0.018	0.0	0.577
TAM E <sub>2</sub>				
96TE	8/21	0.231	3.93	0.960
97TE	8/21	0.175	3.16	0.967
99TE	8/21	0.131	1.44	0.990
101TE	7/19	0.201	3.43	0.995
103TE	7/22	0.182	1.50	0.954

TABLA 166

Ajuste a la Ecuación del modelo de Bertalanffy de los parámetros de crecimiento de los esferoides MCF-7, mantenidos individualmente en medio MEM+10% FBS suplementado con  $10^{-7}M$  durante 8 días y a continuación rescatado con MEM+10% FBS (T→M) o el mismo medio suplementado con  $10^{-7}M$  de 17 $\beta$ -estradiol (T→E<sub>2</sub>).

	t (días)	B	B ( $10^{-2}$ )	Coef. Correl.
TAM M				
82TM	8/20	0.450	1.41	0.748
83TM	8/20	1.100	0.05	0.424
85TM	7/15	0.370	5.13	0.798
86TM	8/14	0.300	2.70	0.478
87TM	8/20	0.300	1.68	0.611
TAM E <sub>2</sub>				
96TE	8/21	0.741	3.13	0.990
97TE	8/21	0.800	1.67	0.979
99TE	8/21	0.845	0.97	0.986
101TE	7/19	0.872	1.23	0.996
103TE	7/22	0.917	0.78	0.961

TABLA 167

Ajuste de los parámetros de crecimiento de los esferoides MCF-7 mantenidos en medio MEM+10% FBS suplementado con  $10^{-7}$ M durante 8 días y a continuación rescatado con MEM+10% FBS (T→M) o el mismo medio suplementado con  $10^{-7}$ M de 17 $\beta$ -estradiol (T→E<sub>2</sub>) a las Ecuaciones de los modelos de Gompertz, Verhulst-Pearl y Bertalanffy. Se expresan los valores medios y desviación estándar de las constantes y el rango del coeficiente de correlación en cada caso.

GOMPERTZ

	A	a ( $10^{-2}$ )	Coefficiente de correlación
T→M	0,065±0,049	8,39±11,36	<0,100-0,732
T→E <sub>2</sub>	0,194±0,121	4,80±2,29	0,976-0,994

VERHULST-PEARL

	$\delta$	D ( $10^{-10}$ )	Coefficiente de correlación
T→M	0,125±0,127	44,06±54,31	0,116-0,774
T→E <sub>2</sub>	0,184±0,036	2,69±1,14	0,954-0,995

BERTALANFFY

	B	$\beta$ ( $10^{-2}$ )	Coefficiente de correlación
T→M	0,414±0,409	2,19±1,89	0,424-0,798
T→E <sub>2</sub>	0,835±0,067	1,55±0,94	0,961-0,996

### 3.5 QUIMIOTERAPIA

Con la intención de presentar algunas de las aplicaciones del modelo experimental que representan los esferoides multicelulares, que vaya mas allá de la propia definición de las condiciones de cultivo, la composición de los medios nutrientes o la acción de los estrógenos y antiestrógenos, se han realizado algunos experimentos de quimioterapia. El método utilizado consistió en la exposición de esferoides MCF-7 individualizados, durante un período determinado de tiempo (1 hora) a la acción de un agente utilizando niveles de concentración de eficacia demostrada en cultivos de células MCF-7 en monocapa (GORGJO, 1989).

De entre la serie de agentes quimioterápicos empleados, presentamos a continuación los resultados obtenidos con dos de ellos: uno un agente fase-específico (Metotrexate) y el otro ciclo-específico (Adriamicina).

Las Tablas 168-183 ofrecen los parámetros de crecimiento de los esferoides expuestos a dosis crecientes de Metotrexate (MTX) y las Tablas 184-188 resumen los datos de ajuste del crecimiento a las ecuaciones de los modelos matemáticos considerados, cuando dicho ajuste matemático fue posible.

Por otra parte, las Tablas 188-202 muestran los mismos parámetros de crecimiento, es decir, la evolución de los diámetros de los esferoides en función del tiempo de observación, para

aquellos esferoides tratados durante 1 hora con diferentes concentraciones de Adriamicina (ADM), en el rango 0,005-0,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . No se presentan los resultados del tratamiento con concentraciones de adriamicina superiores a 0,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , toda vez que a estas concentraciones la destrucción casi inmediata de la estructura normal del esferoide impide su seguimiento como tal. En las Tablas 203-205 se muestran los datos de ajuste a las diferentes ecuaciones, indicándose en la Tabla 206 el valor medio de las constantes y el rango del coeficiente de correlación del ajuste matemático realizado.

TABLA 168

Parámetros de crecimiento del esferoide 367QT cultivado individualmente en medio MEM+10% FBS y expuesto a una concentración final de 0,05  $\mu\text{g/ml}$  de Metotrexate. La medida de los diámetros ortogonales (a y b) se realizó en los intervalos de tiempo prefijados.

T(días)	a( $\mu\text{m}$ )	b( $\mu\text{m}$ )	$\Phi$ ( $\mu\text{m}$ )	V · 10 <sup>6</sup> ( $\mu\text{m}^3$ )
0	400	400	400.00	33.51
2	470	470	470.00	54.36
4	480	490	483.31	59.11
6	540	550	543.31	83.97
8	580	620	593.04	109.21
11	670	710	683.08	166.88
13	780	780	780.00	248.47
15	840	860	846.61	317.73
18	1030	1075	1044.79	597.15
20	980	1010	989.90	507.89
22	1100	1100	1100.00	696.91
25	1100	1100	1100.00	696.91
27	1100	1175	1124.45	744.43
29	1100	1250	1147.89	791.94
33	1050	1275	1120.20	736.02

TABLA 169

Parámetros de crecimiento del esferoide 368QT cultivado individualmente en medio MEM+10% FBS y expuesto a una concentración final de 0,05  $\mu\text{g/ml}$  de Metotrexate. La medida de los diámetros ortogonales (a y b) se realizó en los intervalos de tiempo prefijados.

T(días)	a( $\mu\text{m}$ )	b( $\mu\text{m}$ )	$\Phi$ ( $\mu\text{m}$ )	V · 10 <sup>6</sup> ( $\mu\text{m}^3$ )
0	760	760	760.00	229.85
2	980	1000	986.62	502.86
4	1075	1100	1083.27	665.59
6	1075	1100	1083.27	665.59
8	1525	1575	1541.49	1917.87
11	2250	2375	2290.92	6295.45
13	2475	2570	2506.27	8242.93
15	3600	3600	3600.00	24429.00
20	3065	4300	3431.18	21150.84

TABLA 170

Parámetros de crecimiento del esferoide 369QT cultivado individualmente en medio MEM+10% FBS y expuesto a una concentración final de 0,05  $\mu\text{g/ml}$  de Metotrexate. La medida de los diámetros ortogonales (a y b) se realizó en los intervalos de tiempo prefijados.

T(días)	a( $\mu\text{m}$ )	b( $\mu\text{m}$ )	$\Phi$ ( $\mu\text{m}$ )	V · 10 <sup>6</sup> ( $\mu\text{m}^3$ )
0	490	510	496.58	64.12
2	580	580	580.00	102.16
4	630	650	636.60	135.08
6	630	650	636.60	135.08
8	880	900	886.62	364.93



TABLA 171

Parámetros de crecimiento del esferoide 370QT cultivado individualmente en medio MEM+10% FBS y expuesto a una concentración final de 0,05  $\mu\text{g/ml}$  de Metotrexate. La medida de los diámetros ortogonales (a y b) se realizó en los intervalos de tiempo prefijados.

T(días)	a( $\mu\text{m}$ )	b( $\mu\text{m}$ )	$\Phi$ ( $\mu\text{m}$ )	V · 10 <sup>6</sup> ( $\mu\text{m}^3$ )
0	550	550	550.00	87.11
2	650	670	656.60	148.22
4	660	660	660.00	150.53
6	720	720	720.00	195.43
8	760	790	769.87	238.92
11	840	880	853.13	325.12
13	880	940	899.56	381.15
15	940	960	946.62	444.15
18	940	1125	998.01	520.48
20	910	1100	969.37	476.95
22	970	1150	1026.63	566.55
25	970	1150	1026.63	566.55
27	950	1275	1047.90	602.50
29	1000	1375	1111.99	719.95
33	1250	1575	1350.10	1288.54

TABLA 172

Parámetros de crecimiento del esferoide 371QT cultivado individualmente en medio MEM+10% FBS y expuesto a una concentración final de 0,5  $\mu\text{g/ml}$  de Metotrexate. La medida de los diámetros ortogonales (a y b) se realizó en los intervalos de tiempo prefijados.

T(días)	a( $\mu\text{m}$ )	b( $\mu\text{m}$ )	$\Phi$ ( $\mu\text{m}$ )	V · 10 <sup>6</sup> ( $\mu\text{m}^3$ )
0	670	670	670.00	157.48
2	720	730	723.32	198.15
4	700	720	706.60	184.73
6	740	740	740.00	212.17
8	700	730	709.86	187.29
11	750	780	759.87	229.73
13	780	800	786.61	254.85
15	780	800	786.61	254.85
18	840	860	846.61	317.73
20	860	890	869.89	344.66
22	900	1050	947.45	445.32

TABLA 173

Parámetros de crecimiento del esferoide 372QT cultivado individualmente en medio MEM+10% FBS y expuesto a una concentración final de 0,5  $\mu\text{g/ml}$  de Metotrexate. La medida de los diámetros ortogonales (a y b) se realizó en los intervalos de tiempo prefijados.

T(días)	a( $\mu\text{m}$ )	b( $\mu\text{m}$ )	$\Phi$ ( $\mu\text{m}$ )	V · 10 <sup>6</sup> ( $\mu\text{m}^3$ )
0	450	450	450.00	47.71
2	470	470	470.00	54.36
4	480	480	480.00	57.91
6	510	520	513.31	70.82
8	510	520	513.31	70.82
11	510	520	513.31	70.82
13	550	570	556.59	90.28
15	600	620	606.59	116.87
18	560	620	579.33	101.80
20	620	730	654.69	146.93
22	750	850	781.95	250.35
25	770	800	779.87	248.35
27	780	820	793.11	261.22
29	850	880	859.88	332.90
33	870	940	892.73	372.53

TABLA 174

Parámetros de crecimiento del esferoide 373QT cultivado individualmente en medio MEM+10% FBS y expuesto a una concentración final de 0,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de Metotrexate. La medida de los diámetros ortogonales (a y b) se realizó en los intervalos de tiempo prefijados.

T(días)	a( $\mu\text{m}$ )	b( $\mu\text{m}$ )	$\Phi$ ( $\mu\text{m}$ )	V · 10 <sup>6</sup> ( $\mu\text{m}^3$ )
0	570	600	579.83	102.07
2	600	630	609.84	118.75
4	580	590	583.31	103.92
6	570	600	579.83	102.07
11	630	640	633.32	133.00
13	640	650	643.32	139.40
15	710	770	729.46	203.24
18	710	800	738.81	211.16
20	730	920	831.15	300.64
22	870	1025	918.87	406.22
25	800	1100	889.59	368.61

TABLA 175

Parámetros de crecimiento del esferoide 375QT cultivado individualmente en medio MEM+10% FBS y expuesto a una concentración final de 0,5  $\mu\text{g/ml}$  de Metotrexate. La medida de los diámetros ortogonales (a y b) se realizó en los intervalos de tiempo prefijados.

T(días)	a( $\mu\text{m}$ )	b( $\mu\text{m}$ )	$\Phi$ ( $\mu\text{m}$ )	V · 10 <sup>6</sup> ( $\mu\text{m}^3$ )
0	300	300	300.00	14.14
2	370	380	373.30	27.24
4	400	410	403.31	34.35
6	370	390	376.55	27.96
8	420	440	426.56	40.64
11	450	460	453.31	48.77
13	500	500	500.00	65.45
18	520	530	523.31	75.04
20	610	620	613.32	120.80

TABLA 176

Parámetros de crecimiento del esferoide 377QT cultivado individualmente en medio MEM+10% FBS y expuesto a una concentración final de 5  $\mu\text{g/ml}$  de Metotrexate. La medida de los diámetros ortogonales (a y b) se realizó en los intervalos de tiempo prefijados.

T(días)	a( $\mu\text{m}$ )	b( $\mu\text{m}$ )	$\Phi$ ( $\mu\text{m}$ )	V · 10 <sup>6</sup> ( $\mu\text{m}^3$ )
0	580	580	580.00	102.16
2	610	610	610.00	118.85
4	600	610	603.31	114.98
6	610	620	613.32	120.80
8	640	650	643.32	139.40
11	650	660	653.32	146.01
13	610	670	629.38	130.54
15	650	750	681.76	165.92
18	660	780	697.79	177.90
20	660	810	706.63	184.74
22	720	890	772.71	241.58
25	720	890	772.71	241.58
27	800	900	832.03	301.59
29	900	1000	932.17	424.11
33	960	1030	982.79	497.02

TABLA 177

Parámetros de crecimiento del esferoide 378QT cultivado individualmente en medio MEM+10% FBS y expuesto a una concentración final de 5  $\mu\text{g/ml}$  de Metotrexate. La medida de los diámetros ortogonales (a y b) se realizó en los intervalos de tiempo prefijados.

T(días)	a( $\mu\text{m}$ )	b( $\mu\text{m}$ )	$\Phi$ ( $\mu\text{m}$ )	V · 10 <sup>6</sup> ( $\mu\text{m}^3$ )
0	450	460	453.31	48.77
2	480	480	480.00	57.91
4	480	510	489.80	61.52
6	520	530	523.31	75.04
8	540	550	543.31	83.97
11	520	540	526.58	76.45
13	570	610	583.03	103.77
15	590	630	603.04	114.83
18	640	670	649.85	143.69
20	650	710	669.41	157.07
22	710	750	723.09	197.96
25	620	750	660.61	150.95
27	730	820	758.84	228.80
29	790	860	812.68	281.03
33	860	870	863.32	336.91

TABLA 178

Parámetros de crecimiento del esferoide 379QT cultivado individualmente en medio MEM+10% FBS y expuesto a una concentración final de 5  $\mu\text{g/ml}$  de Metotrexate. La medida de los diámetros ortogonales (a y b) se realizó en los intervalos de tiempo prefijados.

T(días)	a( $\mu\text{m}$ )	b( $\mu\text{m}$ )	$\Phi$ ( $\mu\text{m}$ )	V · 10 <sup>6</sup> ( $\mu\text{m}^3$ )
0	590	610	596.59	111.18
2	620	650	629.84	130.83
4	600	600	600.00	113.10
6	610	630	616.60	122.74
8	630	640	633.32	133.00
11	700	770	722.60	197.55
13	740	780	753.10	223.64
15	740	750	743.32	215.04
18	760	800	773.11	241.94
20	840	850	843.32	314.03
22	850	920	872.72	348.04
25	870	940	892.73	372.53
27	940	960	946.62	444.15
29	980	1075	1010.70	540.58
33	1125	1175	1141.43	778.65



TABLA 179

Parámetros de crecimiento del esferoide 380QT cultivado individualmente en medio MEM+10% FBS y expuesto a una concentración final de 5 µg/ml de Metotrexate. La medida de los diámetros ortogonales (a y b) se realizó en los intervalos de tiempo prefijados.

T(días)	a(µm)	b(µm)	Φ(µm)	V · 10 <sup>6</sup> (µm <sup>3</sup> )
0	330	330	330.00	18.82
2	270	280	273.29	10.69
4	290	290	290.00	12.77
6	300	310	303.30	14.61
8	300	320	306.52	15.08
11	320	350	329.70	18.77
13	330	370	342.83	21.10
15	360	380	366.55	25.79
18	390	450	409.05	35.84
20	420	480	439.12	44.33
22	450	540	478.20	57.26
25	480	550	502.28	66.35
27	530	530	530.00	77.95
29	540	580	553.02	88.56
33	660	670	663.32	152.81

TABLA 180

Parámetros de crecimiento del esferoide 382QT cultivado individualmente en medio MEM+10% FBS y expuesto a una concentración final de 50  $\mu\text{g/ml}$  de Metotrexate. La medida de los diámetros ortogonales (a y b) se realizó en los intervalos de tiempo prefijados.

T(días)	a( $\mu\text{m}$ )	b( $\mu\text{m}$ )	$\Phi$ ( $\mu\text{m}$ )	V · 10 <sup>6</sup> ( $\mu\text{m}^3$ )
0	880	900	886.62	364.93
2	920	980	939.58	434.31
4	980	1000	986.62	502.86
6	980	1000	986.62	502.86
8	1250	1250	1250.00	1022.65
11	1325	1375	1341.46	1263.96
13	1225	1250	1233.28	982.16
15	1275	1300	1283.28	1106.53
18	1225	1300	1249.51	1021.44
20	1250	1300	1266.45	1063.56
22	1275	1350	1299.52	1149.09
25	1275	1300	1283.28	1106.53
27	1225	1325	1257.47	1041.09
29	1375	1450	1399.56	1435.40
33	1375	1525	1423.28	1509.64

TABLA 181

Parámetros de crecimiento del esferoide 383QT cultivado individualmente en medio MEM+10% FBS y expuesto a una concentración final de 50  $\mu\text{g/ml}$  de Metotrexate. La medida de los diámetros ortogonales (a y b) se realizó en los intervalos de tiempo prefijados.

T(días)	a( $\mu\text{m}$ )	b( $\mu\text{m}$ )	$\Phi$ ( $\mu\text{m}$ )	V · 10 <sup>6</sup> ( $\mu\text{m}^3$ )
0	520	540	526.58	76.45
2	530	530	530.00	77.95
4	530	530	530.00	77.95
6	560	560	560.00	91.95
8	580	580	580.00	102.16
11	580	610	589.83	107.44
13	580	610	589.83	107.44
15	610	620	613.32	120.80
18	630	680	646.24	141.32
20	660	700	673.07	159.66
22	730	760	739.87	212.06
25	770	830	789.50	257.67
27	750	840	778.87	247.40
29	630	840	693.40	174.57
33	830	870	843.12	313.82

TABLA 182

Parámetros de crecimiento del esferoide 385QT cultivado individualmente en medio MEM+10% FBS y expuesto a una concentración final de 50  $\mu\text{g/ml}$  de Metotrexato. La medida de los diámetros ortogonales (a y b) se realizó en los intervalos de tiempo prefijados.

T(días)	a( $\mu\text{m}$ )	b( $\mu\text{m}$ )	$\Phi$ ( $\mu\text{m}$ )	V · 10 <sup>6</sup> ( $\mu\text{m}^3$ )
0	320	320	320.00	17.16
2	310	340	319.69	17.11
4	310	380	331.77	19.12
6	350	400	365.93	25.66
8	350	420	371.93	26.94
11	350	450	380.58	28.86
13	350	470	386.14	30.15
15	350	500	394.19	32.07
18	450	570	486.89	60.44
20	410	610	468.06	53.69
22	470	630	518.22	72.87
25	500	630	540.04	82.47
27	540	630	568.47	96.19
29	600	650	616.22	122.52

TABLA 183

Parámetros de crecimiento del esferoide 386QT cultivado individualmente en medio MEM+10% FBS y expuesto a una concentración final de 50  $\mu\text{g/ml}$  de Metotrexate. La medida de los diámetros ortogonales (a y b) se realizó en los intervalos de tiempo prefijados.

T(días)	a( $\mu\text{m}$ )	b( $\mu\text{m}$ )	$\Phi$ ( $\mu\text{m}$ )	V · 10 <sup>6</sup> ( $\mu\text{m}^3$ )
0	540	570	549.82	87.03
2	580	580	580.00	102.16
4	560	590	569.83	96.89
6	580	610	589.83	107.44
8	600	620	606.59	116.87
11	600	620	606.59	116.87
13	620	680	639.39	136.86
15	650	690	663.07	152.64
18	660	760	691.78	173.34
20	620	840	686.05	169.07
22	700	890	758.34	228.34
25	700	910	763.98	233.47
27	700	960	777.72	246.30
29	740	1010	820.85	289.59
33	740	1025	824.89	293.89

TABLA 184

Ajuste a la Ecuación del modelo de Gompertz de los parámetros de crecimiento de los esferoides MCF-7 mantenidos individualmente en medio MEM +10% FBS tras la exposición a diferentes concentraciones finales de Metotrexate (0,05-50 µg/ml).

[MTX] (µg/ml)	t (días)	A	a (10 <sup>-2</sup> )	Coef. Correl.
Cod. Esf.				
0,05				
367	33	0.221	5.63	0.943
368	20	0.298	1.67	0.933
369	8	0.187	9380	<0.10
370	33	0.146	4.86	0.845
0,5				
371	22	0.039	3940	0.113
372	33	0.066	66300	<0.10
373	25	0.058	30600	<0.10
375	20	0.189	7.47	0.877
5				
377	33	0.044	40300	<0.10
378	33	0.060	41.8	0.963
379	33	0.057	44400	<0.10
380	33	0.074	12200	0.000
50				
382	33	0.128	8.92	0.680
383	33	0.042	47700	<0.10
385	29	0.068	52700	<0.10
386	33	0.039	1300	<0.10

TABLA 185

Ajuste a la Ecuación del modelo de Verhulst-Pearl, de los parámetros de crecimiento de los esferoides MCF-7 mantenidos individualmente en medio MEM+10% FBS tras la exposición a diferentes concentraciones finales de Metotrexate (0,05-50  $\mu\text{g/ml}$ ).

MTX ( $\mu\text{g/ml}$ )	t (días)	$\delta$	D ( $10^{-10}$ )	Coef. Correl.
Cod. Esf.				
0,05				
367	33	0.187	2.21	0.954
368	20	0.286	538	0.932
369	8	0.188	61900	0.871
370	33	0.127	96.5	0.732
0,5				
371	22	0.040	39600	0.904
372	33	0.066	856000	0.952
373	25	0.058	485000	0.882
375	20	0.183	0.14	0.821
5				
377	33	0.045	802000	0.912
378	33	0.061	35.4	0.963
379	33	0.058	633000	0.967
380	33	0.076	111000	0.930
50				
382	33	0.132	87.2	0.659
383	33	0.043	983000	0.917
385	29	0.068	664000	0.964
386	33	0.039	38500	0.974

TABLA 186

Ajuste a la Ecuación del modelo de Betalanffy, de los parámetros de crecimiento de los esferoides MCF-7 mantenidos individualmente en medio MEM+10% FBS tras la exposición a diferentes concentraciones finales de Metotrexate (0,05-50  $\mu\text{g/ml}$ ).

MTX ( $\mu\text{g/ml}$ )	t (días)	B	B ( $10^{-2}$ )	Coef. Correl.
Cod.Esf.				
0,05				
367QT	33	0.74	3.78	0.924
368QT	20	0.76	12.0	0.940
369QT	8	0.89	1.09	0.817
370QT	33	0.55	5.32	0.968
0,5				
371QT	22	0.80	40.8	0.880
372QT	33	0.91	32.6	0.929
373QT	25	0.89	30.5	0.956
375QT	20	0.88	58.0	0.930
5				
377QT	33	0.97	593.0	0.893
378QT	33	0.86	44.3	0.944
379QT	33	0.90	28.2	0.940
380QT	33	0.89	41.4	0.899
50				
382QT	33	0.44	3.62	0.736
383QT	33	0.89	22.8	0.891
385QT	29	0.89	40.7	0.939
386QT	33	0.80	43.1	0.964



TABLA 187

Ajuste de los parámetros de crecimiento de los esferoides MCF-7 mantenidos individualmente en medio MEM+10% FBS tras la exposición a diferentes concentraciones de Metotrexate (0,05-50 $\mu$ g/ml) a la Ecuación de los modelos de Gompertz, Verhulst-Pearl y Bertalanffy. Se expresan los valores medios de las constantes, la desviación estándar y el rango del coeficiente de correlación, en cada caso.

<u>GOMPERTZ</u>			
[MTX] ( $\mu$ g/ml)	A	a ( $10^{-5}$ )	Coefficiente de correlación
0,05	0,213 $\pm$ 0,055	2,34 $\pm$ 4,05	0,943-0,845
0,5	0,088 $\pm$ 0,059	33,61 $\pm$ 25,54	0,877-<0,10
5	0,058 $\pm$ 0,009	24,23 $\pm$ 18,67	0,963-<0,10
50	0,069 $\pm$ 0,035	25,42 $\pm$ 24,84	0,680-<0,10

<u>VERHULST-PEARL</u>			
	$\delta$	D ( $10^{-14}$ )	Coefficiente de correlación
0,05	0,197 $\pm$ 0,057	2,08 $\pm$ 2,90	0,954-0,732
0,5	0,086 $\pm$ 0,056	34,51 $\pm$ 35,10	0,952-0,821
5	0,059 $\pm$ 0,009	32,08 $\pm$ 33,01	0,967-0,855
50	0,070 $\pm$ 0,037	42,13 $\pm$ 41,78	0,974-0,659

<u>BERTALANFFY</u>			
	B	B ( $10^{-2}$ )	Coefficiente de correlación
0,05	0,735 $\pm$ 0,121	1,64 $\pm$ 1,74	0,942-0,817
0,5	0,872 $\pm$ 0,042	40,47 $\pm$ 10,82	0,930-0,856
5	0,886 $\pm$ 0,050	133,6 $\pm$ 205,57	0,944-0,842
50	0,75 $\pm$ 0,18	30,18 $\pm$ 15,15	0,964-0,736

TABLA 188

Parámetros de crecimiento del esferoide 338QT cultivado individualmente en medio MEM+10% FBS y expuesto a una concentración final de 0,005  $\mu\text{g/ml}$  de Adriamicina. La medida de los diámetros ortogonales (a y b) se realizó en los intervalos de tiempo prefijados.

T(días)	a( $\mu\text{m}$ )	b( $\mu\text{m}$ )	$\Phi$ ( $\mu\text{m}$ )	V · 10 <sup>6</sup> ( $\mu\text{m}^3$ )
0	440	450	443.31	45.62
2	440	450	443.31	45.62
4	600	650	616.22	122.52
6	570	570	570.00	96.97
8	630	780	676.49	162.10
11	770	830	789.50	257.67
13	820	850	829.88	299.26
17	820	850	829.88	299.26
20	970	1000	979.90	492.65
22	970	1000	979.90	492.65
23	1025	1050	1033.27	577.61
27	1100	1125	1108.27	712.75
29	1200	1275	1224.50	961.33
31	1125	1300	1180.55	661.48
34	1375	1375	1375.00	1361.15
38	1375	1600	1446.25	1583.89

TABLA 189

Parámetros de crecimiento del esferoide 339QT cultivado individualmente en medio MEM+10% FBS y expuesto a una concentración final de 0,005  $\mu\text{g/ml}$  de Adriamicina. La medida de los diámetros ortogonales (a y b) se realizó en los intervalos de tiempo prefijados.

T(días)	a( $\mu\text{m}$ )	b( $\mu\text{m}$ )	$\Phi$ ( $\mu\text{m}$ )	V · 10 <sup>6</sup> ( $\mu\text{m}^3$ )
0	430	430	430.00	41.63
2	480	500	486.58	60.32
4	610	620	613.32	120.80
6	660	670	663.32	152.81
8	660	670	663.32	152.81
11	970	990	976.62	487.73
13	1000	1000	1000.00	523.60
15	1025	1025	1025.00	563.86
17	1050	1075	1058.27	620.56
20	1125	1175	1141.43	778.65
22	1200	1300	1232.45	980.18
23	1150	1250	1182.41	865.57

TABLA 190

Parámetros de crecimiento del esferoide 341QT cultivado individualmente en medio MEM+10% FBS y expuesto a una concentración final de 0,005 µg/ml de Adriamicina. La medida de los diámetros ortogonales (a y b) se realizó en los intervalos de tiempo prefijados.

T(días)	a(µm)	b(µm)	Φ(µm)	V · 10 <sup>6</sup> (µm <sup>3</sup> )
0	480	480	480.00	57.91
2	550	550	550.00	87.11
4	710	710	710.00	187.40
6	700	700	700.00	179.59
8	770	790	776.61	245.25
11	960	990	969.90	477.72
13	1010	1010	1010.00	539.46
15	1020	1030	1023.32	561.09
17	1075	1075	1075.00	650.46
20	1150	1200	1166.43	830.95
22	1180	1200	1186.63	874.87
23	1150	1200	1166.43	830.95
27	1250	1275	1258.28	1043.11
29	1300	1350	1316.46	1194.59
31	1300	1350	1316.46	1194.59
34	1375	1375	1375.00	1361.15
38	1400	1425	1408.28	1462.41

TABLA 191

Parámetros de crecimiento del esferoide 342QT cultivado individualmente en medio MEM+10% FBS y expuesto a una concentración final de 0,005  $\mu\text{g/ml}$  de Adriamicina. La medida de los diámetros ortogonales (a y b) se realizó en los intervalos de tiempo prefijados.

T(días)	a( $\mu\text{m}$ )	b( $\mu\text{m}$ )	$\Phi$ ( $\mu\text{m}$ )	V · 10 <sup>6</sup> ( $\mu\text{m}^3$ )
0	390	390	390.00	31.06
2	440	440	440.00	44.60
4	550	550	550.00	87.11
6	550	550	550.00	87.11
8	610	620	613.32	120.80
11	690	750	709.45	186.96
13	750	760	753.32	223.84
15	730	800	752.62	223.22
17	860	870	863.32	336.91
20	930	930	930.00	421.16
22	960	980	966.62	472.90
23	1010	1020	1013.32	544.81
27	1000	1125	1040.04	589.05
29	1050	1125	1074.43	649.43
31	1100	1150	1116.42	728.59
34	1300	1325	1308.28	1172.47
38	1375	1525	1423.28	1509.64

TABLA 192

Parámetros de crecimiento del esferoide 343QT cultivado individualmente en medio MEM+10% FBS y expuesto a una concentración final de 0,005 µg/ml de Adriamicina. La medida de los diámetros ortogonales (a y b) se realizó en los intervalos de tiempo prefijados.

T(días)	a(µm)	b(µm)	Φ(µm)	V · 10 <sup>6</sup> (µm <sup>3</sup> )
0	440	440	440.00	44.60
2	450	470	456.57	49.83
4	580	580	580.00	102.16
6	550	550	550.00	87.11
8	670	690	676.60	162.18
11	690	730	703.08	181.98
13	760	770	763.32	232.87
15	760	800	773.11	241.94
17	810	820	813.32	281.70
20	900	920	906.62	390.19
22	870	900	879.89	356.68
23	900	900	900.00	381.70
27	1000	1075	1024.40	562.87
29	1050	1050	1050.00	606.13
31	1025	1025	1025.00	563.86
34	1050	1225	1105.36	707.15
38	1100	1175	1124.45	744.43

TABLA 193

Parámetros de crecimiento del esferoide 329QT cultivado individualmente en medio MEM+10% FBS y expuesto a una concentración final de 0,05 µg/ml de Adriamicina. La medida de los diámetros ortogonales (a y b) se realizó en los intervalos de tiempo prefijados.

T(días)	a(µm)	b(µm)	Φ(µm)	V · 10 <sup>6</sup> (µm <sup>3</sup> )
0	540	540	540.00	82.45
2	580	580	580.00	102.16
4	640	660	646.60	141.55
6	620	620	620.00	124.79
8	710	710	710.00	187.40
11	750	750	750.00	220.89
13	790	800	793.32	261.42
15	800	850	816.33	284.84
17	850	880	859.88	332.90
20	930	930	930.00	421.16
22	930	970	943.15	439.27
23	1000	1000	1000.00	523.60
27	1000	1050	1016.40	549.78
29	1100	1150	1116.42	728.59
31	1050	1100	1066.41	634.99
34	1125	1225	1157.39	811.78
38	1150	1250	1182.41	865.57

TABLA 194

Parámetros de crecimiento del esferoide 331QT cultivado individualmente en medio MEM+10% FBS y expuesto a una concentración final de 0,05  $\mu\text{g/ml}$  de Adriamicina. La medida de los diámetros ortogonales (a y b) se realizó en los intervalos de tiempo prefijados.

T(días)	a( $\mu\text{m}$ )	b( $\mu\text{m}$ )	$\Phi$ ( $\mu\text{m}$ )	V · 10 <sup>6</sup> ( $\mu\text{m}^3$ )
0	370	380	373.30	27.24
2	420	430	423.31	39.72
4	490	490	490.00	61.60
6	490	490	490.00	61.60
8	580	580	580.00	102.16
11	590	590	590.00	107.54
13	630	650	636.60	135.08
15	650	670	656.60	148.22
17	650	720	672.54	159.28
20	800	800	800.00	268.08
22	800	860	819.52	288.19
23	710	880	762.66	232.27
27	940	1000	959.59	462.65
29	980	1050	1002.80	528.01
31	970	1025	988.00	504.97
34	1050	1150	1082.33	663.86
38	1100	1150	1116.42	728.59



TABLA 195

Parámetros de crecimiento del esferoide 332QT cultivado individualmente en medio MEM+10% FBS y expuesto a una concentración final de 0,05  $\mu\text{g/ml}$  de Adriamicina. La medida de los diámetros ortogonales (a y b) se realizó en los intervalos de tiempo prefijados.

T(días)	a( $\mu\text{m}$ )	b( $\mu\text{m}$ )	$\Phi$ ( $\mu\text{m}$ )	V · 10 <sup>6</sup> ( $\mu\text{m}^3$ )
0	590	590	590.00	107.54
2	620	630	623.32	126.80
4	690	710	696.60	176.99
6	660	670	663.32	152.81
8	800	800	800.00	268.08
11	780	790	783.32	251.66
13	860	860	860.00	333.04
15	860	860	860.00	333.04
17	880	880	880.00	356.82
20	930	960	939.89	434.75
22	1000	1000	1000.00	523.60
23	1000	1025	1008.26	536.69
27	1000	1025	1008.26	536.69
31	1050	1075	1058.27	620.56
34	1050	1100	1066.41	634.99

TABLA 196

Parámetros de crecimiento del esferoide 333QT cultivado individualmente en medio MEM+10% FBS y expuesto a una concentración final de 0,05  $\mu\text{g/ml}$  de Adriamicina. La medida de los diámetros ortogonales (a y b) se realizó en los intervalos de tiempo prefijados.

T(días)	a( $\mu\text{m}$ )	b( $\mu\text{m}$ )	$\Phi$ ( $\mu\text{m}$ )	V · 10 <sup>6</sup> ( $\mu\text{m}^3$ )
0	470	470	470.00	54.36
2	520	530	523.31	75.04
4	590	590	590.00	107.54
6	580	610	589.83	107.44
8	710	710	710.00	187.40
11	730	750	736.61	209.27
13	750	770	756.61	226.78
15	780	780	780.00	248.47
17	810	820	813.32	281.70
20	900	900	900.00	381.70
23	960	960	960.00	463.25
27	990	1000	993.32	513.18
29	1050	1075	1058.27	620.56
31	1025	1125	1057.30	618.87
34	1100	1125	1108.27	712.75
38	1125	1175	1141.43	778.65

TABLA 197

Parámetros de crecimiento del esferoide 334QT cultivado individualmente en medio MEM+10% FBS y expuesto a una concentración final de 0,05  $\mu\text{g/ml}$  de Adriamicina. La medida de los diámetros ortogonales (a y b) se realizó en los intervalos de tiempo prefijados.

T(días)	a( $\mu\text{m}$ )	b( $\mu\text{m}$ )	$\Phi$ ( $\mu\text{m}$ )	V · 10 <sup>6</sup> ( $\mu\text{m}^3$ )
0	480	530	496.12	63.94
2	530	560	539.82	82.36
4	570	580	573.31	98.67
6	530	550	536.58	80.89
8	670	710	683.08	166.88
11	680	720	693.08	174.32
13	670	750	695.67	176.28
13	800	800	800.00	268.08
17	820	850	829.88	299.26
20	880	930	896.36	377.09
22	1000	1000	1000.00	523.60
23	1025	1025	1025.00	563.86
27	1025	1075	1041.40	591.36
29	1200	1225	1208.28	923.63
34	1200	1275	1224.50	961.33
38	1375	1450	1399.56	1435.40

TABLA 198

Parámetros de crecimiento del esferoide 321QT cultivado individualmente en medio MEM+10% FBS y expuesto a una concentración final de 0,5  $\mu\text{g/ml}$  de Adriamicina. La medida de los diámetros ortogonales (a y b) se realizó en los intervalos de tiempo prefijados.

T(días)	a( $\mu\text{m}$ )	b( $\mu\text{m}$ )	$\Phi$ ( $\mu\text{m}$ )	V · 10 <sup>6</sup> ( $\mu\text{m}^3$ )
0	410	430	416.56	37.85
3	430	490	449.14	47.44
4	520	540	526.58	76.45
6	550	580	559.82	91.87
8	590	590	590.00	107.54
10	520	590	542.36	83.53
12	600	640	613.05	120.64
15	640	640	640.00	137.26
18	600	700	631.64	131.95
20	650	660	653.32	146.01
22	650	690	663.07	152.64
25	700	700	700.00	179.59
27	710	720	713.32	190.04
28	680	690	683.32	167.06
32	620	620	620.00	124.79
34	670	690	676.60	162.18
36	660	670	663.32	152.81
39	640	840	700.72	180.15
43	580	630	596.21	110.97

TABLA 199

Parámetros de crecimiento del esferoide 322QT cultivado individualmente en medio MEM+10% FBS y expuesto a una concentración final de 0,5 µg/ml de Adriamicina. La medida de los diámetros ortogonales (a y b) se realizó en los intervalos de tiempo prefijados.

T(días)	a(µm)	b(µm)	Φ(µm)	V · 10 <sup>6</sup> (µm <sup>3</sup> )
0	350	360	353.30	23.09
3	400	470	422.09	39.37
4	460	620	508.12	68.69
7	510	600	538.39	81.71
8	600	660	619.37	124.41
11	540	570	549.82	87.03
13	580	610	589.83	107.44
16	580	620	593.04	109.21
18	660	680	666.60	155.09
20	650	680	659.85	150.43
22	670	670	670.00	157.48
25	690	700	693.32	174.50
27	700	700	700.00	179.59
28	610	750	653.49	146.12
32	570	630	589.34	107.17
34	660	680	666.60	155.09
36	650	660	653.32	146.01
39	540	680	583.13	103.82
43	460	460	460.00	50.96

TABLA 200

Parámetros de crecimiento del esferoide 323QT cultivado individualmente en medio MEM+10% FBS y expuesto a una concentración final de 0,5 µg/ml de Adriamicina. La medida de los diámetros ortogonales (a y b) se realizó en los intervalos de tiempo prefijados.

T(días)	a(µm)	b(µm)	Φ(µm)	V · 10 <sup>6</sup> (µm <sup>3</sup> )
0	360	360	360.00	24.43
4	590	620	599.84	113.00
7	600	610	603.31	114.98
9	620	630	623.32	126.80
11	620	640	626.60	128.81
13	720	750	729.86	203.58
16	700	720	706.60	184.73
18	720	720	720.00	195.43
20	660	700	673.07	159.66
22	700	700	700.00	179.59
25	700	750	716.28	192.42
27	730	740	733.32	206.48
28	730	750	736.61	209.27
32	680	690	683.32	167.06
34	700	710	703.32	182.16
36	660	680	666.60	155.09
39	660	670	663.32	152.81
43	670	670	670.00	157.48

TABLA 201

Parámetros de crecimiento del esferoide 324QT cultivado individualmente en medio MEM+10% FBS y expuesto a una concentración final de 0,5 µg/ml de Adriamicina. La medida de los diámetros ortogonales (a y b) se realizó en los intervalos de tiempo prefijados.

T(días)	a(µm)	b(µm)	Φ(µm)	V · 10 <sup>6</sup> (µm <sup>3</sup> )
0	420	610	475.64	56.34
3	450	560	484.03	59.38
5	520	640	557.27	90.61
7	500	620	537.17	81.16
9	500	630	540.04	82.47
12	530	650	567.31	95.60
14	590	690	621.61	125.76
16	550	660	584.46	104.54
18	540	650	574.43	99.24
21	580	680	611.58	119.77
23	600	680	625.56	128.18
24	600	680	625.56	128.18
28	540	650	574.43	99.24
30	560	680	597.44	111.66
32	480	630	525.54	76.00
35	490	600	524.22	75.43
39	480	600	517.06	72.38

TABLA 202

Parámetros de crecimiento del esferoide 325QT cultivado individualmente en medio MEM+10% FBS y expuesto a una concentración final de 0,5  $\mu\text{g/ml}$  de Adriamicina. La medida de los diámetros ortogonales (a y b) se realizó en los intervalos de tiempo prefijados.

T(días)	a( $\mu\text{m}$ )	b( $\mu\text{m}$ )	$\Phi$ ( $\mu\text{m}$ )	V · 10 <sup>6</sup> ( $\mu\text{m}^3$ )
0	670	670	670.00	157.48
3	680	690	683.32	167.06
5	680	690	683.32	167.06
7	650	660	653.32	146.01
9	750	760	753.32	223.84
12	750	760	753.32	223.84
14	750	780	759.87	229.73
16	750	790	763.10	232.67
18	770	810	783.11	251.46
21	820	850	829.88	299.26
23	820	850	829.88	299.26
24	800	900	832.03	301.59
28	820	950	861.23	334.46
32	640	730	668.69	156.56
39	430	480	446.06	46.47
39	400	450	416.02	37.70



TABLA 203

Ajuste a la Ecuación del modelo de Gompertz de los parámetros de crecimiento de los esferoides MCF-7 mantenidos individualmente en medio MEM+10% FBS y expuestos a diferentes concentraciones finales de quimioterápico Adriamicina (0,005-0,5 $\mu$ g/ml).

[ADM] $\mu$ g/ml				
Cod.esf.	t (días)	A	a ( $10^{-2}$ )	Coef. Correl.
0,005				
338QT	38	0.164	3.50	0.975
341QT	38	0.256	7.57	0.987
342QT	38	0.191	4.09	0.966
343QT	38	0.164	4.92	0.983
344QT	38	0.091	2.91	0.912
0,05				
329QT	38	0.108	3.20	0.986
331QT	38	0.156	3.50	0.978
332QT	34	0.113	5.17	0.974
333QT	38	0.153	4.90	0.991
334QT	38	0.101	1.10	0.976
0,5				
322QT	43	0.020	18600	<0.10
323QT	43	0.000	0.00	0.000
324QT	39	0.006	158000	0.000
325QT	39	0.000	00	0.000
327QT	39	0.003	241000	<0.10

TABLA 204

Ajuste a la Ecuación del modelo de Verhulst-Pearl de los parámetros de crecimiento de los esferoides MCF-7 mantenidos individualmente en medio MEM+10% FBS tratados con diferentes concentraciones finales de quimioterápico Adriamicina (0,005-0,5 $\mu$ g/ml).

[ADM] $\mu$ g/ml				
Cod.esf.	t (días)	$\delta$	D ( $10^{-10}$ )	Coef. Correl.
0,005				
338QT	38	0.139	82.00	0.940
341QT	38	0.182	1.25	0.865
342QT	38	0.191	99.90	0.863
343QT	38	0.139	1.78	0.967
344QT	38	0.091	64.80	0.885
0,05				
329QT	38	0.104	99.6	0.983
331QT	38	0.136	1.72	0.965
332QT	34	0.115	1.62	0.978
333QT	38	0.133	1.65	0.968
334QT	38	0.093	35.10	0.977
0,5				
322QT	43	0.020	150000	<0.10
323QT	43	0.021	136000	0.000
324QT	39	0.006	280000	<0.10
325QT	39	0.000	4290000	0.000
327QT	39	0.004	458000	<0.10

TABLA 205

Ajuste a la Ecuación del modelo de Betalanffy de los parámetros de crecimiento de los esferoides MCF-7 mantenidos individualmente en medio MEM+10% FBS tratados con diferentes concentraciones finales de quimioterápico Adriamicina (0,005-0,5 $\mu$ g/ml).

[ADM] $\mu$ g/ml				
Cod. E f.	t (días)	B	B (10 <sup>-2</sup> )	Coef. Correl.
0,005				
338QT	38	0.890	83.10	0.977
341QT	38	0.710	4.10	0.992
342QT	38	0.890	94.90	0.975
343QT	38	0.734	2.25	0.984
344QT	38	0.746	1.11	0.916
0,05				
329QT	38	0.782	1.10	0.987
331QT	38	0.881	83.80	0.977
332QT	34	0.520	4.25	0.975
333QT	38	0.724	2.10	0.992
334QT	38	0.921	43.90	0.972
0,5				
322QT	43	5.300	56.40	0.215
323QT	43	0.000	0.00	0.000
324QT	39	5.300	15.90	<0.10
325QT	39	0.999	0.00	<0.10
327QT	39	0.999	0.00	<0.10

TABLA 206

Ajuste de los parámetros de crecimiento de los esferoides MCF-7 mantenidos individualmente en medio MEM+10% FBS y expuestos a diferentes concentraciones de Adriamicina (0,005-5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). a la Ecuación de los modelos de Gompertz, Verhulst-Pearl y Bertalanffy. Se expresan los valores medios de las constantes, la desviación estándar y el rango del coeficiente de correlación, en cada caso.

<u>GOMPERTZ</u>			
[ADM] ( $\mu\text{m}/\text{ml}$ )	A	a ( $10^{-2}$ )	Coefficiente de correlación
0,005	0,166 $\pm$ 0,050	4,46 $\pm$ 1,53	0,987-0,912
0,05	0,126 $\pm$ 0,026	3,57 $\pm$ 1,62	0,991-0,974
0,5	0,149 $\pm$ 0,371	0,00 $\pm$ 0,00	<0,10-0,000
5	-	-	-

<u>VERHULST-PEARL</u>			
	$\delta$	D ( $10^{-9}$ )	Coefficiente de correlación
0,005	0,136 $\pm$ 0,028	54,17 $\pm$ 39,44	0,987-0,912
0,05	0,117 $\pm$ 0,016	27,93 $\pm$ 42,59	0,983-0,630
0,5	0,010 $\pm$ 0,010	-	0,571-0,000
5	-	-	-

<u>BERTALANFFY</u>			
	B	B ( $10^{-2}$ )	Coefficiente de correlación
0,005	0,814 $\pm$ 0,082	36,33 $\pm$ 67,47	0,992-0,916
0,05	0,765 $\pm$ 0,157	27,03 $\pm$ 36,46	0,992-0,972
0,5	2,080 $\pm$ 2,220	36,33 $\pm$ 67,47	0,610-0,000
5	-	-	-

### 3.6. RADIOTERAPIA

Los esferoides multicelulares han sido durante los últimos años uno de los modelos experimentales más utilizados para valorar "in vitro" el efecto de la radiación ionizante. Por su peculiar estructura los esferoides representan un modelo de complejidad intermedia entre la simplicidad del cultivo en "monocapa" y los modelos animales.

La virtualidad de los esferoides en estudios de radiobiología básica queda de manifiesto si consideramos la respuesta de esferoides MCF-7 de distinto tamaño a la acción de diferentes dosis de radiación. Sometiendo, en efecto, esferoides individualizados a dosis de radiación variable (1-20 Gy) procedentes de una fuente de Co-60 y procediendo, como en casos anteriores, al análisis de cada esferoide, se han obtenido los parámetros de crecimiento y el ajuste de estos a las ecuaciones de los modelos de Gompertz, Bertalanffy y de Verhulst-Pearl. Los datos obtenidos se recogen en las Tablas 207-226, para grupos de 4 esferoides irradiados a diferentes niveles de dosis. Las Tablas 227-229 y 230 ofrecen, como de costumbre, los datos de ajuste a las ecuaciones mencionadas y presentan el valor medio de las constantes de cada ecuación.

TABLA 207

Parámetros de crecimiento del esferoide 36RT cultivado individualmente en medio MEM+10% FBS y administrados 2 Gy al tiempo cero. La medida de los diámetros ortogonales (a y b) se realizó en los intervalos de tiempo prefijados.

T(días)	a(μm)	b(μm)	Φ(μm)	V·10 <sup>6</sup> (μm <sup>3</sup> )
0	300	300	300.00	14.14
2	340	400	358.93	24.21
4	380	450	402.03	34.02
6	420	500	445.13	46.18
8	470	550	495.28	63.61
10	420	490	442.15	45.26
12	600	670	622.48	126.29
14	700	750	716.28	192.42
16	750	800	766.31	235.62
20	880	920	893.14	373.04
23	1000	1000	1000.00	523.60
27	1050	1050	1050.00	606.13
30	1050	1050	1050.00	606.13
34	1125	1125	1125.00	745.51
37	1150	1150	1150.00	796.33

TABLA 208

Parámetros de crecimiento del esferoide 37RT cultivado individualmente en medio MEM+10% FBS y administrados 2 Gy al tiempo cero. La medida de los diámetros ortogonales (a y b) se realizó en los intervalos de tiempo prefijados.

T(días)	a( $\mu\text{m}$ )	b( $\mu\text{m}$ )	$\Phi$ ( $\mu\text{m}$ )	V $\cdot 10^6$ ( $\mu\text{m}^3$ )
0	290	290	290.00	12.77
2	350	350	350.00	22.45
4	400	400	400.00	33.51
6	510	510	510.00	69.46
8	580	580	580.00	102.16
10	610	610	610.00	118.85
12	690	700	693.32	174.50
14	840	890	856.35	328.81
16	900	900	900.00	381.70
20	1150	1150	1150.00	796.33
23	1200	1200	1200.00	904.78
27	1250	1250	1250.00	1022.65
30	1325	1500	1380.94	1378.86
34	1375	1575	1438.67	1559.14
37	1500	1750	1579.09	2061.67

TABLA 209

Parámetros de crecimiento del esferoide 38RT cultivado individualmente en medio MEM+10% FBS y administrados 2 Gy al tiempo cero. La medida de los diámetros ortogonales (a y b) se realizó en los intervalos de tiempo prefijados.

T(días)	a( $\mu\text{m}$ )	b( $\mu\text{m}$ )	$\Phi$ ( $\mu\text{m}$ )	V $\cdot 10^6$ ( $\mu\text{m}^3$ )
0	300	300	300.00	14.14
2	400	400	400.00	33.51
4	470	470	470.00	54.36
6	590	620	599.84	113.00
8	810	810	810.00	278.26
10	820	820	820.00	288.70
12	950	950	950.00	448.92
14	1050	1050	1050.00	606.13
16	1075	1075	1075.00	650.46
20	1250	1250	1250.00	1022.65
23	1225	1300	1249.51	1021.44
27	1175	1275	1207.43	921.69
30	1150	1250	1182.41	865.57
34	1200	1275	1224.50	961.33
37	1375	1450	1399.56	1435.40



TABLA 210

Parámetros de crecimiento del esferoide 39RT cultivado individualmente en medio MEM+10% FBS y administrados 2 Gy al tiempo cero. La medida de los diámetros ortogonales (a y b) se realizó en los intervalos de tiempo prefijados.

T(días)	a(μm)	b(μm)	Φ(μm)	V·10 <sup>6</sup> (μm <sup>3</sup> )
0	300	300	300.00	14.14
2	380	380	380.00	28.73
4	430	430	430.00	41.63
6	540	540	540.00	82.45
8	570	570	570.00	96.97
10	650	650	650.00	143.79
12	720	720	720.00	195.43
14	820	820	820.00	288.70
16	930	930	930.00	421.16
20	1175	1175	1175.00	849.40
23	1350	1350	1350.00	1288.25
27	1625	1625	1625.00	2246.77
30	1575	1575	1575.00	2045.69
34	1525	1700	1581.23	2070.08
37	1875	1950	1899.67	3589.51

TABLA 211

Parámetros de crecimiento del esferoide 13RT cultivado individualmente en medio MEM+10% FBS y administrados 3 Gy al tiempo cero. La medida de los diámetros ortogonales (a y b) se realizó en los intervalos de tiempo prefijados.

T(días)	a(μm)	b(μm)	Φ(μm)	V·10 <sup>6</sup> (μm <sup>3</sup> )
0	390	400	393.31	31.86
1	400	420	406.56	35.19
3	380	470	407.90	35.54
5	440	540	471.09	54.74
7	480	550	502.28	66.35
10	550	650	581.50	102.95
12	630	780	676.49	162.10
15	730	800	752.62	223.22
17	820	850	829.88	299.26
19	830	880	846.34	317.42
21	900	900	900.00	381.70
24	870	1020	917.37	404.24
26	1000	1100	1032.28	575.96
33	1125	1125	1125.00	745.51
38	1250	1250	1250.00	1022.65
41	1250	1250	1250.00	1022.65

TABLA 212

Parámetros de crecimiento del esferoide 14RT cultivado individualmente en medio MEM+10% FBS y administrados 3 Gy al tiempo cero. La medida de los diámetros ortogonales (a y b) se realizó en los intervalos de tiempo prefijados.

T(días)	a(μm)	b(μm)	Φ(μm)	V·10 <sup>6</sup> (μm <sup>3</sup> )
0	110	110	110.00	.70
1	120	120	120.00	.90
3	200	200	200.00	4.19
4	250	250	250.00	8.18
5	250	250	250.00	8.18
7	300	300	300.00	14.14
9	380	380	380.00	28.73
11	410	410	410.00	36.09
14	540	540	540.00	82.45
16	610	610	610.00	118.85
19	660	660	660.00	150.53
21	680	680	680.00	164.64
23	680	680	680.00	164.64
25	700	720	706.60	184.73
28	770	790	776.61	245.25
30	720	800	745.74	217.15
37	900	900	900.00	381.70
42	1000	1000	1000.00	523.60
45	1000	1000	1000.00	523.60

TABLA 213

Parámetros de crecimiento del esferoide 15RT cultivado individualmente en medio MEM+10% FBS y administrados 3 Gy al tiempo cero. La medida de los diámetros ortogonales (a y b) se realizó en los intervalos de tiempo prefijados.

T(días)	a( $\mu\text{m}$ )	b( $\mu\text{m}$ )	$\Phi$ ( $\mu\text{m}$ )	V $\cdot 10^8$ ( $\mu\text{m}^3$ )
0	510	510	510	69.46
2	570	570	570	96.97
5	650	650	650	143.79
7	790	790	790	258.15
10	900	900	900	381.70
12	970	970	970	477.87
14	1025	1025	1025	563.86
16	1150	1150	1150	796.33
19	1300	1300	1300	1150.35
21	1425	1425	1425	1515.11
28	1950	1950	1950	3882.42

TABLA 214

Parámetros de crecimiento del esferoide 16RT cultivado individualmente en medio MEM+10% FBS y administrados 3 Gy al tiempo cero. La medida de los diámetros ortogonales (a y b) se realizó en los intervalos de tiempo prefijados.

T(días)	a( $\mu\text{m}$ )	b( $\mu\text{m}$ )	$\Phi$ ( $\mu\text{m}$ )	V $\cdot 10^6$ ( $\mu\text{m}^3$ )
0	450	450	450.00	47.71
2	510	510	510.00	69.46
5	600	600	600.00	113.10
7	660	660	660.00	150.53
10	730	730	730.00	203.69
12	740	800	759.48	229.38
14	790	850	809.51	277.76
16	850	930	875.87	351.82
19	1025	1025	1025.00	563.86
21	1000	1075	1024.40	562.87
28	1150	1150	1150.00	796.33
33	1200	1200	1200.00	904.78
37	1375	1375	1375.00	1361.15

TABLA 215

Parámetros de crecimiento del esferoide 17RT cultivado individualmente en medio MEM+10% FBS y administrados 6 Gy al tiempo cero. La medida de los diámetros ortogonales (a y b) se realizó en los intervalos de tiempo prefijados.

T(días)	a(μm)	b(μm)	Φ(μm)	V·10 <sup>3</sup> (μm <sup>3</sup> )
0	600	600	600.00	113.10
2	550	570	556.59	90.28
5	690	690	690.00	172.01
7	740	740	740.00	212.17
10	800	800	800.00	268.08
12	800	850	816.33	284.84
14	870	870	870.00	344.79
16	950	1000	966.38	472.55
19	900	1040	944.44	441.08
21	1125	1125	1125.00	745.51
28	1200	1200	1200.00	904.78
33	1300	1300	1300.00	1150.35
36	1425	1425	1425.00	1515.11

TABLA 216

Parámetros de crecimiento del esferoide 18RT cultivado individualmente en medio MEM+10% FBS y administrados 6 Gy al tiempo cero. La medida de los diámetros ortogonales (a y b) se realizó en los intervalos de tiempo prefijados.

T(días)	a( $\mu$ m)	b( $\mu$ m)	$\Phi$ ( $\mu$ m)	V $\cdot 10^6$ ( $\mu$ m <sup>3</sup> )
0	320	340	326.53	18.23
2	330	330	330.00	18.82
5	370	370	370.00	26.52
7	400	400	400.00	33.51
10	400	400	400.00	33.51
14	600	600	600.00	113.10
19	680	680	680.00	164.64
28	875	875	875.00	350.77

TABLA 217

Parámetros de crecimiento del esferoide 20RT cultivado individualmente en medio MEM+10% FBS y administrados 6 Gy al tiempo cero. La medida de los diámetros ortogonales (a y b) se realizó en los intervalos de tiempo prefijados.

T(días)	a(μm)	b(μm)	Φ(μm)	V·10 <sup>6</sup> (μm <sup>3</sup> )
0	460	480	466.57	53.18
2	500	520	506.58	68.07
5	550	550	550.00	87.11
7	610	610	610.00	118.85
10	620	680	639.39	136.86
12	670	730	689.43	171.58
14	760	760	760.00	229.85
16	770	840	792.66	250.77
19	830	920	858.98	331.85
21	900	950	916.37	402.91
28	1075	1075	1075.00	650.46



TABLA 218

Parámetros de crecimiento del esferoide 21RT cultivado individualmente en medio MEM+10% FBS y administrados 6 Gy al tiempo cero. La medida de los diámetros ortogonales (a y b) se realizó en los intervalos de tiempo prefijados.

T(días)	a( $\mu\text{m}$ )	b( $\mu\text{m}$ )	$\Phi$ ( $\mu\text{m}$ )	V $\cdot 10^6$ ( $\mu\text{m}^3$ )
0	490	510	496.58	64.12
2	480	520	492.98	62.73
5	550	550	550.00	87.11
7	640	640	640.00	137.26
10	710	710	710.00	187.40
12	750	800	766.31	235.62
14	800	800	800.00	268.08
17	820	880	839.53	309.82
19	950	1000	966.38	472.55
21	1000	1000	1000.00	523.60
28	1200	1200	1200.00	904.78
33	1300	1300	1300.00	1150.35
36	1350	1350	1350.00	1288.25

TABLA 219

Parámetros de crecimiento del esteroide 22RT cultivado individualmente en medio MEM+10% FBS y administrados 9 Gy al tiempo cero. La medida de los diámetros ortogonales (a y b) se realizó en los intervalos de tiempo prefijados.

T(días)	a(μm)	b(μm)	Φ(μm)	V·10 <sup>6</sup> (μm <sup>3</sup> )
0	480	480	480.00	57.91
2	450	450	450.00	47.71
5	500	520	506.58	68.07
7	510	530	516.58	72.18
10	550	550	550.00	87.11
12	570	570	570.00	96.97
14	440	550	473.98	55.75
16	530	530	530.00	77.95
19	620	620	620.00	124.79
21	550	550	550.00	87.11
28	510	550	523.00	74.90
33	500	520	506.58	68.07
36	550	570	556.59	90.28
40	500	550	516.14	71.99
43	500	550	516.14	71.99

TABLA 220

Parámetros de crecimiento del esferoide 23RT cultivado individualmente en medio MEM+10% FBS y administrados 9 Gy al tiempo cero. La medida de los diámetros ortogonales (a y b) se realizó en los intervalos de tiempo prefijados.

T(días)	a( $\mu\text{m}$ )	b( $\mu\text{m}$ )	$\Phi$ ( $\mu\text{m}$ )	V $\cdot 10^6$ ( $\mu\text{m}^3$ )
0	500	560	519.25	73.30
2	520	550	529.81	77.87
5	550	560	553.31	88.70
7	600	600	600.00	113.10
10	620	620	620.00	124.79
12	600	600	600.00	113.10
14	600	600	600.00	113.10
16	530	680	575.91	100.01
19	620	720	651.69	144.92
21	600	730	640.53	137.60
28	620	800	674.98	161.02
33	600	810	663.13	152.68
36	700	840	743.86	215.51
40	800	900	832.03	301.59
43	870	930	889.56	368.57

TABLA 221

Parámetros de crecimiento del esferoide 24RT cultivado individualmente en medio MEM+10% FBS y administrados 9 Gy al tiempo cero. La medida de los diámetros ortogonales (a y b) se realizó en los intervalos de tiempo prefijados.

T(días)	a( $\mu\text{m}$ )	b( $\mu\text{m}$ )	$\Phi$ ( $\mu\text{m}$ )	V $\cdot 10^6$ ( $\mu\text{m}^3$ )
0	440	440	440.00	44.60
2	440	440	440.00	44.60
5	460	460	460.00	50.96
7	460	480	466.57	53.18
10	470	470	470.00	54.36
12	480	480	480.00	57.91
14	500	500	500.00	65.45
16	540	540	540.00	82.45
19	580	580	580.00	102.16
21	600	600	600.00	113.10
28	500	600	531.33	78.54
33	430	610	483.16	59.06
36	450	610	498.03	64.63
40	450	610	498.03	64.68
43	510	600	538.39	81.71

TABLA 222

Parámetros de crecimiento del esferoide 25RT cultivado individualmente en medio MEM+10% FBS y administrados 9 Gy al tiempo cero. La medida de los diámetros ortogonales (a y b) se realizó en los intervalos de tiempo prefijados.

T(días)	a( $\mu\text{m}$ )	b( $\mu\text{m}$ )	$\Phi$ ( $\mu\text{m}$ )	V $\cdot 10^8$ ( $\mu\text{m}^3$ )
0	370	370	370.00	26.52
2	370	370	370.00	26.52
5	380	400	386.55	30.24
7	370	420	385.97	30.11
10	410	410	410.00	36.09
12	400	400	400.00	33.51
14	400	400	400.00	33.51
16	400	400	400.00	33.51
19	400	400	400.00	33.51
21	450	450	450.00	47.71
28	400	430	409.76	36.02
33	400	440	412.91	36.86
36	370	420	385.97	30.11
40	370	400	379.74	28.67
43	370	400	379.74	28.67

TABLA 223

Parámetros de crecimiento del esferoide 27RT cultivado individualmente en medio MEM+10% FBS y administrados 12 Gy al tiempo cero. La medida de los diámetros ortogonales (a y b) se realizó en los intervalos de tiempo prefijados.

T(días)	a(μm)	b(μm)	Φ(μm)	V·10 <sup>6</sup> (μm <sup>3</sup> )
0	300	300	300.00	14.14
2	470	470	470.00	54.36
5	500	500	500.00	65.45
7	570	570	570.00	96.97
10	510	510	510.00	69.46
12	500	500	500.00	65.45
14	480	510	489.80	61.52
16	490	510	496.58	64.12
19	490	490	490.00	61.60
21	520	520	520.00	73.62
28	500	500	500.00	65.45
33	460	500	472.96	55.40
36	490	490	490.00	61.60
40	480	480	480.00	57.91
43	480	480	480.00	57.91

TABLA 224

Parámetros de crecimiento del esferoide 28RT cultivado individualmente en medio MEM+10% FBS y administrados 12 Gy al tiempo cero. La medida de los diámetros ortogonales (a y b) se realizó en los intervalos de tiempo prefijados.

T(días)	a(μm)	b(μm)	$\bar{\Phi}$ (μm)	V·10 <sup>6</sup> (μm <sup>3</sup> )
0	420	450	429.77	41.56
2	390	390	390.00	31.06
5	400	450	416.02	37.70
7	420	420	420.00	38.79
10	440	440	440.00	44.60
12	400	440	412.91	36.86
14	430	460	439.78	44.53
16	450	450	450.00	47.71
19	450	450	450.00	47.71
21	480	480	480.00	57.91
28	430	480	446.06	46.47
33	430	450	436.57	43.57
36	450	450	450.00	47.71
40	450	450	450.00	47.71
43	450	450	450.00	47.71

TABLA 225

Parámetros de crecimiento del esferoide 29RT cultivado individualmente en medio MEM+10% FRS y administrados 12 Gy al tiempo cero. La medida de los diámetros ortogonales (a y b) se realizó en los intervalos de tiempo prefijados.

T(días)	a(μm)	b(μm)	Φ(μm)	V·10 <sup>6</sup> (μm <sup>3</sup> )
0	470	470	470.00	54.36
2	430	470	442.94	45.50
5	470	470	470.00	54.36
7	530	530	530.00	77.95
10	500	500	500.00	65.45
12	500	500	500.00	65.45
14	510	510	510.00	69.46
16	520	520	520.00	73.62
19	530	560	539.82	82.36
21	560	560	560.00	91.95
28	420	550	459.50	50.80
33	400	520	436.56	43.56
36	520	520	520.00	73.62
40	510	510	510.00	69.46
43	510	510	510.00	69.46



TABLA 226

Parámetros de crecimiento del esferoide 32RT cultivado individualmente en medio MEM+10% FBS y administrados 12  $\mu$ y al tiempo cero. La medida de los diámetros ortogonales (a y b) se realizó en los intervalos de tiempo prefijados.

T(días)	a( $\mu$ m)	b( $\mu$ m)	$\Phi$ ( $\mu$ m)	V $\cdot 10^6$ ( $\mu$ m <sup>3</sup> )
0	610	630	616.60	122.74
2	500	560	519.25	73.30
5	610	610	610.00	118.85
7	570	620	586.20	105.47
10	600	600	600.00	113.10
12	630	630	630.00	130.92
14	650	650	650.00	143.79
16	630	630	630.00	130.92
19	640	680	653.07	145.84
21	700	700	700.00	179.59

TABLA 227

Ajuste a la Ecuación del modelo de Gompertz de los parámetros de crecimiento de los esferoides MCF-7 mantenidos individualmente en medio MEM+10% FBS tras la administración de diferentes dosis de radiación (2-12 Gy).

DOSIS (Gy)				
Cod.Esf.	t (dias)	A	a (10 <sup>-2</sup> )	Coef. Correl.
2				
36RT	37	0.243	4.94	0.972
37RT	37	0.316	5.42	0.990
38RT	37	0.494	10.68	0.767
39RT	37	0.304	4.51	0.979
3				
13RT	41	0.146	2.70	0.983
14RT	45	0.540	8.00	0.960
15RT	28	0.173	1.53	0.995
16RT	37	0.179	4.48	0.980
6				
17RT	36	0.078	33.40	0.965
19RT	21	0.128	52.30	0.983
20RT	28	0.111	1.58	0.996
21RT	36	0.103	93.60	0.983
9				
22RT	43	0.004	0.001	0.062
23RT	43	0.035	56.1	0.875
24RT	40	0	0	0.000
25RT	43	0	0	0.000
12				
27RT	43	0	0.00	0.000
28RT	43	0	0.00	0.000
29RT	43	0	0.00	0.000
31RT	21	0	0.00	0.000

TABLA 228

Ajuste a la Ecuación del modelo de Verhulst-Pearl de los parámetros de crecimiento de los esferoides MCF-7 mantenidos individualmente en medio MEM+10% FBS tras la administración de diferentes dosis de radiación (2-12 Gy).

DOSIS (Gy)				
Cod.esf.	t (días)	$\delta$	D ( $10^{-10}$ )	Coef. Correl.
2				
36RT	37	0.191	2.34	0.981
37RT	37	0.228	1.11	0.870
38RT	37	0.286	2.10	0.570
39RT	37	0.230	63.90	0.870
3				
13RT	41	0.128	99.50	0.988
14RT	45	0.321	6.13	0.798
15RT	28	0.164	23.00	0.992
16RT	37	0.149	1.06	0.918
6				
17RT	36	0.079	793	0.966
19RT	21	0.128	45.2	0.983
20RT	28	0.110	81.1	0.997
21RT	36	0.101	28.9	0.985
9				
22RT	43	0.005	0	<0.10
23RT	43	0.031	0	0.888
24RT	40	0.010	0	0.258
25RT	43	0.002	0	<0.10
12				
27RT	43	0	0	-
28RT	43	0.006	0	0.362
29RT	43	0.003	0.04	<0.10
31RT	21	0.026	0	0.589

TABLA 229

Ajuste a la Ecuación del modelo de Betalanffy de los parámetros de crecimiento de los esferoides MCF-7 mantenidos individualmente en medio MEM+10% FBS tras la administración de diferentes dosis de radiación (2-12 Gy).

DOSIS (Gy)	t (días)	B	B (10 <sup>-2</sup> )	Coef. Correl.
Cod.Esf.				
2	37	0.790	4.10	0.977
36RT	37	0.910	1.58	0.989
37RT	37	0.820	3.87	0.888
38RT	37	0.971	47.20	0.976
39RT				
3	42	0.840	1.40	0.911
13RT	42	0.924	2.46	0.987
14RT	46	0.961	41.00	0.966
15RT	40	0.845	1.21	0.985
16RT				
6	40	0.913	39.30	0.980
17RT	34	0.908	70.10	0.949
19RT	34	0.890	62.60	0.990
20RT	38	0.925	44.50	0.992
21RT				
9	36	5.3	12.80	0.075
22RT	32	0.880	19.10	0.857
23RT	34	5.3	28.00	0.254
24RT	38	5.3	435.00	0.021
25RT				
12	36	0.3	1.23	0.248
27RT	34	1.1	193.00	0.372
28RT	46	0.7	391.00	0.007
29RT	40	0.3	2.04	0.639
31RT				

TABLA 230

Ajuste de los parámetros de crecimiento de los esferoides MCF-7 mantenidos individualmente en medio MEM+10% FBS tras la administración de diferentes dosis de radiación gamma (2-12 Gy) a las ecuaciones de los modelos de Gompertz, Verhulst-Pearl y Bertalanffy. Se expresan los valores medios de las constantes, la desviación estándar y el rango del coeficiente de correlación, en cada caso.

<u>GOMPERTZ</u>			
DOSIS (Gy)	A	a (10 <sup>-2</sup> )	Coefficiente de correlación
2	0,330±0,100	6,3±2,8	0,767-0,990
3	0,259±0,187	4,1±2,8	0,961-0,995
6	0,105±0,021	45,2±38,4	0,965-0,996
9	0,007±0,010	11,2±25,0	<0.10-0,875
12	-	-	-

<u>VERHULST-PEARL</u>			
	δ	D (10 <sup>-9</sup> )	Coefficiente de correlación
2	0,233±0,039	17,36±31,02	0,570-0,987
3	0,290±0,071	0,36±2,61	0,983-0,996
6	0,338±0,083	2,07±1,73	0,923-0,986
9	0,011±0,011	0	0,077-0,888
12	0,413±0,905	0	0,000-0,589

<u>BERTALANFFY</u>			
	B	B (10 <sup>-2</sup> )	Coefficiente de correlación
2	0,872±0,083	14,1±22,0	0,888-0,989
3	0,892±0,059	11,5±19,6	0,966-0,995
6	0,909±0,014	54,1±14,5	0,949-0,992
9	5,330±1,124	103,1±185,5	0,021-0,857
12	0,520±0,310	122,5±170,0	0,007-0,639

#### IV. DISCUSSION

#### 4.1. GENERALIDADES

Los esferoides multicelulares (MTS) son agregados de células tumorales que se desarrollan tridimensionalmente "in vitro" y simulan las condiciones de crecimiento y el microambiente de los tumores "in vivo".

Varios factores se han descrito como cruciales a la hora de definir el crecimiento de una población celular en forma de esferoide multicelular. Brevemente, se puede decir que los gradientes de oxígeno, pH, glucosa, nutrientes y catabolitos, que se establecen en el espesor del esferoide, determinan las características de crecimiento, morfología y distribución interna de sus componentes celulares (SUTHERLAND, 1973; ACKER, 1984).

Por sus peculiares características, con una complejidad intermedia entre los modelos tumorales representados por las líneas celulares cultivadas en "monocapa" y los modelos de crecimiento tumoral en animales experimentales, los esferoides constituyen modelos ideales para la investigación oncológica. En efecto, el conocimiento de los mecanismos subyacentes a la utilización de la radiación y de agentes antineoplásicos diversos en el tratamiento del cáncer (fraccionamiento de las dosis, reoxigenación, difusión de citostáticos a través de los elementos celulares que constituyen una neoformación tumoral) pueden ser, y de hecho lo han sido, estudiados mediante el uso de este modelo tumoral

(MUELLER-KLIESSER, 1987; SUTHERLAND 1988; CARLSSON, 1989).

La heterogeneidad de las micropoblaciones celulares resultantes del crecimiento de los esferoides hacen a este modelo sumamente interesante en estudios de biología tumoral (SUTHERLAND, 1988; CARLSSON, 1989). Como las condiciones locales de cada región del esferoide influyen grandemente sobre el estado metabólico de las células es comprensible que se pueda localizar en determinados estratos celulares la expresión fenotípica característica de la estirpe celular constitutiva del esferoide y así es posible observar, por ejemplo: i) un incremento de la melanogénesis en la regiones centrales de esferoides de melanomas (ROFSTAD, 1986; DePAW-GILLET, 1988); ii) la presencia de uniones intercelulares especiales o la formación de acinis y el desarrollo de estructuras pseudoglandulares en esferoides de carcinoma de colon (LEES, 1981; SUTHERLAND, 1986); iii) la estructuración celular en unidades funcionales semejantes al folículo tiroideo en esferoides de cáncer de tiroides (MULCAHY, 1985), iv) la amplificación del oncogen c-H-ras en la mayor parte de los elementos formes que componen los esferoides formados a partir de células de cáncer de vejiga humano (KOVNAT, 1988); v) la producción de matriz extracelular estrechamente relacionada con el incremento de los elementos formes que forman el esferoide (NEDERMAN, 1984).

Es bien conocido, por otra parte, el hecho de que el crecimiento, función y morfología de las células epiteliales



están sometidos a la influencia de las interacciones dinámicas que se establecen entre las propias células epiteliales, las células mesenquimales y parenquimatosas y la matriz extracelular (BISSELL, 1982; MULCAHY, 1985). Se admite, en este sentido, que fenómenos epigenéticos tales como es el contacto célula-célula o las interacciones de los elementos formes con la matriz extracelular, tienen una importancia crucial en la respuesta de una población celular a muy diferentes estímulos y tratamientos (DERTINGER, 1981; DURAND, 1972; SACKS, 1981; DURAND, 1981; WIGLE, 1983). Esta observación es particularmente cierta en aquellos tejidos en los que las unidades funcionales más pequeñas no son los componentes celulares individuales sino estructuras celulares organizadas (NEDERMAN, 1984; MULCAHY, 1985).

Pues bien, todos estos fenómenos pueden ser estudiados, hoy día, utilizando el modelo representado por los esferoides multicelulares. De igual manera el conocimiento de los mecanismos de control de la proliferación celular encuentra en los esferoides multicelulares un modelo en el que las células hormonosensibles crecen, se estructuran y se relacionan de un modo similar a como lo hacen "in vivo". Ello les concede un interés considerable.

#### 4.2. INICIACION Y MANTENIMIENTO DEL CRECIMIENTO DE LOS ESFEROIDES

La iniciación y mantenimiento de los MTS ha sido llevada a cabo usando una metodología experimental orientada hacia la consecución del crecimiento celular sin adherencia a los dispositivos de cultivo (INCH, 1970; SUTHERLAND, 1976; YUHAS, 1977). Los métodos utilizados se pueden resumir en dos grupos: a) cultivo celular en botellas en las que se establece un movimiento continuo de fluido, como es el caso de los "spinner flask"; b) siembra celular en cajas cuyas paredes y base no permiten la adhesión de las células, situación que se da bien en cajas de cultivo cuya base ha sido tratada con una capa de ágar sólido o bien en cajas de plástico "bacteriológico".

En el presente trabajo hemos adoptado esta última metodología para cultivar los esferoides de células de origen humano MCF-7. Tanto las cajas cubiertas con una capa de ágar, como las cajas de plástico "bacteriológico" resultaron igualmente útiles para la iniciación de los esferoides. Desde un punto de vista práctico, se usaron cajas de plástico "bateriológico" de 10 cm de diámetro para la primera siembra, mientras que se reservaron las cajas de 3 cm de diámetro, con cubierta de ágar, para el mantenimiento y seguimiento de esferoides individualizados.

Es interesante considerar que la iniciación de los

esferoides se lleve a cabo, generalmente, tras la agregación de varios elementos celulares. Este fenómeno, descrito y estudiado con anterioridad (CONGER, 1983; LANDRY, 1984), determina que, en su origen, los MTS tengan atribuido el carácter clonogénico correspondiente a la estirpe celular de la que derivan. Esto quiere decir que si se desarrollan los MTS a partir de una línea celular tumoral clonada, caso de las células MCF-7, los esferoides presentarán una homogeneidad absoluta. Ahora bien, si la población celular de la que deriva el esferoide es heterogénea en cuanto a su origen clonal, los esferoides resultantes serán igualmente multiclonales. La iniciación de esferoides en cultivo no es, por tanto, un test de clonogenicidad, ni puede compararse con los métodos de medida de la capacidad clonogénica de una línea celular, como ocurre con el crecimiento celular tras dilución o siembra en medio semisólido en donde se cuantifica la formación de colonias a partir de elementos celulares únicos (McALLISTER, 1967; FOLKMAN, 1973; CARLSSON, 1977).

Una amplia revisión de la literatura demuestra que la eficacia de la formación de MTS en más de cuarenta líneas celulares tumorales establecidas y clonadas no ha superado el 50% (SUTHERLAND, 1981). Mayor es el fracaso cuando se ha intentado establecer esferoides multicelulares a partir de poblaciones celulares no tumorales, propósito conseguido sólo con células no tumorales previamente adaptadas al cultivo en monocapa y establecidas como líneas celulares (SUTHERLAND,

1984; MULCAHY, 1985). También presenta gran dificultad la iniciación de MTS a partir de muestras tomadas de biopsias tumorales, en donde la disparidad existente en la eficacia del establecimiento de los esferoides, se ha cifrado por diferentes autores entre un 2% y un 40% (JONES, 1982; DARLING, 1983; TWENTYMAN, 1983; WEST, 1984). (Es probable que la citada disparidad pueda estar relacionada con el propio criterio de definición de esferoide. Así, por ejemplo, la obtención de agregados celulares de hasta 250  $\mu\text{m}$  de diámetro ha sido considerada, en ciertos casos, como indicativa de la propiedad de organización en esferoides de células obtenidas a partir de especímenes quirúrgicos, independientemente de que dichas agrupaciones celulares no pudieran progresar a mayores volúmenes (SUTHERLAND, 1984)).

#### 4.3. ESFEROIDES MULTICELULARES DE CELULAS MCF-7

En 1978, Yuhas y colaboradores (YUHAS & TARLENTON, 1978) presentaron su experiencia sobre la formación de MTS usando líneas celulares humanas y murinas de origen mamario. A pesar de que muchas de las líneas celulares ensayadas se establecieron como MTS, no consiguieron que un determinado grupo de líneas crecieran como tales. La búsqueda de un criterio diferenciador que permitiese identificar a las células incapaces de crecer en forma de MTS les llevó a analizar un amplio repertorio de características fenotípicas. Tras un

estudio exhaustivo concluyeron que las líneas celulares mamarias derivadas de derrame pleural no crecen formando MTS, a diferencia de aquéllas que se originan de un tumor sólido que sí lo hacen. Como las células MCF-7 tienen su origen en un derrame pleural metastásico de una paciente afecta de un adenocarcinoma mamario (SOULE, 1973), los referidos autores concluyeron que tal línea celular está adaptada para crecer en suspensión, pero no forma agregados celulares de tamaño ni crecimiento significativos (YUHAS & TARLENTON, 1978).

A diferencia de estos resultados, las células MCF-7 cultivadas en nuestro laboratorio en medio MEM suplementado con 10% de suero bovino fetal se organizaron formando genuinos esferoides multicelulares. Un análisis detallado de las causas que llevaron a Yuhas y cols (YUHAS & TARLENTON, 1978) a fracasar en su intento no revela ningún dato imputable a la manipulación o metodología. En ambos casos, las células MCF-7 se mantuvieron en el mismo medio, se cultivaron en idénticas condiciones ambientales (37°C, atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>) y fueron "obligadas" a crecer como MTS en cajas de cultivo previamente tratadas con una capa de ágar al 1%. En nuestro trabajo, el medio de cultivo no se suplementó con insulina Yuhas utilizó, en cambio, insulina en su protocolo experimental (10 ug/ml). La diferencia no parece, sin embargo, importante porque, si bien, la insulina a altas concentraciones parece jugar un papel en la modulación "in vitro" de la respuesta a los estrógenos (OSBORNE 1976; BARNES, 1980 ; BUTLER, 1981;

MOORE, 1981; GROSS, 1984), es también cierto que se ha definido acertadamente a la insulina, tiroxina y otras hormonas como "reguladores metabólicos" dotados de un efecto intracelular específico (SONNENSCHNEIN, 1987). En los cultivos en monocapa de células MCF-7, las hormonas actúan sobre la captación de los nutrientes presentes en el espacio extracelular. La insuficiencia de tales nutrientes o el defecto en su internalización afecta negativamente al índice de crecimiento de los MTS, pero, desde nuestro punto de vista, tanto los nutrientes como los reguladores metabólicos no constituyen la señal fisiológica que limita la multiplicación celular en los organismos superiores.

En el presente trabajo se ha ampliado la gama de condiciones experimentales de cultivo para la iniciación y mantenimiento de los MTS y se ha incluido, dentro de lo que definimos como "iniciación y crecimiento en condiciones basales" de los esferoides, un esquema idéntico al utilizado por Yuhas y cols. (YUHAS & TARLENTON, 1978). Con objeto de conocer si previamente había habido otros intentos de formación de MTS usando células MCF-7 se realizó una intensiva búsqueda bibliográfica. Así pudimos conocer que, con el propósito de estudiar los cambios morfológicos de las células MCF-7 tratadas con estrógenos, Pourreau-Schneider y cols (POURREAU-SCHNEIDER, 1984a; POURREAU-SCHNEIDER, 1984b) cultivaron estas células sobre muy diferentes substratos (plástico hidrofílico, matriz extracelular de córnea bovina, colágeno tipo I), consiguiendo

que crecieran en suspensión y se establecieran como auténticos esferoides multicelulares. Es interesante resaltar que en ese trabajo el medio de cultivo se suplementó con 10% de suero bovino fetal previamente inactivado con calor y tratado con carbón-dextrano con objeto de eliminar los estrógenos endógenos. Dicha circunstancia experimental, de indudable mérito a la hora de valorar la respuesta a los estrógenos (SOTO, 1985), ha sido también incluida en nuestro trabajo, con una ligera modificación: la sustitución del suero heterólogo por otro de origen humano. El medio de cultivo usado por Pourreau-Schneider y cols. (POURREAU-SCHNEIDER, 1984a), contiene el indicador de pH rojo-fenol, cuya actividad estrogénica ha sido puesta de manifiesto recientemente (BERTHOIS, 1986). El conocimiento de tal circunstancia nos ha llevado a cultivar las células MCF-7 en medio sin rojo fenol, cuando el diseño de los experimentos hizo necesario la ausencia total de sustancias estrogénicas.

Intentando profundizar en las causas que motivaron la falta de éxito de Yuhas y cols (YUHAS & TARLENTON, 1978) para desarrollar los MTS a partir de las células MCF-7, se han considerado diferentes aspectos, referentes unos a la procedencia de las células MCF-7 y otros al tiempo de mantenimiento de las células en los laboratorios que han ensayado la capacidad de MCF-7 para crecer en suspensión. Así, mientras Yuhas y cols. utilizaron un pase celular muy precoz, el no. 33, Pourreau-Schneider y cols. utilizaron pases

comprendidos entre el 173 y el 202 y en nuestro trabajo se han utilizado células de pases 100 y 500, de procedencias distintas. Tanto unas como otras han ofrecido no sólo la misma capacidad para crecer como esferoides multicelulares en suspensión, sino que su respuesta a las variaciones ambientales (cambio de la composición de los medios de cultivo o tratamiento con hormonas sexuales) ha resultado en todo punto idéntica (SOTO, 1985; VILLALOBOS, 1987; OLEA, 1987). El mantenimiento prolongado de líneas celulares en cultivo, así como los posibles clonajes a los que se someten con relativa frecuencia las células, pueden ser, por lo tanto, causa de la selección de estirpes celulares con genotipos y fenotipos diferentes.

#### **4.4. CINETICA DEL PROCESO DE AGREGACION CELULAR**

La densidad de siembra celular para la iniciación de los esferoides parece tener un considerable efecto tanto en el número de unidades formadas como en el tamaño de los esferoides iniciales. Ya se ha apuntado el carácter no clonal de los MTS, demostrado por la observación experimental de que, en su origen, el MTS se forma por la agregación de los elementos formes que se encuentran en suspensión. Por esta razón, quizás, las células MCF-7 presentan una velocidad de agregación que depende fundamentalmente de la densidad celular de siembra. Así, a mayor concentración celular, medida ésta como número de



elementos formes por unidad de medio de cultivo, más rápida es la agregación, mayor el número de esferoides formados y mayor su diámetro inicial. Es importante resaltar la casi inmediata transformación de los agregados celulares en unidades perfectamente esféricas con una estructura interna similar a esferoides de mayor tamaño.

La observación de que este fenómeno de agregación inicial es la clave de la formación de muchos de los esferoides, no se opone a la existencia de una homogeneidad genotípica en los esferoides MCF-7. Esto es así por dos razones distintas: a) las células MCF-7, establecidas durante años en cultivo en monocapa, han sido regularmente clonadas por dilución; por tanto, la población celular debe ser relativamente homogénea; b) es posible (nosotros hemos tenido la ocasión de observarlo así) la formación de esferoides a partir de un elemento celular único, cuando éste se desprende de un MTS cultivado aisladamente, fenómeno que parece demostrar que células únicas pueden multiplicarse hasta originar un MTS de carácter clonal.

Dos parámetros determinan la cinética inicial de la agregación celular (LANDRY, 1984). Uno, que hace referencia a la frecuencia de colisión de las células, depende de las características físicas del sistema experimental escogido para la iniciación de los esferoides. El segundo, también relacionado con las condiciones físicas del medio, parece ligado a las propiedades biológicas de las superficies

celulares que interaccionan. De forma resumida, se puede considerar que el primero de estos factores es dependiente, casi exclusivamente, de la concentración de elementos formes en el medio de cultivo, siempre y cuando el sistema elegido para la iniciación de los MTS sea de plástico no adherente y no se someta el medio a agitación continua. A este respecto, hemos podido observar cómo la concentración de células MCF-7 inoculadas por unidad de volumen de medio para iniciar los MTS, predetermina tanto el número de esferoides resultantes como su tamaño. Así, para concentraciones de células de  $10^2$  a  $7 \cdot 10^5$  elementos por placa Petri "bacteriológica", el número de esferoides y el tamaño medio de los mismos, a las 96 horas de inoculadas las células, osciló entre 300 y 4000 esferoides/caja y 91 y 143  $\mu\text{m}$  de diámetro, respectivamente. Es curioso señalar que cuando la concentración celular ensayada en la siembra no alcanzó el umbral  $10^2$  células/caja no se pudo poner de manifiesto la presencia de esferoides ni aún prosiguiendo el cultivo durante más de 7 días.

Varias moléculas de diferente origen y naturaleza, y proteínas y glicoproteínas de alta especificidad de tejido y tipo celular, se han encontrado relacionadas con los procesos de agregación celular (HARRISON, 1980, URUSHIHARA, 1980; YOSHIDA, 1982; ENDELMAN, 1983). Tales moléculas parecen intervenir en los procesos de reconocimiento de receptores de superficie o en la agregación celular dependiente de la concentración de iones divalentes como el  $\text{Ca}^{++}$ . En efecto, en

nuestra experiencia, tanto la incubación de las células MCF-7 con una solución de tripsina (0.05%) y el agente quelante EDTA (0.025%), como el tratamiento del tapiz celular con un medio libre de iones  $\text{Ca}^{++}$  y  $\text{Mg}^{++}$ , resultan eficaces para romper las uniones intercelulares e impedir la adhesión de los elementos a la superficie plástica de cultivo. Se obtiene, de esta manera, una suspensión celular que transferida a cajas de cultivo apropiadas crece formando agregados celulares que aparecen a las pocas horas de la siembra.

Inicialmente, los agrupamientos celulares constan de pocos elementos formes (2-20), a los que se separa fácilmente por pipeteo repetido. Esta primera fase de "iniciación", que se considera relacionada con procesos de reconocimiento de la membrana celular, se sigue de una segunda "fase de compactación" (LANDRY, 1984), que permite el refuerzo de los puntos débiles de unión intercelular. La compactación celular es, probablemente, un proceso bioquímico activo, puesto que ocurre sólo a temperatura ambiente y es reducido por los inhibidores de la respiración (UMBREIT, 1975) y de la síntesis proteica (LANDRY, 1984). Quizás sea el proceso de control de esta agregación activa el que diferencie al esferoide del agregado celular y defina, como ya se ha mencionado, una propiedad, la formación de MTS, observada sólo en determinadas estirpes celulares. Debe recordarse a este respecto, que el test propuesto sobre la propiedad de las líneas celulares para crecer en suspensión, independientemente de su anclaje, valora

tan solo la formación de agregados celulares y no la capacidad de las células de crecer ordenadamente formando estructuras esferoidales multicelulares. Esto parece indicar que el crecimiento celular independiente del anclaje y la formación de los MTS, son dos procesos de diferente naturaleza.

Rápidamente, una vez que ha ocurrido la agregación de los elementos formes, se produce una acumulación de receptores en la superficie celular (CHOW, 1982), que se cree relacionada con los mecanismos de contacto célula-célula. Las interacciones celulares incluyen la aparición de uniones intercelulares especializadas como son los desmosomas, uniones densas y uniones gap (SUTHERLAND, 1971; LEES, 1981; HULSER, 1982). En todo caso, las uniones recuerdan al sistema de interacción celular observado en tumores con igual histología. Es interesante hacer notar aquí que las uniones célula-célula, especialmente las uniones de tipo gap, determinan en muchos casos una respuesta atenuada a agentes físicos de naturaleza ionizante (DURAND, 1975, 1978; SACKS, 1981; CONGER, 1981; WIGLE, 1983; DERTINGER, 1981) y se dicen responsables de la cooperación metabólica (GUGUEN-GUILLOUZO, 1983).

El papel jugado por las uniones intercelulares en el mantenimiento de la estructura de los esferoides formados por las células MCF-7 debe de ser fundamental, ya que sistemas de unión parecidos a los desmosomas son el único complejo reconocido en gran número de esferoides (SUTHERLAND, 1988). No obstante, se han descrito MTS en los cuales no se ha podido

evidenciar la existencia de desmosomas, por lo que las microproyecciones de la superficie celular y la matriz extracelular deben cumplir también una misión fundamental en el mantenimiento de la estructura del esferoide [el contacto directo célula-célula así como la interacción de los elementos formes con la matriz extracelular es un paso evolutivo muy importante dirigido hacia la formación de los organismos multicelulares (RUDDON, 1987)].

#### 4.5. MORFOLOGIA Y ESTRUCTURA DE LOS ESFEROIDES

En biología celular es bien conocido el hecho de que el crecimiento celular y la expresión de funciones de diferenciación parecen estar relacionadas con la morfología celular (FOLKMAN, 1978; MALAN-SHIBLEY, 1981). En los cultivos en monocapa la morfología de las células parece condicionada por su afinidad al sustrato (superficie de plástico sobre la cual se desarrollan), mientras que en los esferoides las células no se ven sometidas a una especial tensión estructural. Así, el examen de los esferoides de células MCF-7 pone en evidencia que mientras algunas células desarrollan sus diámetros longitudinales la mayoría adoptan formas esféricas o globulares. Este hecho es importante porque la forma globular que adoptan los elementos formes que componen el MTS, así como la esfera que constituye en sí mismo el agregado multicelular, determinan que en los esferoides la relación superficie/volumen

alcance valores mínimos (CARLSSON, 1989). Considerando, en efecto, que el volumen de una célula MCF-7, cuando adopta la forma globular, es de aproximadamente  $1,767 \mu\text{m}^3$  y su superficie de  $706,8 \mu\text{m}^2$  y considerando, también, que el volumen de un esferoide de  $300 \mu\text{m}$  de diámetro, que contiene teóricamente 8000 elementos formes, es de  $14,13 \times 10^6 \mu\text{m}^3$  y su superficie de  $282,7 \times 10^3 \mu\text{m}^2$  aproximadamente, se puede fácilmente deducir que la superficie celular total expuesta al medio extracelular es tan solo de un 5%. Este valor es claramente inferior al encontrado para los cultivos en monocapa, en donde la superficie en contacto con el medio extracelular alcanza al 50% del total.

Por otra parte, el empaquetamiento de los elementos formes en los distintos niveles del esferoide parece igualmente responsable de la extensión del espacio intercelular. Mediante técnicas basadas en el uso de inulina marcada, se ha podido conocer que, en los esferoides formados por las células tumorales mamarias de ratón EMT6 y los fibroblastos de pulmón de Hamster V79, el espacio extracelular supone el 61% y el 44% respectivamente, del volumen total del esferoide (FREYER, 1984), cifras significativamente superiores a los valores observados en tejidos sanos. Los cálculos, podrían, sin embargo, no ser exactos puesto que es posible que la inulina difunda a las áreas centrales del esferoide y se sobrevalore de esta manera el volumen extracelular (SUTHERLAND, 1984). No obstante, espacios extracelulares del 40-50% han sido

observados en tejidos tumorales "in vivo" (KOBOYASHI, 1971; APPELGREN, 1973; JAIN, 1987).

Una cierta aproximación a la cuantificación del espacio extracelular de los esferoides puede hacerse si se conoce el número de células por esferoide y el volumen correspondiente al tamaño celular medio. Teniendo en cuenta que el volumen medio de las células MCF-7 es de  $1,76 \cdot 10^3 \mu\text{m}^3$ , si todo el volumen de un esferoide de  $350 \mu\text{m}$  de diámetro, por ejemplo, estuviera ocupado por células de tamaño homogéneo el número de elementos formes sería de aproximadamente 12000 células por esferoide. No obstante, los esferoides MCF-7 de volumen igual a  $22,45 \cdot 10^6 \mu\text{m}^3$  ( $350 \mu\text{m}$  de diámetro) poseen, aproximadamente, 4.500 células. La discrepancia existente entre la previsión teórica y el contenido real de células de los esferoides, podría ser explicada por el desarrollo de necrosis en la región central de los esferoides de gran tamaño. Ahora bien, como el volumen ocupado por el área central necrótica en un esferoide de  $350 \mu\text{m}$  de diámetro es de  $65 \times 10^3 \mu\text{m}^3$ , volumen correspondiente a un espacio útil capaz de albergar tan solo a 40 elementos celulares, es evidente que la necrosis intraesferoidal tiene poco que ver con las citadas experiencias. Probablemente la razón última de la discordancia reside en la existencia, dentro de los esferoides de un importante espacio intercelular, cuya estimación indirecta parece superar el 50% del volumen total (Figura 34).

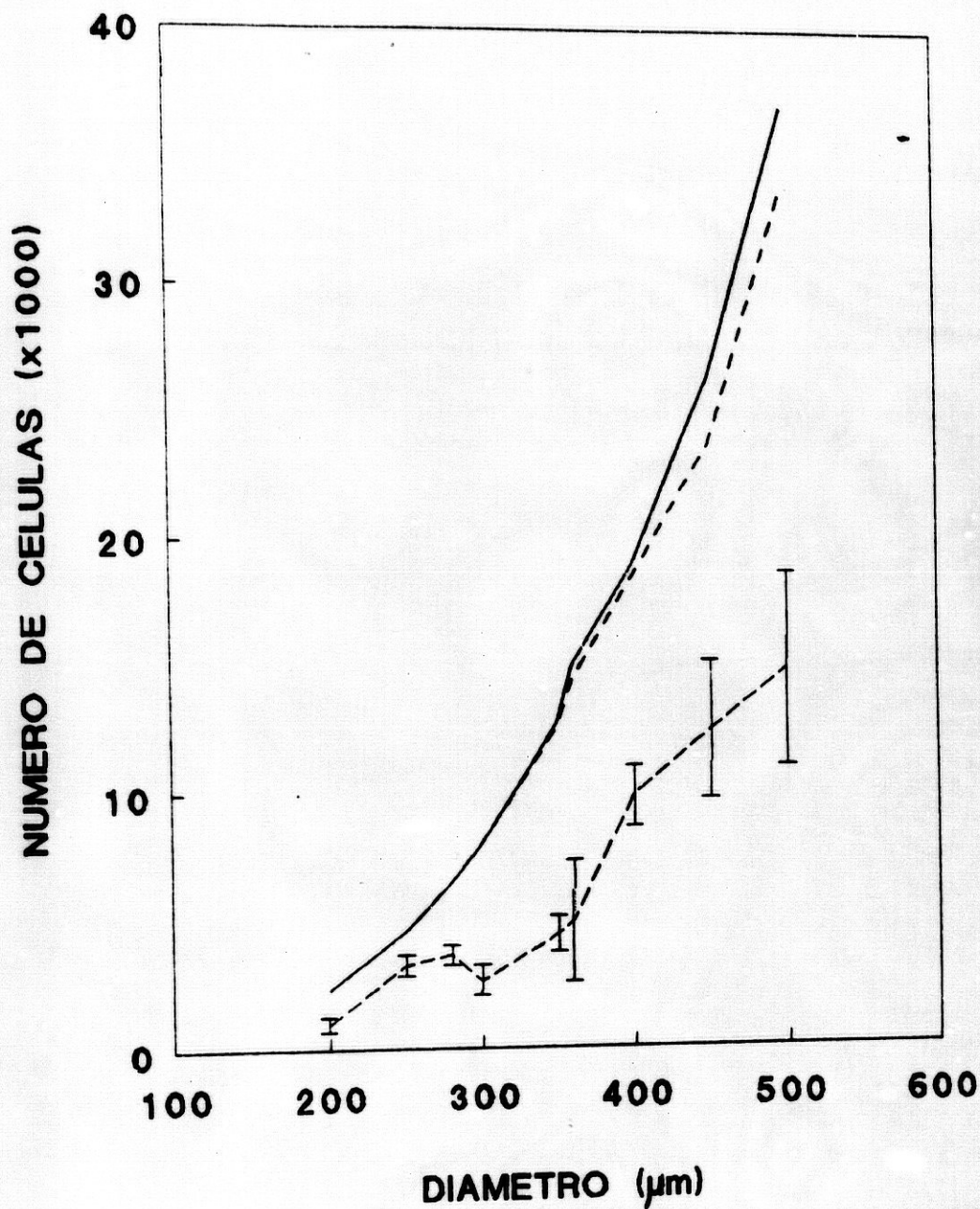


Figura 34. Relación entre el volumen de esferoides de diferente tamaño y el número de células que los integran. El volumen de los esferoides expresado en  $\mu\text{m}^3 \cdot 10^6$  se ha representado frente al número de células real (-----), evaluado mediante el conteo, el teórico (—), calculado mediante estimación del número máximo de elementos formes de tamaño uniforme que pueden ocupar una esfera de volumen igual al volumen del esferoide y el número de células derivado (-----) resultante de sustraer al volumen total del esferoide el espacio ocupado por la necrosis central.

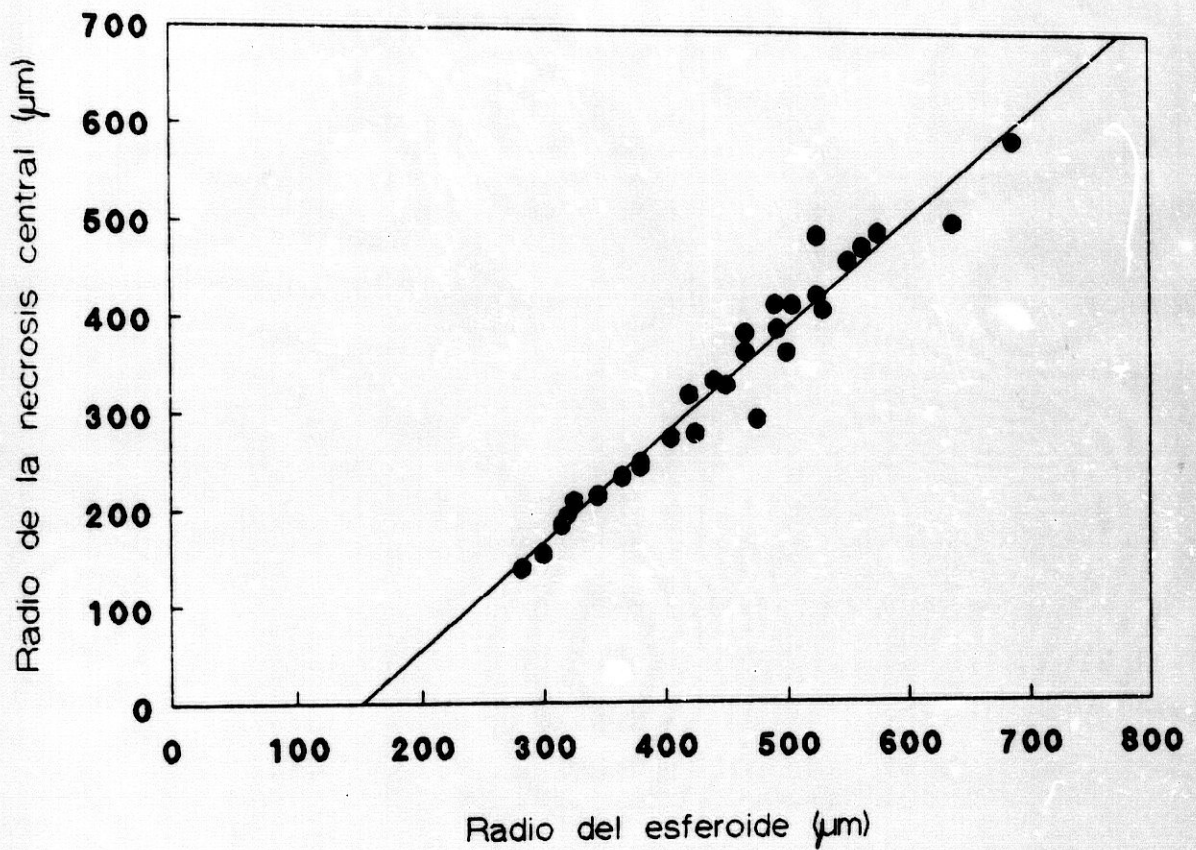


Si importante es la forma que las células adoptan con la transformación del agregado en esferoide, no lo es menos la posición que cada elemento va a ocupar dentro del MTS. El lugar -entendido groseramente como la profundidad en el espesor de la estructura del MTS que ocupa cada célula- determina su accesibilidad a los nutrientes del medio que le llegan por la vía de la difusión y condiciona, además, la disponibilidad de oxígeno y glucosa y la eliminación de residuos de desecho metabólico. Incluso, como ya se ha señalado, la posición celular dentro del esferoide influye sobre la aparición de características de diferenciación (ROSENSTRAUS, 1983; GROVER, 1983).

Durante las primeras fases del crecimiento del MTS, acabada la fase de agregado inicial, las células tienen un acceso directo al medio de cultivo. Más tarde, por el contrario, las capas más internas reciben menos nutrientes. Esta situación, que origina la aparición en las zonas más internas del esferoide, de una población celular anóxica, se hace ostensible a partir de determinado valor del diámetro del esferoide. En nuestra opinión, el momento de aparición de la necrosis esferoidal interna es función de: a) el tipo celular; b) la composición del medio de cultivo; c) las condiciones microambientales, entre las que se incluyen factores como la concentración de esferoides por volumen de medio de cultivo y la densidad de empaquetamiento celular.

Las células MCF-7 cuando se mantienen en las

condiciones basales de iniciación del cultivo, es decir en medio MEM suplementado con 10% de suero bovino fetal y recipientes con superficie no adherente, desarrollan MTS que a partir de un diámetro medio de 350  $\mu\text{m}$  comienzan a mostrar signos de necrosis en su región central y adoptan una particular estructura, consistente en un anillo de espesor variable de células viables que rodea a un centro necrótico. El estudio de la relación existente entre el radio del centro necrótico y el radio del esferoide nos ha permitido calcular las dimensiones del esferoide de menor tamaño compatibles con signos de necrosis central. La Figura 35 muestra, gráficamente, la relación lineal encontrada entre el radio del esferoide y el radio del área necrótica central, estimados ambos sobre cortes ecuatoriales de esferoides procesados histológicamente. La citada relación parece iniciarse para esferoides de  $\approx 320 \mu\text{m}$  de diámetro (abscisa en el origen = 165  $\mu\text{m}$ ), valor que concuerda con el previamente descrito para otras estirpes celulares (SUTHERLAND, 1988).



*Figura 35. Relación existente entre el tamaño de los esferoides MCF-7 y la dimensión estimada para el núcleo de necrosis central. Los radios de esferoides de diferente tamaño se representan frente a los correspondientes radios del área de necrosis. Abscisa en el origen= 165 µm. El ajuste de los puntos experimentales a una línea recta se traduce por el coeficiente  $r= 0.976$ .*

La presencia de necrosis central en los esferoides de cierto volumen tiene una base biológica consistente pues, como se ha apuntado anteriormente, en el poder de difusión del oxígeno a través del espacio extracelular así como las presiones parciales de este elemento a nivel de las células situadas a más de 100-150  $\mu\text{m}$  de la superficie del esferoide, demuestran que éste es el límite físico para la oxigenación (SUTHERLAND, 1973; MUELLER-KLIESER, 1982; VAUPEL, 1989). No obstante, se ha propuesto que la falta de oxígeno, por sí misma, no es determinante en la aparición de la necrosis central, siendo la combinación de una baja presión parcial de oxígeno junto con niveles de glucosa sensiblemente disminuidos, fruto de la existencia de un gradiente de difusión, la causa última de la aparición en las regiones más profundas del esferoide de fenómenos de muerte celular (CARLSSON, 1979; CASCIARI, 1988; HLATHY, 1988). También la concentración de hidrogeniones parece estar ligada a la aparición de la necrosis, puesto que los medios ácidos, consecuencia de la glucólisis aeróbica y anaeróbica (VAUPEL, 1989), juegan un importante papel en la concentración de oxígeno a nivel local. Los efectos de un bajo pH a nivel tisular han sido estudiados utilizando modelos "in vitro" e "in vivo" (WIKE-HOOLEY, 1984). Se ha puesto de manifiesto, así, que la acidez del medio parece ser causa de una franca inhibición de procesos celulares críticos, como son la proliferación celular, la síntesis de los ácidos nucleicos y la glucólisis, consecuencia de los cuales

sería la necrosis.

#### 4.6. HETEROGENEIDAD CELULAR DE LOS ESFEROIDES

El estudio histológico de muestras de biopsia de tumores mamarios ha puesto de manifiesto una gran heterogeneidad en las poblaciones celulares constituyentes de la neoformación (CHARPIN, 1986). La heterogeneidad en la composición clonogénica tumoral explica que, en ocasiones, los tumores expresen, aleatoriamente, gran variedad de antígenos típicos de células epiteliales. Así, es posible ver que algunos clones celulares muestran la presencia de antígenos tales como la caseína (BUSSOLATI, 1975; FORTT, 1979), lactoalbúmina (BAILEY, 1982; CLAYTON, 1982; WALKER, 1978), una proteína asociada a la enfermedad quística de la mama (MAZOUJIAN, 1983), el antígeno carcinoembrionario (WALKER, 1980; WURSTER, 1980), o la lactoferrina (WURSTER, 1980). Se trata en algunos casos de antígenos presumiblemente relacionados con el grado de diferenciación tumoral. En otros casos se trata de moléculas relacionadas con la matriz extracelular (LIOTTA, 1984). Estudios inmunohistoquímicos han servido para evidenciar que el patrón de heterogeneidad es también evidente en la presentación de los receptores específicos para los estrógenos (KING, 1985; PERTSCHUK, 1985; CHARPIN, 1986). Sin embargo, no ha sido suficientemente aclarado, en este caso, si la heterogeneidad celular tumoral refleja una expresión variable del fenotipo

receptor o si resulta una consecuencia del origen policlonal de las células tumorales.

Mediante el uso de un método inmunohistoquímico, basado en el empleo de un anticuerpo monoclonal específico (H222SPgamma) frente al receptor estrogénico aislado de las células MCF-7 y el sistema del complejo peroxidasa-antiperoxidasa, se ha podido estudiar la distribución del receptor estrogénico en las células MCF-7 en esferoides multicelulares, considerado un amplio rango de tamaños. Los hechos más sobresalientes de este estudio pueden ser resumidos de la siguiente manera:

a) Como patrón constante en la distribución intracelular del marcaje se ha observado la tinción casi exclusivamente localizada a nivel intranuclear. Este hallazgo coincide con el resultado obtenido con la utilización del mismo anticuerpo anti-ER sobre las células MCF-7 en monocapa y con un gran número de biopsias de cáncer de mama (KING, 1985; McCARTY, 1986; CHARPIN, 1986). El hecho de que el receptor estrogénico pueda ser una proteína nuclear, aun en ausencia de hormona, parece ser un fenómeno probado que no necesita más discusión (KING, 1984; WLSHONS, 1984).

b) Los esferoides de tamaño pequeño, inferior a 250  $\mu\text{m}$  de diámetro, presentaron un patrón común de distribución del receptor, observándose positividad de tinción, tanto en células situadas en profundidad como en estratos celulares superficiales.

c) En los esferoides de tamaño mayor, aquellos en los que histológicamente fue posible determinar el área de distribución de la necrosis interna, el patrón de distribución de la tinción estuvo preferentemente localizado en los estratos celulares más superficiales (espesores medios de 4-6 estratos celulares, correspondientes a unas 60-75  $\mu\text{m}$  de profundidad, mostraron una proporción variable de células receptor-estrogénico positivas).

d) En esferoides grandes y pequeños el patrón de intensidad de tinción fue claramente heterogéneo y así frente a células con núcleos muy marcados se observaron otras con una fijación del marcaje tenue, casi indistinguible del "fondo". Esta heterogeneidad, que no es achacable al origen celular, toda vez que, como ya se ha dicho, éste no es policlonal, debe ser atribuida a diferencias en la expresión del receptor motivadas por las condiciones microambientales en que se desarrolla cada célula o cada estrato celular.

El significado biológico de la heterogeneidad tumoral es tema de discusión (DEL MORAL, 1988) y como quiera que el patrón heterogéneo de distribución se encuentra tanto en células mamarias tumorales como en la mama normal, se ha sugerido que la expresión del receptor estrogénico puede encontrarse asociada con el estado funcional celular (JAKESZ, 1984). Se ha podido demostrar, en efecto, que el contenido en receptor estrogénico de las células MCF-7 no es constante, sino que depende del estado proliferativo celular, habiéndose

encontrado, mediante el uso de técnicas de enlace sobre células intactas para la cuantificación del receptor (OLEA, 1985), que en las fases G1 y G2 del ciclo divisorio es donde predominantemente ocurre la síntesis del RE (DEL MORAL, 1990), lo que ha conducido a la conclusión de que existe una relación inversa entre la concentración de estradiol en el medio y la cantidad de receptor cuantificado.

Algunas objeciones que pudieran ser hechas a las publicaciones referidas anteriormente (JAKESZ, 1984; MORAL, 1990) han sido, en parte, resueltas en el presente trabajo. Por una parte nos referimos a las manipulaciones que exige la obtención de una población celular parcialmente sincronizada en una fase específica del ciclo divisorio celular. Esta sincronización de los elementos celulares se consiguió en el primero de los trabajos mencionados mediante la exposición, durante 24 horas, de las células MCF-7 a concentraciones 2 mM del nucleótido timidina y, en el segundo caso, mediante el tratamiento de las células MCF-7 durante 72 horas, con hidroxitamoxifeno. Ambos procedimientos han utilizado medios suplementados con 5-10% de suero bovino fetal, durante el tiempo de sincronización. Por otra parte, la cuantificación del receptor estrogénico se ha realizado, en ambos casos, mediante una metodología muy semejante, basada en el empleo de un ensayo en el que las células intactas se incubaron con cantidades crecientes de estradiol marcado y competidor no marcado (TAYLOR, 1984; OLEA, 1985). Por tanto, lo que se ha



cuantificado en ambos casos es la medida de la capacidad de enlace y no la síntesis y degradación del receptor (fenómenos relacionados con la dinámica de esta molécula durante el ciclo divisorio celular). Por otra parte, en nuestro protocolo experimental se han seguido, metodológica y conceptualmente las siguientes pautas:

a) La expresión del receptor se ha medido mediante el uso de una técnica inmunohistoquímica en la cual un anticuerpo, altamente específico, reconoce "in situ" a la molécula del receptor estrogénico. Es decir, nuestra metodología no incluye un proceso de competencia de enlace estradiol-receptor que podría, en ciertos, casos conducir a una subestimación de la cantidad del receptor hormonal.

b) El análisis combinado de los resultados de incorporación de timidina tritiada y del marcaje de la expresión del receptor estrogénico han demostrado que los esferoides multicelulares MCF-7 presentan una acusada compartimentalización celular en cuanto a la distribución de las células en las fases del ciclo divisorio se refiere (se pueden definir, por tanto, áreas intraesferoide con sus células mayoritariamente concentradas en una u otra fase del ciclo mitótico).

c) Los esferoides MCF-7, a diferencia de las mismas células cultivadas en "monocapa" y sometidas a diversos agentes con objeto de lograr su sincronización en alguna fase del ciclo mitótico, no se han sometido a manipulación alguna que además

de modificar la cinética de proliferación pudiese alterar la expresión del fenotipo receptor. Esta manipulación se hace especialmente evidente en el caso de la sincronización mediante el tratamiento con tamoxifeno y su posterior rescate con estradiol, que si bien determinan unos porcentajes de sincronismo apreciables puede dar lugar a mecanismos de autorregulación que afecten a la concentración del receptor estrogénico (JAKESZ, 1984)

#### **4.7. PARAMETROS Y CARACTERISTICAS DEL CRECIMIENTO**

Mediante la medida diaria de los diámetros ortogonales de los esferoides MCF-7 mantenidos en condiciones basales de cultivo, hemos podido conocer las características del crecimiento de los mismos, que ajustan, en lo esencial, con las observaciones descritas para otros esferoides multicelulares (SUTHERLAND & McCREDI, 1971; YUHAS 1977; CONGER, 1983). Tras la formación de los agregados celulares iniciales, los esferoides crecen primero de forma exponencial, de manera semejante a como lo hacen las células en los cultivos en monocapa. A continuación, y una vez alcanzado cierto tamaño, el crecimiento se enlentece.

Las diferencias de comportamiento existentes entre distintas líneas celulares y la búsqueda de una explicación para el desigual tipo de crecimiento de los elementos de una misma estirpe celular cultivados en monocapa o en suspensión

esferoidal, hacen interesante el estudio de la cinética de crecimiento y la distribución en el ciclo celular de los elementos formes que componen los esferoides MCF-7. La incorporación de  $^3\text{H}$ -timidina seguida del análisis autorradiográfico parecen constituir, en principio, un buen método para conocer el porcentaje de células en la fase S del ciclo celular, su distribución en cada uno de los estratos celulares definidos en el MTS, la profundidad máxima, entendida como distancia a la superficie exterior del esferoide, en la cual se observan células mitóticamente activas y el espesor del estrato celular con actividad de síntesis del DNA, parámetro cuya estimación permite conocer hasta qué "profundidad" en la corteza del esferoide existen células con actividad mitótica, y por tanto, deducir la fracción de células del MTS que participan activamente en el crecimiento del esferoide.

Pues bien, utilizando ambos procedimientos en los esferoides MCF-7, hemos podido determinar que:

a) los esferoides de tamaño pequeño, con un diámetro inferior a 200  $\mu\text{m}$  presentan, en cambio, una uniformidad de distribución de las células marcadas a lo largo de todo su espesor, de tal manera que aproximadamente un 50% de sus elementos formes incorporan la timidina tritiada.

b) en esferoides de tamaño intermedio, por ejemplo 400  $\mu\text{m}$  de diámetro, el porcentaje de células que incorporan el precursor del DNA es decreciente cuando se progresa en el

espesor del esferoide, encontrándose valores próximos al 50% en el estrato de superficie y de sólo un 25% en el quinto estrato. En tales esferoides la incorporación de timidina demuestra que sólo los 8 estratos más externos son responsables del crecimiento del esferoide, mientras que las capas celulares más internas (5 estratos aproximadamente) no presentan actividad proliferativa.

c) el patrón de distribución de células en fase S, encontrado en esferoides de mayor tamaño ha resultado llamativo pues si bien en los cortes histológicos las células viables se disponen en forma de anillo homogéneo en torno a un centro necrótico, la autorradiografía pone en evidencia que existe un doble gradiente de distribución de la actividad de síntesis del DNA desde el exterior del esferoide a los estratos celulares más internos. La explicación a este fenómeno, de frecuente observación en los esferoides MCF-7 y rara vez descrito en la literatura, parece venir dada por las especiales características de la necrosis central. Al retraerse ésta y despegarse de las capas celulares más internas, se facilita el acceso directo de estas células al medio interno del esferoide que, posiblemente por difusión o por la presencia de soluciones de continuidad en el anillo, se encuentra en contacto con el medio de cultivo. El aporte nutritivo consiguiente determina la recuperación de las células que previamente pudieran estar en estado de hipoxia y carencia nutritiva, y la adquisición por las mismas de una actividad mitótica comparable a las células

correspondientes a los estratos más externos del esferoide.

En el protocolo experimental utilizado para el marcaje de las células con actividad mitótica, las células quedaron expuestas al precursor marcado durante 24 horas, un tiempo superior a la diferencia existente entre el tiempo de ciclo divisorio ( $T_C$ ) y el tiempo de duración de la fase de síntesis del DNA ( $T_S$ ):  $t_{\text{exposición}} > T_C - T_S$ . Ello nos ha permitido evaluar la cantidad absoluta de células del esferoide dotadas de capacidad divisoria. La citada metodología, además de permitir que todas las células en ciclo divisorio "pasen" por la fase S durante el tiempo de incubación con el precursor, minimiza la contribución de las células hijas marcadas no proliferantes a la fracción de crecimiento (BAUER, 1982; SWEIGERT, 1986). Ha sido posible, así, determinar con fiabilidad la fracción de crecimiento del esferoide y confirmar las observaciones previamente descritas tanto para tumores "in vivo" (MAYNEORD, 1932) como para otros esferoides multicelulares (DURAND, 1976; YUHAS & LI, 1978; CONGER, 1983; SWEIGERT, 1986). En efecto, para esferoides de diámetro inferior a 200  $\mu\text{m}$ , el citado parámetro ha ofrecido un valor próximo al 50% de la población celular, mientras que el incremento del diámetro de los esferoides hasta las 900  $\mu\text{m}$  hace caer la fracción de crecimiento al 30% (Figura 37). Parece claro, en consecuencia, que los esferoides multicelulares presentan un fracción de crecimiento decreciente con el volumen, siendo el espesor del anillo de células viables el

parámetro que mantiene la uniformidad a lo largo de la vida biológica del esferoide.

El hecho de que cuando el tamaño de la masa tumoral aumenta se observe una concomitante disminución de la fracción celular en crecimiento, fenómeno que puede comprobarse matemáticamente (CONGER, 1983), queda confirmado, a nuestro juicio, si se presta atención a las siguientes observaciones experimentales:

1) hemos descrito con anterioridad que durante el crecimiento de los esferoides MCF-7, debido a que el aporte nutritivo y la oxigenación superficial se mantienen constantes, aparece dentro de la arquitectura interna del esferoide un anillo de células viables externamente situadas que mantiene un espesor constante durante toda la vida del esferoide. Para los esferoides MCF-7 este espesor es de aproximadamente 160  $\mu\text{m}$  de profundidad máxima, dato compatible con el rango 35-206  $\mu\text{m}$  descrito para otros muchos esferoides de diferente origen (KOCH, 1975; YUHAS & LI, 1978; CONGER, 1983). Pues bien, la idea de que el espesor de este anillo viable se mantiene constante no sólo va en contra de la presunción de una fracción de crecimiento invariable para la población celular, sino que apoya, además, el resultado experimental obtenido con la incorporación de timidina en el sentido de que la fracción de crecimiento estimada "cae" con el aumento de volumen del esferoide.

2) Si la fracción de crecimiento de los esferoides fuese inalterable el incremento del diámetro de los mismos no sería lineal como de hecho ocurre durante su desarrollo, sino que se aproximaría más a un proceso de orden exponencial (CONGER, 1983; SWEIGERT, 1986). La Figura 36, resultante de nuestras experiencias, pone de manifiesto, efectivamente, que la representación gráfica de los radios o diámetros relativos de los esferoides, (entendidos como el cociente entre el diámetro a un tiempo dado y el diámetro inicial) en función del tiempo de observación, se traduce por una distribución de puntos que ajustan a una línea recta.

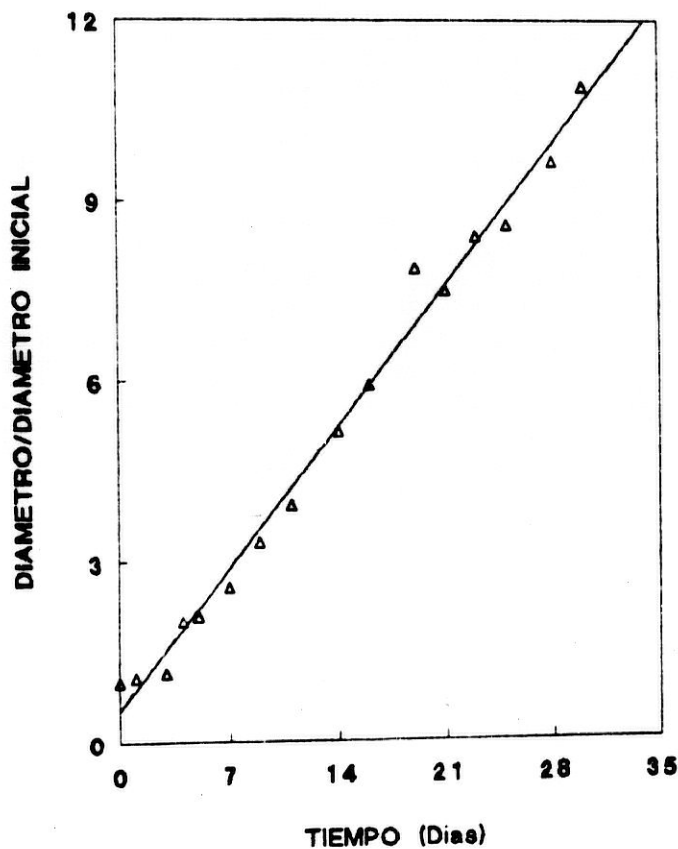


Figura 36. Incremento del diámetro relativo de los esferoides MCF-7 en función del tiempo de seguimiento. El diámetro relativo resultante de dividir, para cada medida experimental, el diámetro estimado entre el diámetro inicial se ha representado frente al tiempo, medido en días. El ajuste de los puntos experimentales a una línea recta se traduce por el coeficiente  $r = 0.994$ .



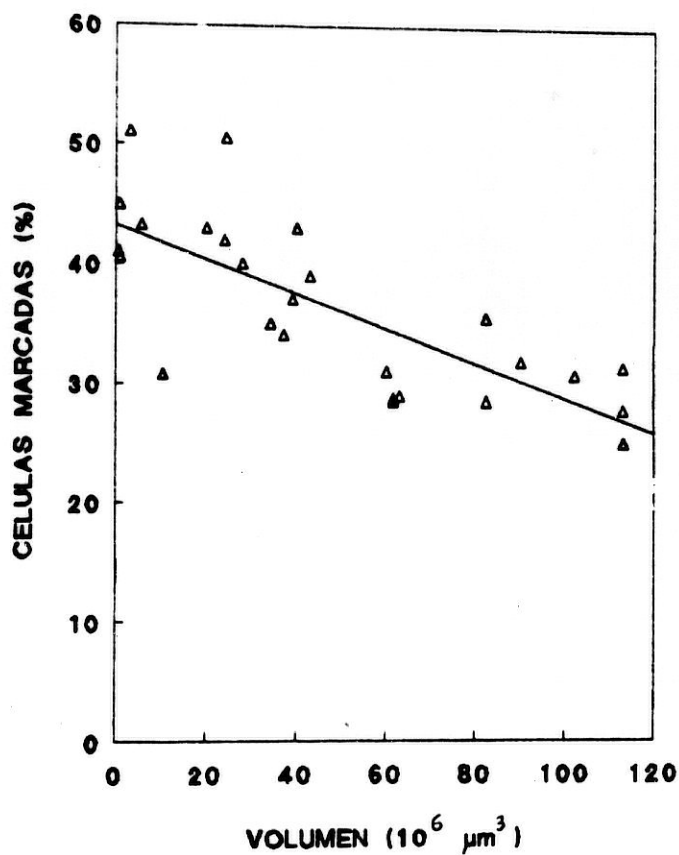


Figura 37. Relación existente entre el tamaño de los esferoides y la fracción de crecimiento (GF) estimada mediante el uso de técnicas de incorporación de timidina tritiada. Un grupo de esferoides MCF-7 de tamaño variable se sometieron a la estimación del porcentaje de células con actividad proliferativa mediante autorradiografía tras la incorporación de  $^3\text{HTdR}$ . El coeficiente de ajuste de los puntos experimentales a una línea recta ha ofrecido el valor  $r = 0.755$ .

Analizando conjuntamente, por otra parte, el tamaño relativo del centro necrótico del esferoide (mediante la comparación del cociente radio del esferoide/radio del área necrótica, por ejemplo) con el nivel de incorporación de timidina a los componentes del anillo de células viables, se puede demostrar que la profundidad máxima a la que se detecta actividad mitótica es sensiblemente inferior a la profundidad a la que se evidencian signos histológicos de muerte celular. El valor de esta observación es crucial, pues confirma la existencia en los esferoides de estratos celulares sin actividad proliferativa, pero sin signos de muerte celular, compuestos por células en estado quiescente, posiblemente en estadios  $G_0/G_1$  del ciclo divisorio (BAUER, 1982; ALLISON, 1983; SWEIGERT, 1986). En la génesis de este fenómeno se encuentran probablemente, como ya se ha descrito, la hipoxia, la hipoglucemia, la caída del pH y el acúmulo de productos tóxicos (SUTHERLAND & McCREDIE, 1971; DURAND & SUTHERLAND 1973; SUTHERLAND & DURAND, 1973; HAJI-KARIM 1978).

Mediante el empleo de la citometría de flujo se ha estudiado, por diferentes autores (ALLISON, 1983; FREYER 1986; SWEIGERT, 1986), la distribución en el ciclo celular de los elementos formes constitutivos de cada uno de los estratos celulares del esferoide. La comparación de la información obtenida con los datos procedentes de la incorporación de timidina tritiada en esferoides formados por líneas celulares de tumores mamarios murinos MCa-11 y EMT6/Ro y de tumor

cerebral de rata 9L, ha servido de gran ayuda para entender la compleja estructuración interna de los esferoides tumorales mamarios formados por la línea MCF-7. Así : a) la mayoría de las células que no incorporan timidina tritiada, se han encontrado localizadas en estadios  $G_0/G_1$  del ciclo divisorio; b) aproximadamente un 10% de las células localizadas en profundidad en el esferoide, a pesar de no incorporar timidina tritiada, se han considerado situadas en la fase S del ciclo divisorio, resultado paradójico que no puede ser atribuido a problemas de difusión del precursor (NEDERMAN, 1981) ni parece deberse a la síntesis de ácidos nucleicos por vías diferentes a la de incorporación de la timidina exógena (MOLLER, 1982; JOHNSON, 1980), sino que parece, mas bien, estar relacionado con la existencia de células hipóxicas y en estado de carencia nutritiva, "paradas" en las fases S o  $G_2$  del ciclo celular y previamente descritas como células  $S_0$  (DARZYNKIEWICZ, 1979).

#### 4.8. LIMITACIONES DE LA TECNICA AUTORADIOGRAFICA. INCORPORACION DE $^{125}I$ dUrd.

Las técnicas de incorporación de  $^3H$ -timidina utilizadas para la valoración de los parámetros de crecimiento y cinética celular adolecen de determinados defectos que deben ser cuidadosamente analizados. En nuestro trabajo hemos utilizado un protocolo experimental semejante al publicado por otros autores (MENDELSON, 1962; BAUER, 1982; ALLISON, 1983;

SUTHERLAND, 1984; SWEIGERT, 1986) y se ha ampliado la experiencia acumulada en los ensayos de incorporación de precursores de la síntesis de DNA en monocapa (VILLALOBOS, 1987; OLEA, 1987). En las experiencias realizadas, tanto la concentración como la actividad específica del precursor utilizado estuvieron situadas dentro de límites "tolerables" para las células, de tal manera que durante el período de 24-30 horas de marcaje, la población celular pudo mantener su ritmo de crecimiento de forma ininterrumpida. La sobrevaloración del espesor real de células proliferativas del esferoide y, por tanto, un cálculo erróneo de la proporción real de células con actividad mitótica y la profundidad máxima a que éstas pueden situarse son, por ello realmente posibles. Recordemos que durante las 24 horas que dura la incorporación de timidina tritiada, en un esferoide de, por ejemplo, 400  $\mu\text{m}$  se produce un incremento del diámetro de hasta 40  $\mu\text{m}$ , que corresponde a unos 2-3 estratos de nuevas células. Es evidente, por tanto, que en la valoración de la profundidad máxima de células en fase S del ciclo divisorio opera un error imputable al propio crecimiento del esferoide.

Con objeto de subsanar este problema se han descrito técnicas basadas en el uso de venenos mitóticos o incluso en el empleo de  $^3\text{H}$ -timidina a altas concentraciones, que darían lugar, en ambos casos, a una intoxicación celular que impide que los elementos componentes de la población progresen en el ciclo divisorio una vez "marcados" (YUHAS & LI, 1978). Como

alternativa válida, en el presente trabajo se ha recurrido al uso de la  $^{125}\text{I}$ -desoxiuridina ( $^{125}\text{IdUrd}$ ), una sustancia que a concentraciones de  $1 \mu\text{Ci/ml}$  es capaz de frenar el crecimiento de los esferoides MCF-7, presentando un nivel de toxicidad casi veinte veces superior al descrito para la timidina (YUHAS & LI, 1978).

Trabajos previos de Yuhas y Li (YUHAS & LI, 1978), han analizado en profundidad la cinética de incorporación de  $^{125}\text{IdUrd}$  en diversas líneas celulares. Los resultados obtenidos con las células MCF-7 no son esencialmente diferentes, pudiéndose resumir de la forma siguiente: 1) La incorporación de  $^{125}\text{IdUrd}$ , en función del tiempo de exposición, a esferoides MCF-7, se incrementa hasta alcanzar un máximo que se sitúa en torno a las 30 horas, manteniéndose en estos valores durante, al menos, las 30 horas siguientes; 2) la velocidad de incorporación del precursor parece dependiente del número de células en el ciclo divisorio, su distribución en las diferentes fases del ciclo y la progresión hacia la síntesis de DNA; 3) la existencia de un "plateau" en la curva de incorporación indica que las células con capacidad divisoria quedan retenidas en un punto específico del ciclo divisorio.

Comoquiera, por otra parte, que entre el nivel de incorporación de uridina y el diámetro del esferoide existe una determinada relación matemática, es posible realizar una estimación real del espesor de células en división. Así, en condiciones "basales" los esferoides MCF-7 presentan un espesor

de células en división de aproximadamente 50-60  $\mu\text{m}$ . Valores de espesor de la capa de células con actividad proliferativa comprendidos entre 18 y 206  $\mu\text{m}$  se han descrito para otras líneas celulares (YUHAS & LI, 1978; CONGER, 1983).

Debe quedar claro, en consecuencia, que el valor de la fracción de crecimiento de los esferoides, cuando la metodología empleada para su determinación se basa en la utilización de diferentes marcadores de la síntesis de los ácidos nucleicos, es discordante siendo la técnica autorradiográfica especialmente útil para definir la localización y el gradiente de elementos formes con actividad proliferativa y la incorporación de uridina mucho más precisa para estimar la fracción de crecimiento de la población celular (Figura 38 y 39) (Es interesante hacer notar, a este respecto, la coincidencia existente entre el número de estratos de células con actividad proliferativa, valorado mediante la incorporación de  $^{125}\text{IUr}$ d, y el espesor de células que expresan el fenotipo receptor estrogénico positivo. En ambos casos se obtienen valores de alrededor de 60  $\mu\text{m}$ , cifra que concuerda con un número aproximado de 4-5 capas celulares).

Puede afirmarse, por último, que el conjunto de células con capacidad proliferativa, responsable del crecimiento del esferoide, incluye elementos formes en todas las fases del ciclo celular. Es decir, que no sólo forman parte de la citada fracción celular elementos pertenecientes a las

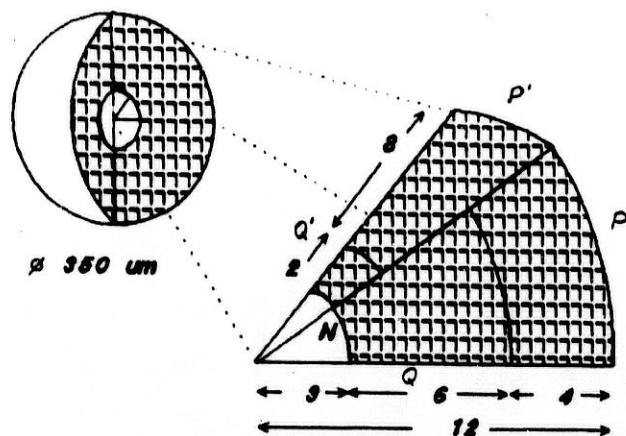


Figura 38. Comparación de la estimación del espesor del anillo de células proliferativas y células quiescentes mediante dos técnicas diferentes. La metodología basada en el empleo de la uridina yodada y la timidina tritiada permite atribuir un espesor determinado para las capas Proliferativa (P y P') y Quiescente (Q y Q'), respectivamente. N representa el núcleo del esferoide ocupado por el centro necrótico. Se expresa el valor del espesor de cada una de las regiones intraesferoide en función del número de estrados celulares que las forman.

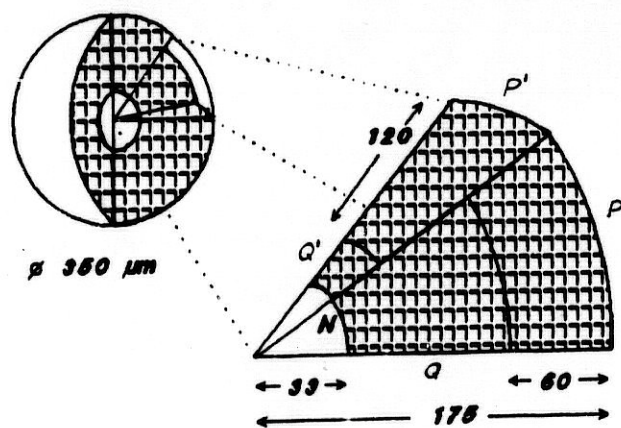


Figura 39. Comparación de la estimación del espesor del anillo de células proliferativas y células quiescentes mediante dos técnicas diferentes. La metodología basada en el empleo de la uridina yodada y la timidina tritiada permite atribuir un espesor determinado para las capas Proliferativa (P y P') y Quiescente (Q y Q'), respectivamente. N representa el núcleo del esferoide ocupado por el centro necrótico. Se expresa el valor del espesor de cada una de las regiones intraesferoide en  $\mu\text{m}$ .

fases activas del ciclo divisorio, sino que en este grupo celular existen elementos que, encontrándose en fase  $G_0$ , pueden progresar en el ciclo divisorio, si los estímulos o inhibiciones ambientales son los adecuados (FREYER, 1980; ALLISON, 1983). No es éste el caso de los elementos formes que se sitúan a más de 75  $\mu\text{m}$  de profundidad en el espesor del esferoide. Tales células, que se distribuyen aleatoriamente por diferentes fases del ciclo mitótico (DURAND, 1973; SUTHERLAND & DURAND, 1973, 1976; FREYER, 1980) suelen encontrarse en situación de hipoxia y con una acentuada carencia nutritiva. Muchas de ellas se encuentran en  $G_1$  y otras "atracadas" en fases S ó  $G_2$  (FREYER, 1980; ALLISON, 1983), pero en su conjunto inhibidas en el crecimiento por la falta de precursores necesarios para la síntesis proteica. Las técnicas de incorporación de timidina tritiada, rara vez ponen de manifiesto la actividad de síntesis de estos grupos celulares, siendo necesario para su análisis recurrir a técnicas más complejas, como la citometría de flujo (FREYER, 1980; ALLISON, 1983).

#### **4.9. MODELOS MATEMATICOS DE CRECIMIENTO**

La disponibilidad de datos objetivos referentes a la historia natural del crecimiento neoplásico en el hombre se encuentra limitada al campo de las lesiones clínicas. En la fase de crecimiento tumoral subclínico, los estudios realizados



han consistido, en su mayor parte, en aproximaciones desprovistas de significación real.

Los primeros trabajos publicados sobre la cinética del crecimiento de los tumores humanos datan de 1956 (COLLINS, 1956). Utilizando el método radiográfico, Collins, Loeffler y Tivey, analizaron el crecimiento de las metástasis pulmonares de tumores diversos, tratando de encontrar una relación matemática que les permitiese comprender las características del crecimiento tumoral, analizar los conceptos derivados y explicar su significación clínica. Tales estudios se encuentran, muy probablemente, en la base del interés creciente por los estudios de biología tumoral y más específicamente por la búsqueda de modelos matemáticos predictivos del crecimiento neoplásico.

En pocas palabras, un modelo matemático de crecimiento tumoral no es más que una expresión matemática que describe las variaciones del tamaño de un tumor respecto al tiempo. Según Vaidya (VAIDYA, 1982), los criterios que debe satisfacer un modelo matemático ideal son los siguientes: a) el modelo debe poseer base fisiológica; b) debe contener un número mínimo de constantes arbitrarias; c) las variables descritas en el modelo han de ser susceptibles de cuantificación de tal manera que sea posible la obtención de un número mínimo de datos experimentales; d) debe proporcionar un buen ajuste de los datos experimentales; e) debe ser capaz de predecir el crecimiento tumoral con relativa exactitud; f) debe mejorar

nuestro conocimiento del crecimiento tumoral tanto a nivel macro como microscópico; g) debe poder utilizarse para todo tipo de tumores. Hasta el momento presente los modelos matemáticos utilizados para el estudio del comportamiento proliferativo de poblaciones celulares tumorales han sido los siguientes: 1) modelo de crecimiento exponencial; 2) modelo Gompertziano; 3) ecuación de Bertalanffy y 4) ecuación de Verhulst-Pearl o modelo logístico, cada uno de los cuales viene definido por una ecuación matemática de mayor o menor complejidad, que incluye un número variable de constantes.

Aplicando los citados modelos a los datos experimentales obtenidos mediante la observación y medida del crecimiento de los esferoides MCF-7, y efectuada una estimación de los parámetros que intervienen en cada ecuación, hemos analizado su significación relativa y definido aquellos que pueden ser útiles en la objetivación del crecimiento tumoral, evaluando, además, la calidad del ajuste matemático posible en cada caso y la virtualidad de los diferentes modelos en la predicción del crecimiento de los agregados multicelulares. Hemos observado, en este sentido, que cuando el crecimiento de los esferoides MCF-7 se intenta explicar mediante las previsiones del modelo exponencial creciente simple, sólo las medidas experimentales correspondientes a los primeros días de evolución del esferoide ajustan con dicho modelo.

Modelo exponencial.- El modelo exponencial asume que el volumen de un tumor, o el número de sus elementos formes

constituyentes, es proporcional en cada momento al volumen o número de células existentes inicialmente, al tiempo y a la constante de crecimiento. Este modelo es especialmente interesante porque introduce el concepto de "tiempo de duplicación" (TD) y si bien no tiene una fuerte base fisiológica, posee pocas constantes arbitrarias. Cuando se aplica al estudio del crecimiento de líneas celulares establecidas "in vitro", en condiciones de cultivo y mantenimiento ideales, el modelo exponencial predice, con gran exactitud, la cinética de proliferación (SOTO,1985; VILLALOBOS,1988) y, así, el parámetro tiempo de duplicación, obtenido del análisis de los datos experimentales, resulta en un valor aproximado de 40 horas cuando los cultivos se realizan en medio MEM suplementado con 10% de suero fetal bovino, inactivado térmicamente, pero no desprovisto de esteroides endógenos (no tratado con DCC). En nuestra experiencia, la reproductibilidad de este parámetro, cuando las condiciones de cultivo se mantienen inalterables, es absoluta. Por esta razón, el modelo exponencial de crecimiento tumoral nos parece de gran utilidad para predecir en cada momento el comportamiento proliferativo de la población celular MCF-7 y detectar las desviaciones respecto a la normalidad, especialmente si se introducen variaciones en la composición de los medios de cultivo o en el suplemento hormonal o se ensayan maniobras terapéuticas diversas (drogas, radiación ionizante).

La fiabilidad del modelo exponencial en la

predicción del crecimiento de poblaciones celulares "in vitro" ha conducido a la aplicación de este modelo matemático al crecimiento tumoral "in vivo" y, aunque algunos autores han encontrado una buena correlación entre el crecimiento de las metástasis pulmonares y el modelo exponencial (SCHWARTZ, 1961), el modelo sólo se ha encontrado útil para analizar el crecimiento de poblaciones tumorales con características peculiares. Efectivamente, cuando el modelo de crecimiento tumoral exponencial se aplicó por Skipper y cols (SKIPPER, 1982) a los estudios de cinética de poblaciones celulares experimentales (la leucemia de ratón) y tumores humanos, demostró una gran utilidad tanto en la predicción del tamaño tumoral y el patrón de crecimiento, como en el estudio de la respuesta tumoral a diferentes agentes quimioterápicos (SKIPPER, 1979; 1987). Por otra parte, con relativa frecuencia se han presentado en la literatura datos que demuestran las posibilidades del modelo exponencial en el seguimiento de poblaciones con capacidad de adaptación al medio y a maniobras terapéuticas distintas en virtud de procesos de mutación (GOLDIE, 1979, LURIA, 1943, LAW 1952).

En términos generales, el modelo de crecimiento exponencial puede considerarse apropiado para la interpretación de datos experimentales cuando la duración del intervalo de observación de la vida biológica del tumor considerado es breve, esto es, si la observación experimental se circunscribe a un corto período de tiempo, los datos experimentales

derivados de la misma pueden ajustarse con exactitud a la ecuación que define el modelo exponencial. En cambio, un período de observación prolongado trae como consecuencia una paulatina falta de precisión en el ajuste matemático. El modelo exponencial no posee, por lo tanto, un ámbito de aplicación universal dado que el crecimiento de muchas poblaciones normales y tumorales se distingue por el carácter variable de su tiempo de duplicación, en el sentido de que es de frecuente observación el hecho de que el valor de TD crece cuando se incrementa el volumen de la población celular.

Aunque parcialmente limitado en sus aplicaciones, las bases teóricas del modelo exponencial han abierto la puerta a lo que se ha dado en llamar la aproximación matemática al crecimiento tumoral. Parámetros como el mencionado "tiempo de duplicación" del volumen tumoral, el período silente de crecimiento y otros, de indudable valor clínico se han introducido en la oncología como consecuencia de la aplicación de este modelo. Schwartz (SCHWARTZ, 1961), defensor del mismo, ha definido con claridad los objetivos de los análisis combinados clínico/matemáticos e indicado que el fin último de su aplicación es el conocimiento de las características que rigen el crecimiento de los tumores y la predicción de su evolución biológica.

Modelo Gompertziano.- Las curvas de crecimiento generadas por los esferoides MCF-7 (Figura 31) son desde un punto de vista cualitativo muy similares a las observadas en el

curso de la evolución de muchos tumores experimentales. Tales curvas predicen un proceso de crecimiento de cinética compleja en el que tras un crecimiento inicial de tipo exponencial, con un TD constante, ocurre un paulatino "retraso" en el crecimiento de la población celular que trae consigo un incremento proporcional del tiempo de duplicación estimado (CONGER, 1983). El crecimiento tumoral, considerado desde esta óptica, puede definirse como un proceso de proliferación exponencial de las células tumorales cuyo tiempo de duplicación sufre sucesivos incrementos que ajustan, asimismo, con una ecuación exponencial (NORTON, 1988). En estas condiciones, la representación gráfica del tamaño tumoral en función del tiempo de observación da lugar a una curva de forma sigmoidal que dibuja un "plateau" característico cuando el tamaño del tumor alcanza determinados valores (Figura 31).

La expresión matemática inicialmente enunciada por Gompertz para el análisis actuarial (GOMPERTZ, 1825) se considera, hoy, la que mejor define los parámetros de la curva de crecimiento sigmoidal. El origen de la ecuación de Gompertz no ha sido suficientemente aclarado aunque ha sido descrita su posible derivación a partir de las leyes de la termodinámica (SWAN, 1977, SWAN & VINCENT 1977). En principio, fue desarrollada para estudios de mortalidad y posteriormente aplicada, con mayor o menor éxito, al análisis del crecimiento tumoral "in vivo" tanto en sistemas no humanos (CASEY, 1934, LAIRD, 1964, 1965, McCREDIE, 1965 y SIMPSON-HERREN, 1970) como

en el hombre (SULLIVAN, 1972; NORTON & SIMON, 1977, 1986; DEMICHELI 1980; NORTON, 1988).

Clásicamente, se considera que la predicción del crecimiento tumoral se realiza con la mayor exactitud cuando el tiempo de observación experimental es amplio, quizás porque para un mejor ajuste matemático es necesario considerar la fase última del crecimiento, representada en la ecuación gompertziana por el "plateau" final (VAIDYA, 1982). Es interesante hacer notar, a este respecto, que el retraso en el crecimiento tumoral, indicado por la progresiva disminución del índice proliferativo, no es consecuencia del sustrato en el que se desarrolla el tumor, sino que es una característica imputable al tumor en sí mismo (LAIRD, 1964). Es decir, no existe prueba alguna, una vez más, para considerar que la carencia nutritiva tenga efecto sobre los mecanismos de control de la proliferación celular (SONNENSCHNEIN, 1987). En poblaciones bacterianas el ritmo de crecimiento se ve dramáticamente interrumpido si se produce una disminución significativa del aporte nutritivo. Ello hace que el crecimiento venga impuesto, necesariamente, por la concentración de elementos nutritivos y el propio consumo de nutrientes por las bacterias. Por el contrario, en el crecimiento de poblaciones tumorales definido por el modelo gompertziano, la disminución creciente del índice de proliferación celular no parece ligada a la limitación impuesta por la elección de nutrientes o la falta de factores de

crecimiento en el medioambiente tumoral. El mecanismo que subyace a la progresiva disminución del índice proliferativo de la población tumoral que predice el modelo gompertziano consiste, muy probablemente, en la muerte, pérdida celular o el pase de elementos formes a compartimentos no proliferativos del esferoide y este proceso debe desarrollarse de manera tal que su magnitud se incrementa de manera exponencial durante el proceso de crecimiento tumoral (LAIRD, 1964).

El crecimiento de los esferoides MCF-7 mantenidos en medio de cultivo suplementado con 10% de suero fetal bovino, presenta, en nuestra experiencia, unos parámetros de diámetro, volumen y número de componentes, cuya evolución en el tiempo ajusta estrechamente con lo previsto por la ecuación gompertziana. En condiciones basales de cultivo, sin manipulaciones hormonales o físicas que perturben la cinética de crecimiento de la población de células MCF-7, la medida del diámetro de los esferoides y el cálculo de su volumen en diferentes instantes de tiempo, se ha efectuado tanto para esferoides mantenidos individualmente como conjuntamente cultivados. En ambos casos, fue posible el ajuste a la ecuación gompertziana, obteniéndose los valores para las constantes A y  $a$  (media geométrica de un grupo de esferoides elegidos al azar) que se reflejan en las Tabla 30 y 31. Una revisión de la literatura en la que se presentan datos de ajuste matemático de diferentes tumores al modelo Gompertziano permite comprobar que las dimensiones estimadas, por nosotros, para ambas constantes



sitúan en una posición intermedia (LAIRD 1964; DEMICHELI 1989). La Figura 40 es una representación gráfica de los parámetros de crecimiento del Volumen frente al tiempo (ajustados a la ecuación de Gompertz) una vez que las constantes de dicha ecuación se sustituyen por los valores estimados considerado el crecimiento de 80 esferoides mantenidos individualmente. La ecuación resultante tiene la forma siguiente:

$$V = V_0 \cdot e^{[(0,368 \pm 0,067 / 0,065 \pm 0,0131)(1 - e^{-0,0651 \pm 0,0131at})]}$$

El excelente grado de adecuación de los parámetros de crecimiento de los esferoides MCF-7 a la ecuación de Gompertz observado en nuestros experimentos nos autoriza a afirmar la validez de ésta en los análisis de la cinética de proliferación de agregados multicelulares. De esta manera, la aplicación generalizada de la ecuación de Gompertz permite: i) estimar el volumen máximo que podrán alcanzar los esferoides MCF-7 en el medio de cultivo basal, máximo que se sitúa en torno a los 4 mm<sup>3</sup>, un volumen 2.10<sup>6</sup> veces superior al volumen de un elemento celular aislado; ii) conocer el número de duplicaciones que sufre la población inicial para alcanzar el volumen máximo estimado, que se sitúa alrededor de 9-11 duplicaciones; iii) calcular el tiempo de duplicación (TD), para diferentes volúmenes, de los esferoides MCF-7.

La Tabla 38 recoge los datos numéricos correspondientes a la Figura 41, en la que se representan los

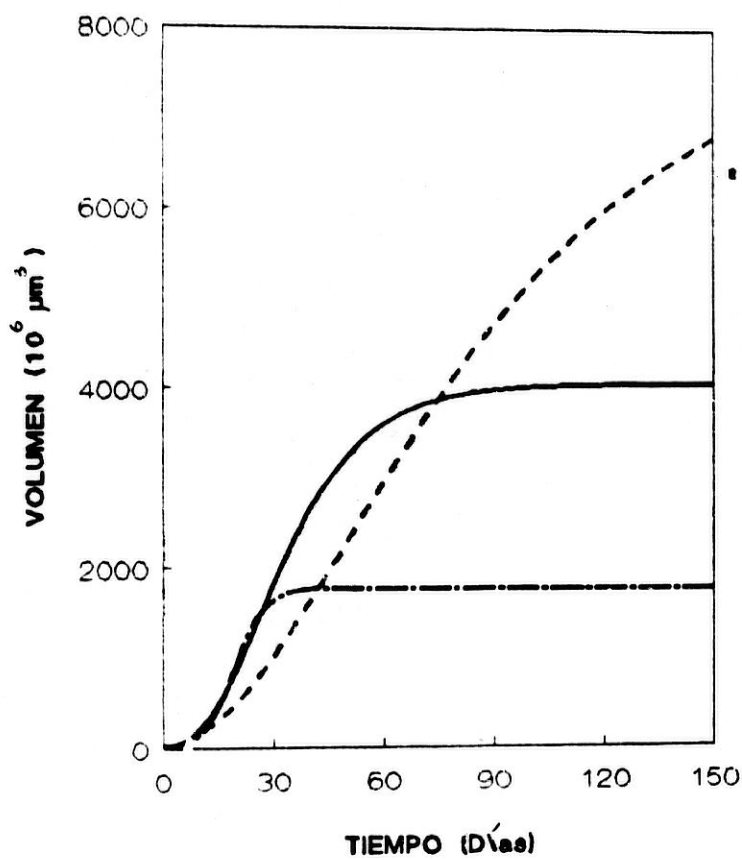


Figura 40. Ajuste de los puntos experimentales de crecimiento de los esferoides MCF-7 mantenidos individualmente en medio MEM+10% FBS a las Ecuaciones de los modelos de Gompertz (—), Verhulst-Pearl (- - -) y Bertalanffy (- · - ·). El coeficiente de correlación del ajuste matemático ha sido de  $r_G=0.890-0.989$ ,  $r_{VP}=0.318-0.962$  y  $r_B=0.940-0.998$ , respectivamente, para cada uno de los modelos anteriores.

TD de esferoides de diferente volumen. Del análisis de estos datos se puede concluir:

1) Los esferoides de pequeño tamaño (<250  $\mu\text{m}$ ), cuyo crecimiento es exponencial, presentan un tiempo de duplicación, similar al observado en los cultivos en monocapa (el TD de los esferoides cuyo diámetro está comprendido entre 100 y 300  $\mu\text{m}$  que oscila entre 32-48 horas, es, efectivamente, similar al TD estimado para las células MCF-7 cultivadas en monocapa,  $40.0 \pm 5.7$  horas (VILLALOBOS, 1989)).

2) los esferoides cuyo tamaño medio supera las 300  $\mu\text{m}$  de diámetro pero no han alcanzado aún las 900  $\mu\text{m}$ , presentan un tiempo de duplicación sensiblemente superior al de los esferoides de menor tamaño (el citado parámetro alcanza, por ejemplo, las 60 horas para los esferoides de 700  $\mu\text{m}$  de diámetro), fenómeno que parece estar relacionado, en estos niveles de volumen, con la redistribución de los elementos celulares en las diferentes fases del ciclo mitótico y no con la pérdida o muerte celular dado que la viabilidad y la eficacia de clonaje de estos MTS son idénticas a las que presentan las células cultivadas en monocapa (Tabla 27);

3) los tiempos de duplicación de volumen de los esferoides de mayor tamaño -diámetros superiores a 1000  $\mu\text{m}$ - correlacionan estrechamente con el TD observado cuando las células se inoculan en el huésped apropiado para provocar su crecimiento "in vivo" (TD esferoide próximo a los 12 días / TD de las células MCF-7 inoculadas en el ratón atímico igual a 11

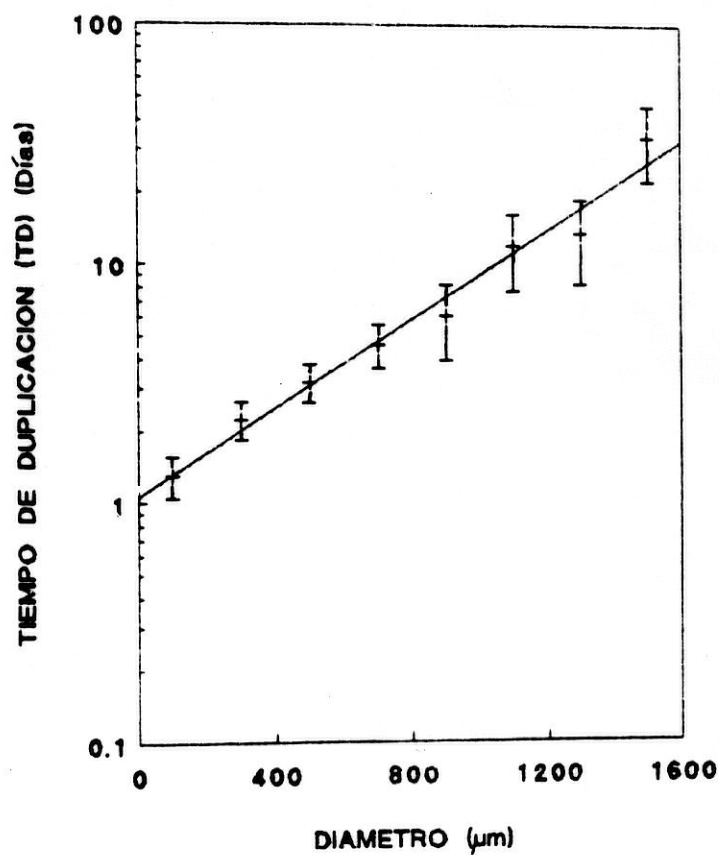


Figura 41. Relación entre el volumen de los esferoides MCF-7 y el Tiempo de Duplicación (TD) de dicho parámetro. El TD expresado en días, se ha estimado mediante la aplicación del modelo gompertziano al crecimiento de esferoides de diferente tamaño, y se representa frente al volumen, expresado en  $\mu\text{m}^3 \cdot 10^6$ .

días (BRUNNER, 1987)).

La estimación teórica del volumen máximo del esferoide está sujeta, por otra parte, a algunas limitaciones que resulta obligado mencionar. En efecto, la ecuación de Gompertz permite ver claramente que el volumen máximo se alcanzará en el momento en que se llegue a la asíntota del crecimiento frente al tiempo, momento en el que  $V_{\max}$  viene dado por la ecuación  $V_{\max} = V_0 \cdot e^{A/a}$ . Como el cociente  $A/a$  es relativamente constante para todos los esferoides, lo interesante en este punto es el valor  $V_0$  o volumen inicial que se debe emplear para el cálculo de  $V_{\max}$ . Nosotros rechazamos, en principio, que  $V_0$  fuese considerado como el volumen de un elemento celular aislado debido a que rara vez se ha observado la iniciación de los esferoides a partir de una sola célula. El proceso de iniciación pasa por la agregación celular desde el momento mismo de la siembra. Por esta razón, hemos utilizado para  $V_0$  el primer valor de volumen estimado mediante la observación experimental. En estas condiciones, considerando los valores de  $A$  y  $a$  expuestos en la Tabla 31 como los valores medios de dichas constantes en un grupo de 80 esferoides mantenidos individualmente, se puede demostrar que el incremento del volumen inicial de un esferoide se multiplica por un valor cercano a 300 (la resolución de la exponencial  $e^{(0,368 \pm 0,067 / 0,065 \pm 0,013)}$  resulta en un valor de 287). Así, considerando que el valor medio del volumen inicial de un esferoide está situado en torno a  $1 \cdot 10^6 \mu\text{m}^3$ , el volumen máximo

resultante del crecimiento del esferoide será de  $3,44 \text{ mm}^3$ , magnitud no muy lejana del valor máximo obtenido experimentalmente cuando el tiempo de observación se prolonga suficientemente.

En un intento de precisar al máximo el valor del volumen máximo ( $V_{\text{max}}$ ) se podría partir de una estimación distinta del volumen inicial, aceptando para  $V_0$  el valor correspondiente al punto en que el crecimiento del esferoide deja de ser exponencial. Para ello, siguiendo a Demicheli y cols (DEMICHELI, 1989) se necesitaría conocer la relación existente entre los parámetros A y a en células crecidas en monocapa, en esferoides de diferente diámetro y tiempo de observación y en tumores transplantados y desarrollados en un huésped apropiado, propósito que va mas allá de los objetivos de este trabajo, pero que queda enunciado para próximas etapas.

Otros parámetros derivados de la aplicación de la ecuación de Gompertz, aunque de indudable valor teórico, poseen menor aplicabilidad. Así, por ejemplo, es posible conocer las coordenadas -volumen y tiempo- que definen el punto de inflexión o momento en que la concavidad superior de la curva de crecimiento se invierte transformándose en una curva de concavidad inferior. Este punto de inflexión se ha situado, en referencia a un volumen medio de los esferoides MCF-7, en torno a las  $600\text{-}800 \mu\text{m}$  de diámetro. En principio cabría esperar que el punto de inflexión estuviera relacionado con el cambio de cinética de proliferación, pero la observación experimental

demuestra que la pérdida del crecimiento exponencial de los esferoides se produce para valores de volumen y/o diámetro muy inferiores a los existentes en el tiempo de inflexión.

Una derivación práctica de gran utilidad, que puede ser obtenida mediante la aplicación del modelo matemático de Gompertz al crecimiento de los esferoides, es el conocimiento del tiempo transcurrido desde el momento en que se produce la objetivación experimental de un tumor dado y el momento inicial en que dicho tumor se presume que estaba constituido por una única célula. La extrapolación hacia atrás de la curva de crecimiento tumoral puede ser tremendamente útil pues permite conocer la evolución del crecimiento tumoral antes de su detección. De acuerdo con los datos obtenidos por Laird en el seguimiento de tumores animales (LAIRD, 1965), la resolución de la ecuación de Gompertz, tomando como volumen inicial el volumen de un elemento celular, ha permitido conocer: a) el tiempo real, previo al instante de objetivación experimental, en que comienza a desarrollarse el tumor; b) el índice proliferativo inicial; c) el número de veces que la población celular duplica el número de sus elementos hasta alcanzar el tamaño mínimo compatible con su detección. El conocimiento del tiempo real de origen de un determinado tumor y la estimación del punto de inflexión de la sigmoide de crecimiento, fácilmente deducible mediante la aplicación del modelo gompertziano, permiten, así, efectuar la normalización de las curvas de crecimiento de diferentes tumores y su tratamiento

comparativo (LAIRD, 1965).

Recientemente se ha cuestionado la validez del modelo gompertziano que con tanto éxito ha sido aplicado en estudios clínicos de cáncer de mama (NORTON, 1988). Speer y cols, propusieron en su día (SPEER, 1984) que durante su crecimiento los tumores se rigen por un proceso que ajusta bien con las coordenadas del modelo gompertziano, pero que de una forma fortuita, al azar, se producen alteraciones espontáneas del crecimiento, que se presentan en forma de brotes que pueden ocurrir en cualquier momento, independientemente del volumen tumoral alcanzado. Aunque entre el coeficiente alfa, una de las constantes más significativas de la ecuación de Gompertz, y el tamaño máximo que puede alcanzar un tumor ( $V_{max}$ ) se ha descrito (NORTON, 1976) una relación inversa, Speer y cols (SPEER, 1984) van más allá y sugieren que todos los tumores mamarios presentan un valor constante para alfa y  $V_{max}$  en el momento en que se inicia el crecimiento tumoral, produciéndose al azar caídas en el valor de alfa que resultan en un valor de  $V_{max}$  concomitantemente elevado. Para dar una solución numérica a esta proposición se han incluido dos nuevos parámetros en la ecuación de Gompertz, que gobiernan tanto la probabilidad como la magnitud del cambio de las constantes. El modelo así obtenido implica que los parámetros de crecimiento sufran algunos cambios durante la vida del tumor y establece un patrón de crecimiento irregular cuya existencia ha sido probada experimentalmente en algunos tumores (INGLEBY, 1956, SKINNEP



1988, RETSKY, 1989). El modelo de crecimiento "en brotes" ha suscitado, no obstante, una enérgica desaprobación por parte de los seguidores del modelo gompertziano (NORTON, 1988, 1989).

Ecuación de Bertalanffy. - La débil base biológica en la que se apoya la ecuación de Gompertz ha influido, sin duda, en la búsqueda de otros modelos matemáticos explicativos del crecimiento tumoral. El modelo propuesto por Bertalanffy (BERTALANFFY, 1960), teóricamente fundamentado en observaciones relativas a procesos metabólicos puede ser, y de hecho ha sido, aplicado (STEEL, 1977; VAIDYA, 1982) al estudio del crecimiento tumoral, para lo cual se han asumido una serie de hipótesis, de base metabólica, entre las que destacan: i) el índice de crecimiento tumoral es igual a la diferencia entre la proliferación y pérdida celular; ii) la disminución del ritmo de crecimiento tumoral es proporcional al volumen del tumor; iii) el incremento de masa tumoral se encuentra limitado por la capacidad de respiración y nutrición celular, lo que, en otros términos, puede ser expresado diciendo que el volumen tumoral es proporcional a la superficie externa del tumor; iv) durante el crecimiento tumoral la relación volumen/superficie tumoral permanece inalterable admitiéndose, en todo caso, que el índice de crecimiento es proporcional al volumen del tumor elevado a  $2/3$ .

La ecuación de Bertalanffy refleja el crecimiento tumoral en animales de experimentación con gran exactitud

(STEEL, 1977; VAIDYA, 1982) y predice con fidelidad los cambios de volumen en función del tiempo. Ello, unido a su origen en la teoría metabólica, a la existencia de pocas constantes arbitrarias en su enunciación y al hecho de que pueda ser comprobada experimentalmente, hace de este modelo matemático un instrumento útil para el análisis del crecimiento tumoral en estudios clínicos y experimentales.

El crecimiento de los esferoides MCF-7 en condiciones basales se ajusta con gran precisión a la ecuación de Bertalanffy, obteniéndose una baja dispersión, para esferoides considerados individualmente, en la estimación de los valores de las constantes B y  $\beta$ , con un buen coeficiente de correlación en el ajuste de las curvas de crecimiento (Tablas 34 y 35). La Figura 40 es una representación gráfica del binomio Volumen tumoral/ tiempo de observación, ajustado a la ecuación de Bertalanffy, una vez que las constantes de dicha ecuación han sido sustituidas por los valores estimados considerando el crecimiento de 80 esferoides mantenidos individualmente. La ecuación resultante tiene la forma siguiente:

$$V = \frac{V_0}{(1 - 0,879 \pm 0,129)^3} \cdot (1 - 0,879 \pm 0,129 \cdot e^{-0,019 \pm 0,01528t})^3$$

Entre los "parámetros derivados" de la aplicación del modelo de Bertalanffy destaca el denominado Volumen Máximo ( $V_{max}$ ). Así, utilizando los parámetros medios de  $V_0$  y de B obtenidos, como en el caso del modelo gompertziano, mediante el

cálculo de la media de 80 esferoides considerados individualmente, hemos obtenido para un  $V_{\max}$  un valor próximo a  $6,8 \text{ mm}^3$ , hecho que supone un incremento del volumen inicial del esferoide por un factor de  $\approx 570$ .

Ecuación logística de Verhulst-Pearl.- Muy similar a la ecuación de Bertalanffy es la llamada ecuación logística, descrita en 1825 por Verhulst, redescubierta por Pearl en 1924 y desarrollada finalmente por Swan en 1977 (SWAN, 1977). Se trata de otra ecuación en la que no hay una clara base biológica que justifique la selección de algunos de sus integrantes (VAIDYA, 1982), si bien los resultados que se obtienen de su aplicación al crecimiento tumoral en humanos son de gran valor (EMANUEL, 1973; STEEL, 1977). La ecuación se ha descrito como altamente flexible puesto que, cuando el tiempo de observación se reduce a las fases iniciales del crecimiento tumoral, predice éste de manera muy parecida a como lo hace el modelo exponencial para adoptar, después, una configuración de "plateau" si el tiempo de observación experimental se prolonga suficientemente (VAIDYA, 1982).

La aplicación del modelo logístico de Verhulst-Pearl al crecimiento de los esferoides MCF-7 no ha proporcionado, en nuestra experiencia, resultados tan fiables como los obtenidos con los modelos de Gompertz y Bertalanffy. En efecto, como puede comprobarse en las Tablas 32 y 34 los coeficientes de ajuste son algo más dispares, existiendo casos en los que el

crecimiento queda bien reflejado por este modelo, junto con otros en los que esto no ocurre. Quizás lo más llamativo del modelo logístico sea la superposición del ajuste matemático de los datos experimentales a un valor máximo del volumen, asintótico, que se corresponde invariablemente con el del último volumen estimado experimentalmente, con independencia del tiempo de observación.

La Figura 40 ofrece en forma gráfica una representación de los cambios de volumen en función del tiempo, ajustados a la ecuación que define el modelo de Verhulst-Pearl, una vez que las constantes de dicha ecuación se sustituyen por los valores estimados considerando el crecimiento de 80 esferoides mantenidos individualmente. La ecuación resultante tiene la forma siguiente:

$$V = \frac{0,246 \pm 0,037}{e^{-0,246 \pm 0,037 t} \cdot (0,246 \pm 0,037 / V_0 - 1,39 \cdot 10^{-10} \pm 6,3 \cdot 10^{-11}) + 1,39 \cdot 10^{-10} \pm 6,3 \cdot 10^{-11}}$$

#### 4.10. VIRTUALIDAD DEL MODELO ESFEROIDAL

De acuerdo con el contenido de los párrafos anteriores parece claro que, en el análisis del crecimiento tumoral, la utilización de modelos experimentales -células en cultivo en monocapa y/o agregados multicelulares de forma esferoidal- y aproximaciones matemáticas diversas pueden mejorar el nivel de nuestros conocimientos acerca de los mecanismos que rigen la cinética de proliferación celular de

los procesos malignos. En particular, el modelo representado por los esferoides de células MCF-7 une a las ventajas de su sencillez, la exactitud con que refleja la compartimentalización proliferativa y de diferenciación de los elementos componentes de un tumor sólido. Todos los factores microambientales que determinan por un lado, la actividad proliferativa y, por otro, el proceso de diferenciación de los elementos integrantes de una población celular tumoral quedan reproducidos en el esferoide multicelular. Así, la posición y polaridad celular, la interacción con la matriz extracelular, el contacto célula-célula, los gradientes de oxígeno, nutrientes e iones y el efecto de los inhibidores y factores de crecimiento, pueden ser objeto de estudio usando este modelo.

A título de ejemplo resumimos, a continuación, las características proliferativas de las células MCF-7 de un esferoide típico de 500  $\mu\text{m}$  de diámetro, como el representado en la Figura 42, en la que se puede comprobar que los componentes del esferoide considerado se distribuyen en los siguientes compartimentos:

- 1) Células con actividad proliferativa, situadas en cualquiera de las fases del ciclo divisorio celular, cuya actividad mitótica obedece sólo a la presencia de factores inhibidores y estimuladores del crecimiento presentes en el medio que las rodea. Estas células tienen libre acceso a los nutrientes y al oxígeno, sus productos de desecho no modifican ni el pH ni la concentración iónica del medio, expresan

funciones de diferenciación de manera evidente tanto desde el punto de vista morfológico (gránulos secretores, polarización, etc.) como funcional (presencia de receptores estrogénicos) y se encuentran, además en un equilibrio dinámico con otros compartimentos celulares.

2) Células quiescentes, clásicamente definidas como células en estadio  $G_0$  del ciclo divisorio. Se trata de elementos formes con capacidad proliferativa, que pasan al compartimento proliferativo si los inhibidores de la proliferación se bloquean o los factores de crecimiento alcanzan un nivel de concentración adecuado;

3) Células diferenciadas, compartimento de difícil definición, no porque no existan células que presenten el fenotipo más especializado y complejo imaginable, sino por el hecho de la imposibilidad de demostración de su irreversibilidad al compartimento de células proliferativas.

4) Células precarias en cuanto al aporte de oxígeno y nutrientes. Se trata de una subpoblación que difícilmente puede ser evaluada en muchos modelos tumorales. No obstante, en los esferoides multicelulares el citado compartimento parece tener su paradigma. Son células que parecen encontrarse en diferentes fases del ciclo divisorio, en condiciones defectuosas de estabilidad por lo que frecuentemente, pasan a engrosar el grupo de muerte celular. Están además sometidas a la toxicidad de los productos liberados por las células destruidas.

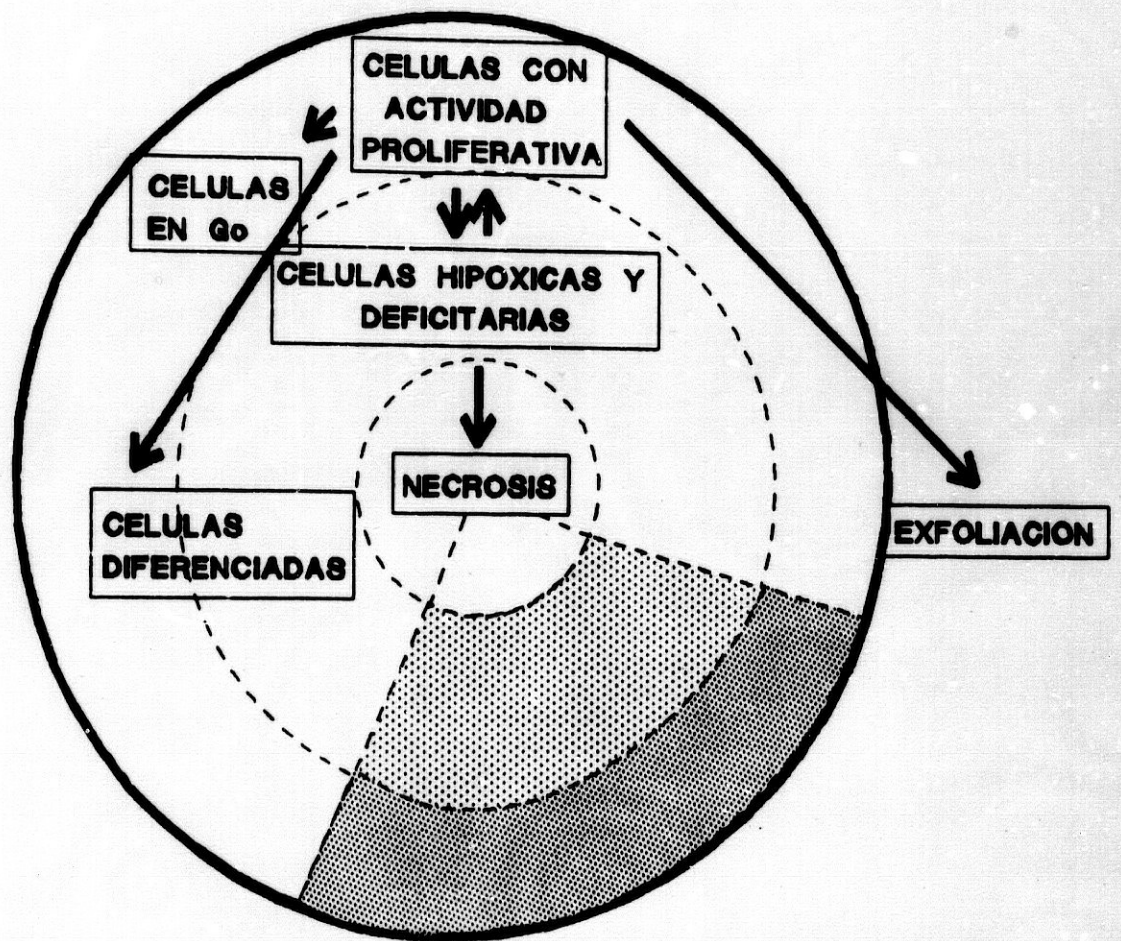


Figura 42. Distribución de los elementos celulares componentes de un esferoide MCF-7 en diferentes compartimentos definidos en función de su actividad proliferativa: células con actividad proliferativa, células quiescentes, células diferenciadas, grupo celular necrótico y exfoliación y pérdida celular.

Su importancia en la biología del esferoide es crucial, toda vez que presentan especial resistencia a los agentes químicos antineoplásicos y a la radiación ionizante y pueden progresar al compartimento de células proliferativas si las condiciones de nutrición y oxigenación mejoran.

5) Células muertas, que ocupan el área de necrosis central de todo esferoide de más de 300  $\mu\text{m}$  de diámetro. Parecen controlar el crecimiento del esferoide en sí mismo, actuando sobre las células hipóxicas y con carencia nutritiva.

6) Células exfoliadas, que abandonan el esferoide, por desprendimiento, desde los estratos celulares más externos. Se trata de un fenómeno interesante, no observado con demasiada frecuencia, pero que tiene un indudable valor en el análisis de los mecanismos de exfoliación y metástasis "in vivo".

Nos ha parecido interesante, por último, presentar en forma de imagen la relación existente entre dos de los aspectos más importantes de la biología de los esferoides MCF-7: su arquitectura y comportamiento proliferativo (Figura 43). Como puede verse en la citada Figura la sigmoide que define la evolución del incremento del volumen del esferoide en función del tiempo se corresponde con una serie de etapas o estadios en el crecimiento del mismo caracterizados por un patrón morfológico particular. Así, en las etapas iniciales del



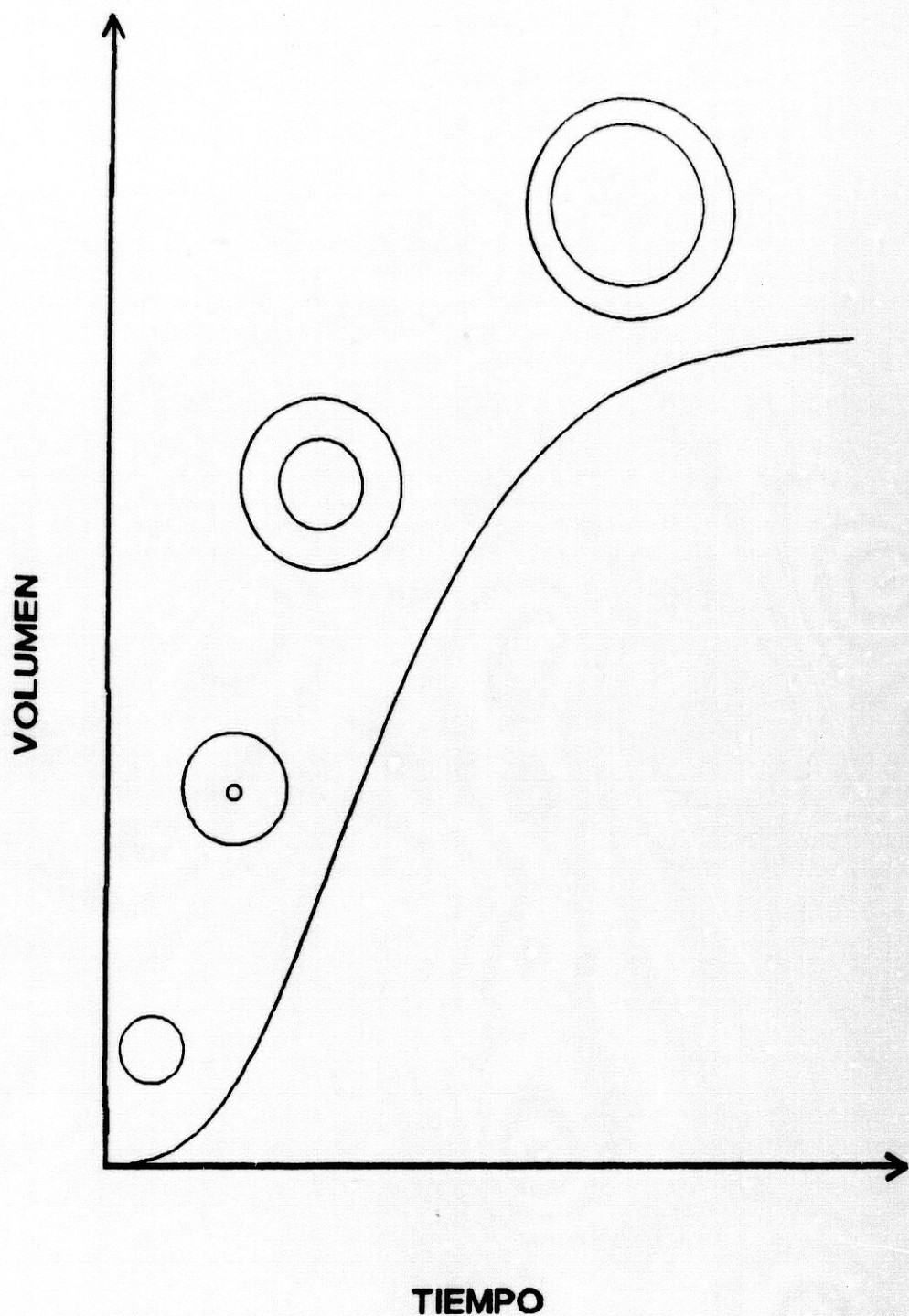


Figura 43. Sigmoide de crecimiento de los esferoides MCF-7 y su relación con la arquitectura microscópica. Cada etapa del crecimiento del esferoide viene representada por una fracción de la curva de crecimiento a la cual corresponde una morfología característica: 1. Fase inicial de crecimiento exponencial, correspondiente a esferoides cuyo diámetro es  $\leq 300 \mu\text{m}$ ; 2. Fase intermedia caracterizada por un crecimiento lineal y por la aparición del punto de inflexión, momento en que la concavidad de la curva se hace inferior, que se corresponde con esferoides en los que es fácil poner en evidencia un centro necrótico, 3 Fase final de plateau que corresponde a esferoides de diámetro superior a  $900 \mu\text{m}$ .

crecimiento, en las que el incremento de volumen del esferoide obedece a una ley exponencial, éste se presenta como un conglomerado celular, relativamente compacto, con una distribución homogénea de los elementos proliferantes en todos los niveles de su espesor. Un poco más adelante en el tiempo aparecen signos de abandono del compartimento proliferativo por parte de muchos de los elementos celulares del esferoide, apareciendo, de este modo, un reducto de células quiescentes en los niveles más internos de la masa celular. El fenómeno descrito se acompaña de un enlentecimiento en el crecimiento del esferoide. Finalmente, el incremento de la proporción de células quiescentes se sucede, a partir de determinado volumen de masa celular, de la aparición de un centro necrótico compuesto de elementos celulares con claros signos de muerte. Simultáneamente, el crecimiento del esferoide se ralentiza considerablemente hasta producirse un aparente estancamiento de su ritmo proliferativo. En todo este proceso, sin embargo, el espesor del anillo de células viables permanece relativamente constante.

#### 4.11. HORMONOSENSIBILIDAD Y HORMONODEPENDENCIA

El cultivo en suspensión de las células MCF-7 en condiciones proclives para la formación de esferoides multicelulares, se ha llevado a cabo en medio MEM suplementado con 10% de suero bovino fetal. Se trata del mismo medio de

cultivo en el que rutinariamente se mantienen las células formando un tapiz monocelular o monocapa. La elección de este medio obedece a criterios simples: es una mezcla nutritiva que permite un buen crecimiento celular. El suero bovino fetal adicionado al medio se inactiva mediante calor, siguiendo la metodología previamente descrita, operación que resulta en la eliminación y desnaturalización de algunos de sus componentes, entre los que se cuentan las proteínas transportadoras de las hormonas sexuales (SOTO, 1987). La manipulación térmica del suero no afecta a la presencia de los esteroides, toda vez que mediante técnicas analíticas es posible poner de manifiesto que el estradiol sigue formando parte del suero bovino, en concentración picomolar (SOTO, 1987), después del tratamiento. Este hecho unido a la observación reciente de que el indicador de pH rojo fenol, presente en el medio MEM, es un estrógeno (BERTHOIS, 1986), determina que tanto durante el mantenimiento en monocapa, como en la iniciación y seguimiento de los esferoides MCF-7, los estrógenos hayan estado presentes. La necesidad de estudiar en qué manera los estrógenos condicionan la aparición de los esferoides, facilitando la ordenación tridimensional de las células MCF-7, nos ha obligado a cultivar éstas en medios sintéticos libres del indicador rojo fenol y suplementados con suero, previamente extraídos los esteroides sexuales. Por otra parte, comoquiera que no existe una razón especial para mantener las células MCF-7 de origen humano en sueros heterólogos, hemos procedido a suplementar los medios

con un 10% de suero homólogo.

La iniciación de los esferoides MCF-7 en medio MEM sin rojo fenol, MEM(-RF), suplementado con 10% de suero humano desprovisto de estrógenos (HSDCC), merece un amplio comentario. Durante los primeros días tras la siembra celular en discos Petri "bacteriológicos" se puede observar la agregación de los elementos formes, al igual que ocurre cuando se usa medio MEM con 10% de FBS. No obstante, cuando los agregados celulares alcanzan un volumen máximo de  $4,2 \times 10^6 \mu\text{m}^3$ , correspondiente a un diámetro de 200  $\mu\text{m}$ , se produce una elongación de las agrupaciones celulares que se comportan entonces como cordones celulares irregulares en donde los elementos formes se organizan predominantemente formando estructuras cilíndricas. Esta pérdida de la capacidad de crecimiento en forma esferoidal no se acompaña de ningún signo de muerte celular, toda vez que los cordones celulares se adhieren por sus extremos, entre sí y a la superficie de la caja de Petri, y continúan creciendo durante algunos días. Al mismo tiempo puede descubrirse en el cultivo la existencia de esferoides irregulares de tamaño limitado a 200  $\mu\text{m}$  de diámetro mayor que se mantienen en suspensión y cuyos elementos formes muestran actividad proliferativa. Todo esto se acompaña de la presencia de múltiples elementos formes que se agregan entre sí y no llegan a formar verdaderas estructuras.

Es interesante hacer notar que no se trata éste de un proceso de toxicidad ocasionado por la suplementación del

medio con suero previamente tratado con objeto de eliminar los estrógenos endógenos. Los argumentos que se pueden esgrimir en contra de esta posibilidad son: 1) no se han evidenciado signos de muerte celular, sino tan sólo cambios morfológicos en la estructuración de los elementos formes; 2) durante el tiempo de observación post-inicio (hasta 15 días), la población celular crece, aunque disminuye el número de estructuras esferoidales; 3) Se ha descrito un fenómeno parecido cuando las células MCF-7 se cultivan en monocapa en medio de idénticas características (SOTO, 1985), es decir, tras unos días de crecimiento, se produce una paulatina disminución del índice proliferativo, sin que sea posible atribuir ésta a una posible toxicidad del carbón sobre los elementos formes, dado que procesos alternativos de eliminación de los estrógenos, como la cromatografía con Lipidex 1000 (SOTO, 1985), determinan un patrón de comportamiento idéntico; 4) usando las células de tiroides de rata FRTL-5, cuya dependencia de la hormona hipofisaria tireotropa TSH es bien conocida, se ha podido demostrar que no existe posibilidad de estructuración en esferoides multicelulares si no se suplementa el medio de cultivo con cantidades significativas de dicha hormona (MULCAHY, 1985).

Especial atención merece la experiencia de Darbre y King (DARBRE, 1987) acerca de los efectos diferenciales de las hormonas esteroideas sobre los parámetros de crecimiento celular. De forma resumida, ambos autores han puesto de

manifiesto que cuando las células S115 (células de un tumor mamario de ratón) se mantienen durante varios meses en presencia de andrógenos, presentan una respuesta proliferativa a la adición de los propios andrógenos, hecho que no es posible demostrar si los cultivos se mantienen en ausencia de los esteroides durante más de 20 semanas. Más interesante aún, en el trabajo de Darbre, es el hecho no de que las células S115 sean sensibles al estímulo hormonal sino que cuando a dichas células se las fuerza a crecer en suspensión los andrógenos constituyen la clave única y necesaria para que las células S115, andrógeno-sensibles, se estructuren progresen y crezcan formando esferoides multicelulares. Esta observación, única de las presentadas en la literatura que demuestra la dependencia respecto de las hormonas esteroideas del proceso de estructuración de los esferoides multicelulares, coincide, sustenta y apoya la tesis que defendemos en este trabajo.

Experimentos realizados en paralelo, partiendo de una misma suspensión celular, pero con la siembra de los elementos formes en medio MEM suplementado con 10% de FBS, (es decir, el mismo medio de mantenimiento), han conducido, inequívocamente, a la formación de esferoides con las características de crecimiento y morfología descritas anteriormente para los mismos. Se podría suponer, por otra parte, que el origen de la suspensión celular fuese causa de la iniciación de los esferoides en medio suplementado con HSDCC. Como la suspensión celular puede contener, además de la

tripsina, restos de suero fetal con estrógenos endógenos, podría ocurrir que durante los primeros días de crecimiento en un medio teóricamente libre de estrógenos, los esferoides dispusiesen de estradiol residual aportado por la suspensión celular. Esta interpretación entra, no obstante, dentro de lo puramente especulativo puesto que se puede argumentar que no es el estradiol remanente, sino la información que éste ha transmitido a las células en monocapa, la causante del comportamiento inicial de las células MCF-7 en el medio libre de estrógenos.

En varios experimentos hemos tenido ocasión de comprobar el efecto del estradiol sobre el crecimiento de las células MCF-7, cuando éstas se cultivan en suspensión formando esferoides multicelulares en medio MEM suplementado con 10% de suero fetal no DCC. En las condiciones experimentales descritas, la proliferación de los esferoides no tratados con estradiol da lugar a curvas de crecimiento similares a las obtenidas cuando el suplemento de estradiol es del orden de  $10^{-10}$  a  $10^{-6}$  M. La causa de este fenómeno no es otra que la existencia de estrógenos en el medio "basal", aportados por el suero bovino fetal y cuya concentración se sitúa en torno a los  $10^{-11}$  M.

No obstante la falta de respuesta al estradiol exógeno en cuanto a proliferación se refiere, las altas concentraciones del estrógeno ejercen un marcado efecto sobre la expresión fenotípica de algunos caracteres propios de las

células estrógenosensibles. Así, además de la observación de una perfecta estructuración celular intraesferoide, se ha podido poner de manifiesto la especial expresión del receptor estrogénico, mediante técnicas inmunohistoquímicas, cuando los esferoides se exponen a los estrógenos.

Los esferoides no tratados presentan, por otra parte, un patrón común de distribución del anticuerpo antirreceptor estrogénico, que se caracteriza: 1) por una ligera heterogeneidad en la intensidad de marcaje celular, presentándose éste principalmente en el núcleo y coexistiendo en una misma capa celular elementos formes con intenso marcaje y otros que muestran un débil acúmulo del trazador; 2) por una distribución peculiar del marcaje en esferoides de tamaño superior a 400  $\mu\text{m}$  de diámetro, en los que aparece, a diferencia de esferoides más pequeños en los que células de todos los estratos pueden resultar positivas, un acúmulo de células positivas en los 6-7 primeros estratos celulares (los más superficiales y en contacto con la cara externa del esferoide), mientras que las células situadas por debajo de este nivel no expresan el receptor estrogénico.

Los esferoides expuestos a concentraciones suprafisiológicas de estradiol ( $10^{-9}$ - $10^{-6}$  M) presentan, en cambio, un patrón único tras la inmunotinción con anticuerpos antirreceptor estrogénico, definido por una disminución cualitativa y cuantitativa de la expresión del antígeno y la aparición de una leve tinción de "fondo", que apenas si



diferencia las células positivas de las negativas, homogéneamente distribuidas, además, en los estratos celulares superficiales y profundos. Este fenómeno, de constante aparición, ha sido previamente observado en las células MCF 7 mantenidas en monocapa y sometidas a tratamiento con estrógenos, modelo sobre el que se ha enunciado la hipótesis de que el receptor estrogénico se comporta como una proteína funcional, cuya presencia depende del ritmo de crecimiento celular y de la propia acción de los estrógenos (Del MORAL, 1990).

Debido a que la ausencia de estrógenos parece tener dramáticos efectos sobre la eficiencia de formación de los esferoides por las células MCF-7 (como lo demuestra el fracaso de este proceso cuando las células se mantienen en suero libre de rojo fenol suplementado con suero tratado con carbón dextrano) hemos procedido a ensayar el efecto del estradiol sobre esferoides MCF-7 mantenidos en medio genuinamente libre de estrógenos (MEM (-RF)+10% HS-DCC), una vez que los esferoides ya iniciados y estructurados fueron transferidos a dicho medio. Bajo estas circunstancias experimentales, se ha dispuesto de un sistema en el que estructuras multicelulares tridimensionales, con un complejo sistema organizativo, resultan "obligadas" a crecer en medio sin estrógenos y en un medio suplementado con estradiol a dosis conocidas ( $10^{-10}$ - $10^{-9}$  M). Con este protocolo experimental se ha podido poner de manifiesto el acusado efecto de la hormona a tan bajas

concentraciones, observándose cómo a los pocos días de iniciados los esferoides, estos presentan una estructura, aspecto morfológico y cinética de crecimiento comparable a los elementos celulares cultivados en medio MEM+10% FBS (Tablas 120 y 121).

Una vez ajustados los datos experimentales a las ecuaciones de los modelos de Gompertz, Verhulst-Pearl y Bertalanffy y conocidas las constantes que definen cada ecuación se ha valorado mediante el test de diferencias entre medias la homogeneidad de las muestras, viéndose que no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ) los valores obtenidos para las constantes de la ecuación de Gompertz, cuando se comparan los siguientes grupos:

-MEM+10% FBS vs. MEM(-RF)+10% HS

-MEM(-RF)+10% HS vs. MEM(-RF)+10% HSDCC +  $10^{-9}$  M  $E_2$

-MEM(-RF)+10% HS vs. MEM(-RF)+10% HSDCC a partir de la adición de  $10^{-9}$  M  $E_2$  en el 16.º día

Especial comentario necesita el grupo experimental recogido en el último lugar de esta relación de significancias. Ha sido posible demostrar que la presencia de estradiol no sólo es fundamental para que las células MCF-7 se estructuren e inicien como esferoides multicelulares, sino que, además, la adición del esteroide a cultivos que se encuentran en una fase estacionaria de desorganización, provocada por su

mantenimiento durante más de 15 días en medio libre de estrógenos, da lugar a la reestructuración de estos agregados y determina que su crecimiento se ajuste a las coordenadas que rigen los modelos matemáticos explicativos del crecimiento esferoidal.

El estudio del efecto estrogénico sobre los esferoides MCF-7 se ha completado, finalmente, con la investigación del efecto combinado/secuencial de los antiestrógenos y estrógenos. De acuerdo con el contenido de la Tabla 150 el antiestrógeno hidroxitamoxifeno ejerce un efecto inhibitor sobre el crecimiento de los esferoides MCF-7, los cuales, cuando quedan expuestos a concentraciones de OH-TAM del orden de  $10^{-7}$ - $10^{-6}$  M enlentecen su crecimiento, sufren procesos de desestructuración y desorganización, cambian los patrones de expresión antigénica y, en suma, sus parámetros proliferativos presentan un pésimo ajuste a los modelos de crecimiento propuestos. Cuando el ajuste matemático lo permitió hemos efectuado el test de comparación entre medias para los valores de las constantes que definen cada modelo de crecimiento, encontrando que existen diferencias significativas entre tales parámetros ( $p < 0,001$ ) cuando se comparan los grupos MEM+10% FBS y MEM+10% FBS suplementado con  $10^{-6}$  y  $10^{-7}$  M de OH-TAM.

El estudio del efecto de los antiestrógenos pone de manifiesto que se trata de un fenómeno de difícil interpretación, justificado en parte por la competencia que el OH-TAM ejerce sobre la unión del estradiol al receptor

estrogénico (MILLER, 1983; SUTHERLAND, R.L. 1983a) así como por alguna otra propiedad del antiestrógeno para, por sí mismo, actuar sobre las células MCF-7 independientemente del sistema estrógeno/receptor específico (SUTHERLAND, R.L. 1983b; 1983a). Sea cual fuere el mecanismo lo que parece evidente es que el tratamiento de una población de células MCF-7 con antiestrógenos origina un enlentecimiento del crecimiento de la población celular, presentándose en el estudio de distribución de los elementos celulares en las fases del ciclo celular un acúmulo de elementos formes en las fases  $G_0/G_1$  del ciclo mitótico (SUTHERLAND, R.L. 1983a; 1983b). Este fenómeno parece no estar limitado a los experimentos realizados con las células MCF-7 cultivadas en monocapa, sino que podría extenderse también a los esferoides multicelulares. En efecto, aunque no se ha realizado, en nuestro estudio, un análisis preciso acerca de la distribución de los elementos constitutivos de los esferoides multicelulares en las diferentes fases del ciclo celular, existen ciertos indicios experimentales que parecen probar el efecto "sincronizador" del tamoxifeno. Los experimentos a los que nos referimos son aquellos en los que los esferoides MCF-7 se tratan durante un período de 8-10 días con una concentración constante de  $10^{-7}$  M de OH-TAM, en medio MEM+10% FBS, y posteriormente se efectúa un cambio del medio nutriente, sustituyendo el medio inicial por MEM+10% FBS solo o suplementado con  $10^{-7}$  M de 17 $\beta$ -estradiol. En estos experimentos hemos podido observar como tras el enlentecimiento

de la cinética de proliferación celular provocado por el antiestrógeno, el cambio de medio de cultivo por otro que aporta un complemento de 17 $\beta$ -estradiol, conduce, invariablemente, a un incremento de la capacidad proliferativa de los esferoides, a su reestructuración morfológica y al ajuste de los parámetros de crecimiento a las constantes que definen los modelos de proliferación propuestos (Gompertz, Bertalanffy y Verhulst-Pearl) (inexistencia de diferencias significativas entre los valores obtenidos para las constantes de las ecuaciones, cuando se comparan los grupos MEM+10% FBS y MEM+10% FBS tratado con OHTAM y rescatado con 17 $\beta$ -estradiol).

Es interesante considerar que a diferencia de lo que ocurre en monocapa, el simple cambio de medio, esto es, la supresión de la exposición al OH-TAM, no determina, en ningún caso, la recuperación de la cinética de crecimiento y morfología atribuida a los esferoides MCF-7 no tratados. Este hecho contrasta con las observaciones previas de los fenómenos ocurrentes en monocapa (OLEA, 1987; Del MORAL 1990) y podría justificarse considerando la particular distribución de los elementos celulares dentro de la estructura tridimensional que presentan los esferoides MCF-7. No resulta incongruente pensar que la concentración de hormona necesaria para efectuar el "rescate" de las células bloqueadas por el tamoxifeno ha de alcanzar cierto valor para hacer posible, vía penetración intraesferoide, un nivel de 17 $\beta$ -estradiol suficiente para hacer reversible el bloqueo antiestrogénico. Los problemas de

difusión de sustancias a través de los estratos celulares que componen el esferoide han sido previamente estudiados (SUTHERLAND, 1988; CARLSSON, 1989) y la idea que se tienen sobre ellos es que, en muchas ocasiones, la relación de concentraciones necesarias para obtener un mismo efecto en monocapa frente al esferoide multicelular es muy desfavorable para estos últimos. Recuérdese, además, que el aporte de 17 $\beta$ -estradiol en el medio "basal", esto es MEM+10% FBS, se sitúa en torno a  $10^{-10}$ - $10^{-9}$  M, concentración 1000 veces inferior a aquélla en que los fenómenos de rescate son claramente evidentes ( $10^{-7}$  M).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo son compatibles con la hipótesis negativa del control de la proliferación celular (SOTO, 1987; SONNENSCHNEIN, 1989), siendo los postulados sobre los que se basa dicha hipótesis aplicables a los datos experimentales obtenidos mediante el crecimiento de las células MCF-7 en forma de esferoides multicelulares. En virtud de ello es posible proponer: i) la proliferación es una propiedad constitutiva de las células; ii) para que las células expresen esta propiedad tan solo tienen que estar libres de los inhibidores que controlan su expresión; iii) las hormonas sexuales estimulan la proliferación celular bloqueando la acción de ciertos inhibidores presentes en suero.

No obstante, el análisis objetivo de los resultados experimentales no permite descartar otras hipótesis que tratan de explicar los mecanismos por los que las hormonas sexuales

controlan la proliferación en los órganos subsidiarios de su acción. Por todo ello, se hace necesario proseguir con el estudio del compartimento proliferativo de las células de cáncer mamario MCF-7, en orden a obtener las pruebas experimentales que nos ayuden a discernir entre los postulados que sustentan las diferentes hipótesis enunciadas.

#### **4.12. OTRAS APLICACIONES DEL MODELO ESFEROIDAL: ANALISIS DE LA PROPUESTA A QUIMIO Y RADIOTERAPIA**

Probablemente han sido los cultivos en monocapa el modelo más usado para el análisis experimental de los efectos producidos por la radiación ionizante y los citostáticos sobre las células tumorales. Sin embargo, es obvio que el tratamiento con estas dos modalidades terapéuticas de un tapiz monocelular no se corresponde con la realidad del tumor en donde las células se disponen en una estructura tridimensional. Las características propias de los esferoides MCF-7 los hacen, en cambio, un modelo particularmente adecuado para los ensayos en estudios de quimio y radiosensibilidad. En el presente trabajo se muestran los resultados de algunos de los experimentos llevados a cabo para verificar, de una parte, el efecto de la radiación ionizante sobre el crecimiento de los esferoides MCF-7 y, por otra parte, el efecto de los quimioterápicos adriamicina y metotrexate, escogidos de entre una serie de agentes fase y cicloespecíficos y previamente estudiados en

monocapa (GORGOJO, 1989), sobre los mismos. Las Figuras 44-46 muestran los resultados obtenidos en la estimación, a los tiempos indicados, del crecimiento de un grupo de esferoides MCF-7 escogidos de entre los que fueron tratados con MTX (Figura 44) y adriamicina (Figura 45) o quedaron expuestos a diferentes dosis de radiación ionizante (Figura 46).

Para proceder a la valoración del efecto de la radiación ionizante y/o agentes químicos diversos sobre el crecimiento de los esferoides se han propuesto diferentes métodos o técnicas experimentales entre los que destacan (NEDERMAN, 1984; SUTHERLAND, 1988): 1) cálculos sobre supervivencia de esferoides; 2) cálculos sobre supervivencia celular individual, tras disgregación del esferoide; 3) regresión y recrecimiento de los esferoides; 4) determinación del nivel de celularidad de los esferoides; 5) análisis de la distribución de los elementos celulares en las fases del ciclo mitótico y 6) recrecimiento de esferoides en monocapa.

De entre las distintas posibilidades, nosotros hemos optado por la evaluación de la regresión y recrecimiento de los esferoides debido a que, en principio, el método descrito parece adecuarse en mayor medida que los restantes a la evaluación de la cinética de proliferación perseguida en nuestro protocolo experimental. Para su realización práctica, una vez ensayado el agente terapéutico (la exposición a la radiación gamma de una unidad de teleterapia o el tratamiento durante una hora con la droga elegida), se pasa al cambio de



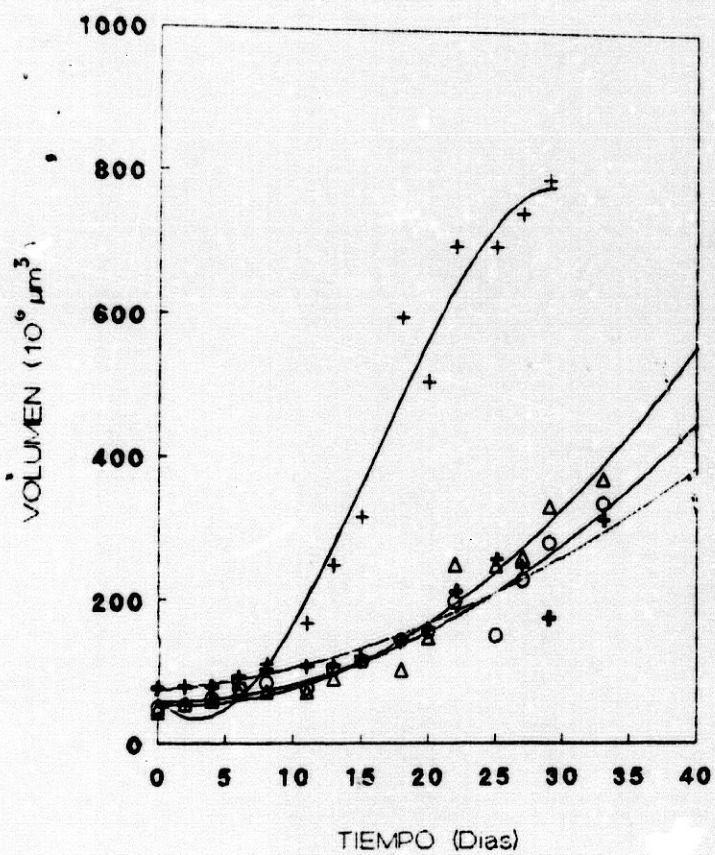


Figura 44. Crecimiento de los esferoides MCF-7 tratados con diferentes dosis de metotrexate. Se expresan las variaciones del volumen ( $\mu\text{m}^3 \cdot 10^6$ ), en función del tiempo (días), para 0,05 (+), 0.5 ( $\Delta$ ), 5 (o) y 50 ( $\oplus$ )  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de metotrexate, respectivamente.

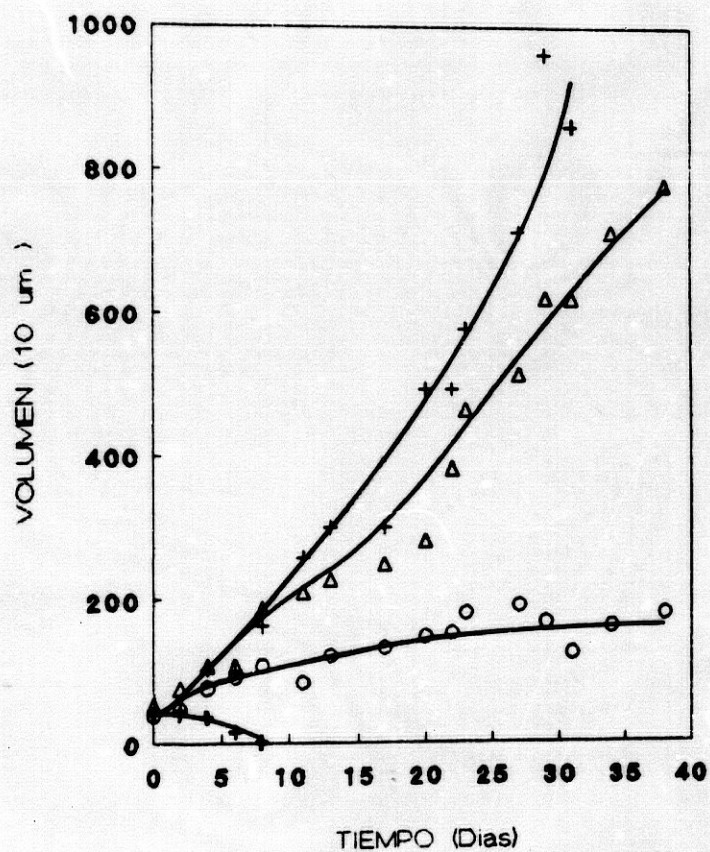


Figura 45. Crecimiento de los esferoides MCF-7 tratados con diferentes dosis de adriamicina. Se expresan las variaciones del volumen ( $\mu\text{m}^3 \cdot 10^6$ ), en función del tiempo (días), para 0,005 (+), 0.05 ( $\Delta$ ), 0.5 (o) y 5 (x)  $\mu\text{g/ml}$  de adriamicina, respectivamente.

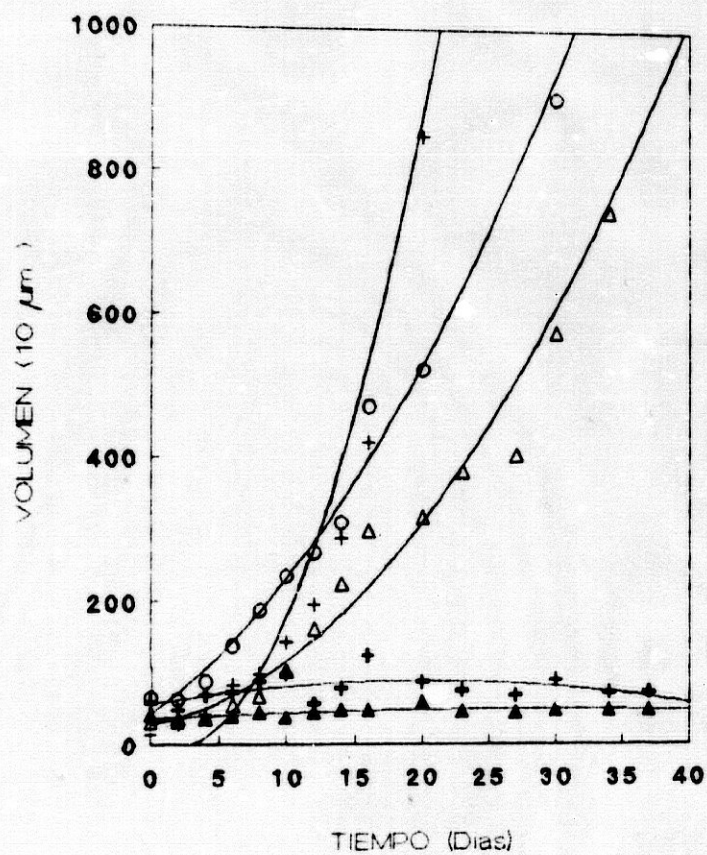


Figura 46. Crecimiento de los esferoides MCF-7 tratados con diferentes dosis de radiación ionizante. Se expresan las variaciones del volumen ( $\mu\text{m}^3 \cdot 10^6$ ), en función del tiempo (días), para 2 (+), 3 (o), 5 ( $\Delta$ ) 9 (+) y 12 ( $\blacktriangle$ ) Gy de dosis administrada, repectivamente.

medio y a la observación, durante tiempos prolongados (20-40 días), del crecimiento del esferoide tratado.

La técnica de evaluación de la regresión y recrecimiento de los esferoides elegida permite calcular con facilidad un parámetro de cinética frecuentemente utilizado para evaluar la respuesta terapéutica de tumores en animales de experimentación. Se trata del cálculo del "retraso en el crecimiento" (GD), fenómeno natural en la evolución de los esferoides que se ve incrementado por agentes que se oponen a la progresión tumoral y disminuido por aquellos agentes que favorecen el crecimiento tumoral. De una forma práctica, el retraso en el crecimiento deriva del tiempo que tarda el tumor en alcanzar un volumen doble del volumen original (BRUNNER, 1987), aunque se puede hacer una mejor aproximación con el cálculo del "retraso específico del crecimiento", mediante el cual al tiempo estimado para el retraso de un tumor dado se sustrae el retraso de los tumores no tratados y el resultado se divide por este mismo parámetro.

La Tabla 231 presenta los resultados de "GD" y del "retraso específico del crecimiento (SGD)" estimados para los esferoides MCF-7 tratados con diversas concentraciones de metotrexate, adriamicina y expuestos a diferentes dosis de radiación ionizante.

TABLA 231

Valor medio estimado para los parámetros "retraso del crecimiento" (GD) y "retraso específico del crecimiento" (SGD) para los esferoides MCF-7 tratados con los quimioterápicos metotrexate y adriamicina o expuestos a la radiación ionizante. Se expresan el valor medio y la desviación estándar.

	GD (Días)	SGD
<b>METOTREXATE</b>		
0,05 µg/ml	3,7±1,2	0,5
0,5 "	12,5±3,8	4,0
5 "	16,8±3,3	5,7
50 "	15,5±5,3	5,2
<b>ADRIAMICINA</b>		
0,005 µg/ml	3,4±0,9	0,4
0,05 "	6,0±1,9	1,4
0,5 "	9,6±4,7	2,8
<b>RADIACION IONIZANTE</b>		
2 Gy	2,5±0,6	0
3 "	5,8±2,9	1,3
6 "	9,0±2,4	2,6
9 "	24,2±12,6	8,7
12 "	>43	16,2

Por otra parte, la Figura 47 presenta los datos de crecimiento de los esferoides MCF-7 tratados, una vez efectuada la transformación de los datos de volumen, de tal manera que la representación gráfica deja ver claramente los incrementos en el tiempo de progresión de la población celular atribuidos a la terapia antitumoral.

Por lo que a la acción de los quimioterápicos se refiere, el primero de ellos, metotrexate, es un fármaco específico de fase o de clase I de Bruce (BRUCE, 1966), con capacidad para provocar, preferentemente, la muerte de los elementos celulares que se encuentran en la fase S de ciclo mitótico, cuando el tiempo de exposición es muy reducido (caso del presente trabajo en que los esferoides se exponen durante 1 hora al quimioterápico). En el ensayo realizado se ha podido comprobar que la inducción por el metotrexate de un cierto retraso en el crecimiento de los esferoides es un fenómeno dependiente de la concentración que alcanza pronto la saturación (máximo efecto a los cinco  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Estudios previos (NEDERMAN, 1981, 1984; WEST, 1984; KERR, 1988) han mostrado que el metotrexate, junto a otros agentes antitumorales, tiene una capacidad de penetración intraesferoide muy reducida. Ello podría explicar, no solamente nuestros resultados sino también la mayor sensibilidad de los elementos celulares MCF-7 cuando el cultivo se hace en monocapa.

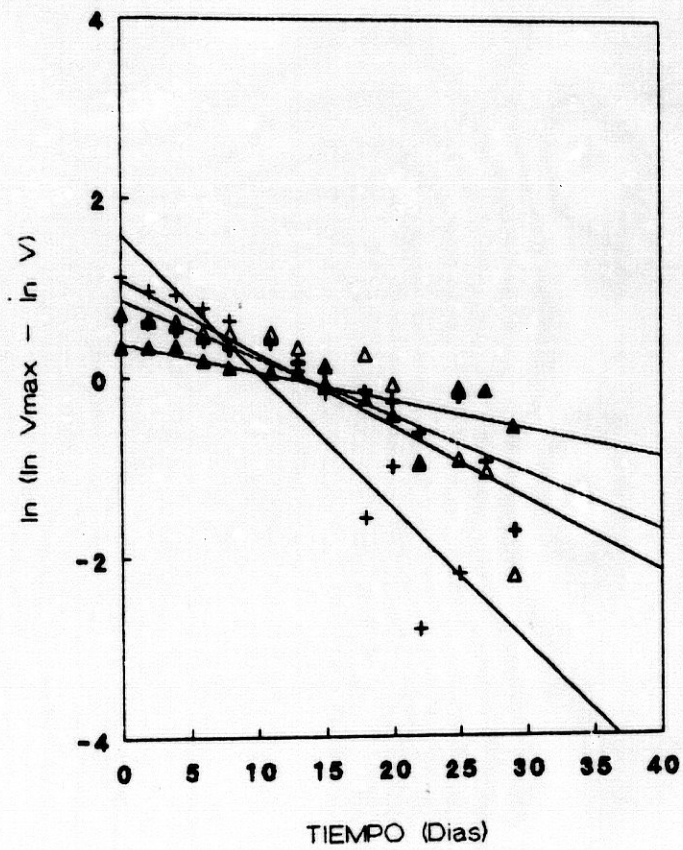


Figura 47. Retraso en el crecimiento de los esferoides MCF-7 tratados con diferentes concentraciones de metotrexate: 0.05 (+), 0.5 (Δ), 5 (⊕) y 50 (▲) µg/ml, respectivamente.

El otro agente antitumoral ensayado en este trabajo, la adriamicina, es un fármaco antineoplásico tipo III, esto es específico de los elementos celulares que se encuentran en estadios no quiescentes (BRUCE, 1966). Al igual que el metotrexate, la adriamicina es conocida por su dificultad de internalizarse en los esferoides de muy diferentes tipos celulares (SUTHERLAND, 1979; NEDERMAN, 1981; KERR, 1986), si bien ciertas modificaciones en la lipoafinidad de estas drogas pueden favorecer significativamente su poder de difusión (KERR, 1987). En las condiciones experimentales de nuestro trabajo, el retraso en el crecimiento de los esferoides MCF-7 originado por la Adriamicina, menor que el producido por el Metotrexate a iguales niveles de concentración, no parece estar sujeto a mecanismos saturantes dentro de los niveles de concentración utilizados, fenómeno que tampoco ha sido observado tras la exposición de los esferoides a la radiación ionizante. En este último supuesto, el retraso en el crecimiento se incrementa conforme lo hace la dosis en una relación regida por una ley exponencial.

Frente a los otros métodos empleados para evaluar el efecto de la quimio o radioterapia, la metodología presentada aquí presenta una limitación particular. Como ha quedado claramente expresado en apartados previos, los esferoides MCF-7 alcanzan en su crecimiento una fase de "plateau", independientemente del sometimiento o no a tratamiento con



agentes físicos o químicos, lo que puede en algunos casos hacer poco evidentes las diferencias entre esferoides tratados y no tratados (CARLSSON, 1989). Para obviar este inconveniente se debe recurrir, y de hecho ésta es la pauta elegida, a la selección de esferoides homogéneos en su tamaño inicial y en un fase de su crecimiento en que aún sea posible seguirlos durante un tiempo adecuado (>20 días).

## V. CONCLUSIONES

El análisis de los resultados obtenidos en el presente trabajo y su comparación con los datos existentes al respecto en la literatura nos han permitido formular, entre otras, las siguientes conclusiones:

1. En determinadas condiciones ambientales, células procedentes de tejidos tumorales humanos adaptadas al cultivo en monocapa (MCF-7) pueden crecer en suspensión formando unidades estructurales tridimensionales de forma esférica a las que se conoce con el nombre de "esferoides multicelulares".

2. Elementos determinantes para el desarrollo de los esferoides han sido en nuestra experiencia, los siguientes: a) la limitación de la adherencia celular al sistema de soporte de las suspensiones experimentales; b) la siembra de un número mínimo de células; c) la utilización para la siembra de pases celulares "antiguos"; d) la presencia de estrógenos en el medio de cultivo.

3. La acción positiva que ejercen los estrógenos sobre el desarrollo de los esferoides MCF-7 se manifiesta de tres maneras distintas: desarrollo estructural, cambios proliferativos y expresión del fenotipo RE (+) en los elementos formes integrantes del esferoide. Como los fenómenos anteriores ocurren para muy bajas

concentraciones de estrógeno puede presumirse que el mecanismo de la acción hormonal obedece, en este caso, a una ley todo o nada. En el conjunto de nuestras experiencias la única excepción a esta regla viene dada por la respuesta (concentración-dependiente) a los estrógenos de esferoides previamente sometidos a la acción de derivados antiestrogénicos.

4. Desde un punto de vista organizativo, morfológico y funcional, en el desarrollo de esferoides multicelulares MCF-7 se distinguen tres etapas claramente diferenciadas entre sí, definidas por las siguientes características:

- a) Fase inicial: diámetro medio 200  $\mu\text{m}$ , ausencia de necrosis central, actividad proliferativa y expresión fenotípica receptorial (+) homogéneas, fracción de crecimiento 50%;
- b) Fase intermedia: diámetro medio 400  $\mu\text{m}$ , necrosis central incipiente, actividad proliferativa y expresión fenotípica del receptor estrogénico circunscritas a los estratos celulares superficiales, fracción de crecimiento inferior al 50%;
- c) Fase final: diámetro máximo 300  $\mu\text{m}$ , necrosis central manifiesta, anillo de células viables de dimensiones precisas ( $\approx 160 \mu\text{m}$ ), actividad proliferativa y expresión fenotípica receptorial uniformes, fracción de crecimiento inferior al 30%.

5. Del conjunto de modelos matemáticos propuestos para el análisis de la cinética de crecimiento de los esferoides multicelulares, la Ecuación de Gompertz en primer lugar y la Ecuación de Bertalanffy en segundo término, predicen con notable exactitud los cambios de volumen que experimentan los esferoides MCF-7 en función del tiempo.

6. Parámetros de especial significación en la cinética de proliferación de los esferoides MCF-7, extraídos fundamentalmente del modelo matemático gompertziano, son los siguientes: a) el Tiempo de Duplicación de Volumen; b) el Volumen Máximo del esferoide; c) el Número Máximo de Duplicaciones o Ciclos Divisorios necesario para, una vez iniciada la agregación, alcanzar el citado volumen.

7. El conocimiento de los anteriores parámetros junto con la posibilidad de la determinación de las relaciones Contenido Celular/Volumen, en diferentes instantes de tiempo, transforman a los esferoides multicelulares MCF-7 en un instrumento precioso para los análisis de cinética tumoral con importantes derivaciones en el orden clínico.

8. El modelo de crecimiento esferoidal representado por los agregados multicelulares MCF-7 constituye, igualmente, un preparado experimental de considerable valor para el análisis de la respuesta a la radiación y/o a citostáticos diversos, en términos de supervivencia o retraso en el crecimiento, mediante el cual -como se ha demostrado en el curso de nuestra investigación- es posible establecer relaciones de orden cuantitativo entre Dosis de Radiación o Concentración de Citostático y Probabilidad de Control del crecimiento neoplásico tridimensional.

## VI. BIBLIOGRAFIA

- ACKER, H. 1984.  
Microenvironmental conditions in multicellular spheroids grown under liquid-overlay tissue culture conditions. En: Spheroids in Cancer Research. Methods and Perspectives. Acker, H., Carlsson, J., Durand, R y Sutherland, R.M. eds. Springer Verlag, Berlin Heidelberg. pp 116-133.
- AITKEN, S.C. Y LIPPMAN, M.E. 1982.  
Hormonal regulation of net DNA synthesis in MCF-7 breast cancer cells in tissue culture.  
Cancer Res. 42:1272-1277
- ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K. Y WATSON, J.D. 1988.  
Molecular Biology of the Cell. Garland Publications, New York, N.Y.
- ALLISON, D.C. YUHAS, J.M., RIDOLPHO, P.F., ANDERSON, S.L. Y HOHNSON, T.S. 1983.  
Cytophotometric measurements of the cellular DNA content of [<sup>3</sup>H]Thymidine-labelled spheroids.  
Cell Tissue Kinet. 16:237-246
- AMARA, J.F. Y DANNIES, P.S. 1983.  
17 $\beta$ -estradiol has a biphasic effect on GH cell growth.  
Endocrinology, 112:1141-1143
- ANDERSON, G., MIHICH, E., NISHIMURA, S., TERADA, M. Y SUGIMURA, T. 1989.  
Molecular aspects of growth control.  
Cancer Res. 49:6852-6866.
- APPELGREN, L., PETERSON, H.I. Y ROSENGREN, B. 1973.  
Vascular and extravascular spaces in two transplantable tumors of the rat.  
Bibl. Anat. 12:504-510.
- BAILEY, A.J., SLOANE, J.P., TRICKEY, B.S. Y ORMEROD, M.G. 1982.  
A immunocytochemical study of alpha-lactoalbumin in human breast tissue.  
J. Pathol. 137:13-23.
- BARD, J.B.L. 1978.  
A quantitative model of liver regeneration in the rat.  
J. Theor. Biol. 73:509-511



- BARNES, D. Y SATO, G. 1979.  
Growth of a human mammary tumour cell line in a serum-free medium. *Nature*, 281:5730-5731.
- BARNES, D. Y SATO, G. 1980.  
Serum-free cell culture: a unifying approach.  
*Cell*, 22:649-655
- BASERGA, R. 1985.  
The Regulation of Cell Multiplication,  
Harvard University Press, Cambridge, MA.
- BASERGA, R. 1986.  
The biology of cell Reproduction,  
Harvard University Press, Cambridge, MA.
- BAULIEU, E.E., WIRA, C.R., MILGROM, E. y RAYNAUD-JAMMET C. 1972.  
Ribonucleic acid synthesis and estradiol action in the uterus.  
En: *Karolinska Symposium on Research Methods in Reproductive Endocrinology*. Diczfalusy E. ed. V. Karolinska Institute, Stockholm, 396-444
- BAUER, K.D., KENG, P.C. Y SUTHERLAND, R.M. 1982.  
Isolation of quiescent cells from multicellular tumor spheroids using centrifugal elutriation.  
*Cancer Res.* 42: 72-78.
- BERTALANFFY, L. VON. 1960.  
Principles and theory of growth. En: "Fundamental aspects of normal and malignant growth". Nowinsky, W.W. (Eds.) Elsevier. Amsterdam. pp 137-259.
- BERTHOIS, Y., KATZENELLENBOGEN, J.A. Y KATZENELLENBOGEN, B.S. 1986.  
Phenol red in tissue culture media is a weak estrogen: implications concerning the study of estrogen-responsive cells in culture.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83:2496-2500.
- BERWALD, Y. y SACHS, L. 1963.  
In vitro cell transformation with chemical carcinogens.  
*Nature*, 200:1182
- BIGGERS, J.D., CLARINGBOLD, P.S. y HARDY, M.H. 1953.  
The action of estrogens on the vagina of the mouse in tissue culture.  
*J. Physiol.* 131:497-500

- BISSELL, M.J., HALL, H.G. y PARRY, G. 1982.  
How does the extracellular matrix direct gene expression.  
J.Theor.Biol.99:31-68.
- BOREK, C Y SACHS, L. 1966.  
In vitro cell transformation by X-irradiation.  
Nature 210:276.
- BRUCE, W.R., MEEKER, B.E., VALERIOTTE, F.A. 1966.  
Comparison of the sensitivity of normal hematopoietic and  
transplanted lymphoma colony-forming cells to chemotherapeutic  
agents administered in vivo.  
J. Natl. Cancer Inst. 37:233-235.
- BRUNNER, N., OSBORNE, C.K. Y SPANG-THOMSEN, M. 1987.  
Endocrine therapy of human breast cancer in nude mice.  
Breast Cancer Res. Treat., 10:229-242.
- BUSSOLATI, G., PICH, A. Y ALFANI, V. 1975.  
Immunofluorescence detection of casein in human mammary  
dysplastic and neoplastic tissue.  
Virchows Arc. Pathol. Anat. Histol. 365:15-21
- BUTLER, W.B., KELSEY, W.H. Y GORAN, N. 1981.  
Effects of serum and insulin on the sensitivity of the human  
breast cancer cell line MCF-7 to estrogens and antiestrogens.  
Cancer Res. 41:82-88.
- BUTLER, W.B., KIRKLAND, W.L., GARGALA, T.L., GORAN, N., KELSEY,  
W.H. Y BERLINSKI, P.J. 1983.  
Steroid stimulation of plasminogen activator production in human  
breast cancer cell line (MCF-7).  
Cancer Res. 43:1637-1641.
- CARLSSON, J. 1977.  
A proliferation gradient in three-dimensional colonies of  
cultured human glioma cells.  
Int. J. Cancer. 20:129-136.
- CARLSSON, J. Y NEDERMAN, T. 1989.  
Tumor spheroid technology in cancer therapy research.  
Eur. J. Cancer Clin. Oncol. 25:1127-1133.
- CARLSSON, J., NILSSON, K., WESTERMARK, B. PONTEN, J., SUNDSTROM,  
C., LARSSON, E., BERGH, J., PAHLMAN, S., BUSCH, C. Y COLLINS,  
V.P. 1983.  
Formation and growth of multicellular spheroid of human origin.  
Int. J. Cancer. 31:523-533

CARLSSON, J., STALNACKE, C.G., ACKER, H., HAJI-KARIM, M.,  
NILSSON, S. Y LARSSON, B. 1979.

The influence of oxygen on viability and proliferation in  
cellular spheroids.

Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., 5:2011-2020.

CASCIARI, J.J., SOTIRCHOS, S.V. Y SUTHERLAND, R. 1988.

Glucosa diffusivity in multicellular tumor spheroids.

Cancer Res. 48: 3905-3909.

1 CASEY, A.E. 1934.

The experimental alteration of malignancy with an homologous  
mammalian tumor material-I.

Am. J. Cancer 21:760-775.

CHARPIN, C., MARTIN, P-M., JACQUEMIER J., LAVAUT M.N., POURREAU-  
SCHEIDER, N. Y TOGA, M. 1986.

Estrogen receptor immunocytochemical assay (ER-ICA):  
computerized image analysis system, immunoelectron microscopy,  
and comparisons with estradiol binding assays in 115 breast  
carcinomas.

Cancer Res.(Suppl.) 46:4271s-4277s

CHOW, I Y POO, M.M. 1982.

Redistribution of cell surface receptors induced by cell-cell  
contact.

J. Cell Biol. 95:510-513.

CIDLOWSKI, J.A. Y CIDLOWSKI, N.B. 1982.

Glucocorticoid receptors and the cell cycle: evidence that  
accumulation of glucocorticoid receptors during S phase of the  
cell cycle is dependent on ribonucleic acid and protein  
synthesis. Endocrinology, 110:1653-1662.

CIDLOWSKI, J.A. Y MICHAELIS, G.A. 1977.

Alterations in glucocorticoid binding site number during the  
cell cycle in Hela cells.

Nature, 266:643-645.

CLAYTON, F., ORDONNEZ, N.G., HANSSEM, G.M. Y HANSSEN H. 1982.

Immunoperoxidase localization of lactalbumin in malignant breast  
neoplasms.

Arch. Pathol. Lab. Med., 106:268-275.

COLLINS, V.P., LOEFFLER, R.K. Y TIVEY, H. 1956.

Observations on growth rates of human tumors.

Am. J. Roentgenol. 76:988-1000

- CONGER, A.D. Y ZISKIN, M.C. 1983.  
Growth of mammalian multicellular tumor spheroid.  
Cancer Res. 43:556-560.
- CONGER, A.D., ZISKIN, M.C. Y WITTELS, H. 1981.  
Ultrasonic effect on mammalian multicellular tumor spheroids.  
JCU, 9:167-174.
- DARBRE, P.D. Y KING, R.J.B. 1987.  
Progression to steroid insensitivity can occur irrespective of  
the presence of functional steroid receptors.  
Cell, 51:521-528.
- DARBRE, P.D., YATES, J., CURTIS, S. Y KING, R.J.B 1983.  
Effect of estradiol on human breast cancer cell in culture.  
Cancer Res. 43:349-354.
- DARLING, J.L., OKTAR, N. Y THOMAS, D.G.T. 1983.  
Multicellular tumour spheroids derived from human brain tumours.  
Cell Biol. Int. Rep. 7:23-30.
- DARNELL, J., LODISH, H. Y BALTIMORE, D. 1988.  
Molecular Cell Biology.  
W.H. Freeman & Co. New York. N.Y.
- DARZYNKIEWICZ, Z., TRAGANOS, F., ADREEFF, M., SHARPLESS, T Y  
MELAMUD, M.R. 1979.  
Different sensitivity of chromatin to acid denaturation in  
quiescent and cycling cells as revealed by flow cytometry. J.  
Histochem.  
Cytochem. 27:478-488
- DeFESI, C.R., FELS, E.C. Y SURKS, M.I. 1982.  
Nuclear 3,5,3'-triiodothyronine receptor concentration increases  
during deoxyribonucleic acid synthesis in partially synchronized  
GC cell cultures.  
Endocrinology 111:1156-1163.
- DEMICHELI, R. 1980.  
Growth of testicular neoplasm lung metastases: Tumor-specific  
relation between two Gompertzian parameters.  
Eur. J. Cancer. 16:1603-1608.
- DEMICHELI, R., FORONI, R., INGROSSO, A., PRATESI, G., SORANZO,  
C. Y TORTORETO, M. 1989  
An exponential-gompertzian description of LoVo tumor growth from  
in vivo and in vitro data.  
Cancer Res. 49:6543-6546.

DePAUW-GILLET, M.C.; CHRISTANE, Y.M., FOIDART, J.M. Y BASSLEER, R.J. 1988.

Analysis of three dimensional mixed cultures of mouse B16 melanoma cells and 3T3 fibroblasts.  
Anticancer Res. 8:153-160.

DETINGER, H., GUICHARD, M., MALAISE, E.P. 1984.  
Relationship between intercellular communication and radiosensitivity of human tumor xenografts.  
Eur. J. Cancer Clin. Oncol. 20: 561-566.

DETINGER, H., HULSER, D. 1981.  
Increased radioresistance of cells in culture multicell spheroids. I. Dependence on cellular interaction.  
Radiat. Environ. Biophys. 19:101-107.

DEVLEESCHOUWER, N., OLEA, N., LECLERCQ, G., LEGROS, N. Y HEUSON, JC. 1986.  
Induction of progesterone receptor in an estrogen, progesterone receptor negative breast cancer cell line.  
J. Steroid. Biochem. 24:365-368.

DURAND, R.E. 1975.  
Isolation of cell subpopulations from in vitro tumor models according to sedimentation velocity.  
Cancer Res. 35:1295-1300

DURAND, R.E. 1976.  
Cell cycle kinetics in an in vitro tumour model.  
Cell Tissue Kinet. 9:403-411.

DURAND, R.E. 1978.  
Effects of hyperthermia on the cycling, noncycling, and hypoxic cells of irradiated and unirradiated multicell spheroids.  
Radiat. Res. 75:373-384.

DURAND, R.E. Y SUTHERLAND, R.M. 1972.  
Effects of intracellular contact on repair of radiation damage.  
Exp. Cell Research, 71:75-88

DURAND, R.E. Y SUTHERLAND, R.M. 1973.  
Dependence of the radiation response of an in vitro tumor model on cell cycle effects.  
Cancer Res., 33:213-222

EARLE, W.R. 1945.  
Production of malignancy in vitro. IV. The mouse fibroblast cultures and changes seen in living cells.  
J. Natl. Cancer Inst. 4:165-177

- EDWARDS, D.P., MURTHY, S.R., MCGUIRE, W.L. 1980.  
Effect of estrogen and antiestrogen on DNA polymerase in human breast cancer.  
Cancer Res. 40:1722-1730
- EMANUEL, N.M. Y EVSEENKO, L.S. 1973.  
Kinetics of tumor growth. En: "Clinical Oncology - A quantitative approach.  
Israel Program for Scientific Translations. Halsted Press. J. Willey ans Sons. New York. pp. 12-16
- ENDELMAN, G.M. 1983.  
Cell adhesion molecules.  
Science. 219:4540-4547.
- ENGEL, I.W. Y YOUNG, N.A. 1978.  
Human breast carcinoma cells in continous culture: A review.  
Cancer Res. 38:4327-4339.
- EPIFANOVA, O.I., 1986.  
Cell cycle controls in higher eukariotyc cells: resting state or a prolonged G1 period?.  
J. Theor. Biol. 120:467-477.
- EVANS, E.P., BURTENSCHAW, M.D., BROWN, B.B., HENNION, R. Y HARRIS, H. 1982.  
The analysis of malignancy by cell fusion. IX. Reexamination and clarification of the cytogenic problem.  
J. Cell Sci. 56:113-130.
- FEAUX DE LACROIX, W. Y LENNARTZ, K.J. 1981.  
Changes in the proliferation characteristics of a solid transplantable tumour of the mouse with time after transplantation.  
Cell Tissue Kinet. 14:135-144
- FLAXMAN, B.A., CHOPRA, C.P. Y HARPER, R.A. 1974.  
Analysis of hormone-independent development of the mouse vagina epithelium in organ culture.  
In vitro, 10:42-50
- FOLKMAN, J. Y HOCHBERG, M. 1973.  
Self-regulation of growth in three dimensions.  
J. Expetl. Med. 138: 745-753.
- FOLKMAN, J Y MOSCONA, A. 1978.  
Roll of cell shape in growth control.  
Nature 273:345-349.

FORTT, R.W., GIBBS, A.R., WILLIAMS, D., HANSEN, J. Y WILLIAMS, I. 1979.

The identification of casein in human breast cancer.  
Histopathology, 3:395-406.

FRESHNEY, R.I. 1983.

Culture of animal cells. A manual of basic technique.  
Alan R. Liss, Inc, New York.

FREYER, J.P. 1988.

Role of necrosis in regulating the growth saturation of multicellular spheroids.  
Cancer Res., 48:2432-2439.

FREYER, J.P., TUSTANOFF, E., FRONKO, A,J, Y SUTHERLAND, R,M. 1984. In situ oxygen consumption rates of cells in V-79 multicellular spheroids during growth.  
J. Cell Physiol. 118-53-61.

FREYER, J.P. Y SCHOR, P.L. 1989.

Automated selective dissociation of cells from different regions of multicellular spheroids.  
In vitro. 25:1-19.

FREYER, A.J. Y SUTHERLAND, R.M. 1980.

Selective dissociation and characterization of cells from different regions of multicell tumour spheroids.  
Cancer Res. 40:3956-3965

FREYER, J.P Y SUTHERLAND, R.M. 1986.

Proliferative and clonogenic heterogeneity of cells from EMT6/Ro multicellular spheroids induced by the glucose and oxygen supply. Cancer Res. 46:3513-3520.

FRIEND, S.H., BERNARDS, R., ROGELJ, S., WEINBERG, R.A., RAPAPORT, J.M., ALBERT, D.M. Y DRYJA, T.P.1986.

A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma.  
Nature, 323:643-645

GOLDIE, J.H. Y COLDMAN, A.J. 1979.

A mathematical model for relating the drug sensitivity of tumors to their spontaneous mutation rate.  
Cancer Treat. Rep. 63:1727-1773.

GOMPERTZ, B. 1825.

On the nature of the function expressive of the law of human mortality and on a new model of determining life contingencies.  
Philos. Trans. R. Soc. (Lond.), 115:513-585.

- GORGOJO, L., RUIZ DE ALMODOVAR, J.M., OLEA, N. Y PEDRAZA, V. 1988.  
Quimiosensibilidad de células de cáncer humano (MCF-7 y EVSA-T) cultivadas en monocapa.  
Rev. Farmacol. Clin. Exp. 5:321-329.
- GROSS, G.E., BOLDT, D.H. Y OSBORNE, C.K. 1984.  
Perturbation by insulin of human breast cancer cell cycle kinetics.  
Cancer Res. 44:3570-3575.
- GROVER, A., OSHIMA, R.G. Y ADAMSON, E.D. 1983.  
Epithelial layer formation in differentiating aggregates of F9 embryonal carcinoma cells.  
J. Cell Biol., 96:1690-1696.
- GUGUEN-GUILLOUZO, C., CLEMENT, B., BAFFET, G., BEAUMONT, C., MOREL-CHANY, E., GLAISE, D. Y GILLOUZO, A. 1983.  
Maintenance and reversibility of cathepsin secretion by adult rat hepatocytes co-cultured with another liver epithelial cell type.  
Exp. Cell. Res., 143:47-54.
- GULVE, E.A. Y DICE, J.D. 1989.  
Regulation of protein synthesis and degradation in L8 myotubes; effects of serum, insulin and insulin-like growth factors.  
Biochem. J. 260:377-387.
- HAJI-KARIM, M Y CARLSSON, J. 1978.  
Proliferation and viability in cellular spheroids of human origin. Cancer Res. 38:1457-1466
- HAM, R.G. Y MCKEEHAN, W.L. 1979.  
Media and growth requirements.  
Methods Enzymol. 58:44-93.
- HARRISON, F.L., CHESTERTON, C.J. 1980.  
Factors mediating cell-cell recognition and adhesion. Galaptins, a recently discovered class of bridging molecules.  
FEBS Lett. 122:157-165.
- HARTWELL, L.H. Y WEINERT, T.A. 1989.  
Checkpoints: Controls that ensure the order of cell cycle events.  
Science, 246:629-634.



- HERMENS, A.F. Y BARENSEN, G.W. 1967.  
Cellular proliferation patterns in a experimental  
rabdomyosarcoma in the rat.  
Eur. J. Cancer 3:361-369.
- HEWITT, H.B. 1953.  
Studies on the quantitative transplantation of mouse sarcoma.  
Br. J. Cancer. 7:367-383.
- HLATHY, L., SACHS, R.K. Y ALPEN, E.L. 1988.  
Joint oxygen-glucose deprivation as the cause of necrosis in a  
tumor analog.  
J. Cell. Physiol. 134:167-178.
- HORWITZ, K.B., ZAVA, D.T., THILAGRA, A.K., JENSEN, E.M. Y MCGUIRE,  
W.F. 1978.  
Steroid receptor analysis of nine human breast cancer cell  
lines.  
Cancer Res, 38:2434-2437.
- HSU, T.C. 1977.  
The future of animals, cells, models and systems in research  
development, education and testing.  
Natl. Acad. Sci. Washington, D.C.
- HULSER, D.F. Y BRUMMER, F. 1982.  
Crossing and opening of gap junction pores between two and  
three dimensionally cultured tumor cells.  
Biophys. Struct. Mech. 9:83-88.
- IKEDA, T., LIU, Q.F., DANIELPOUR, D. OFFICER, J.B., IIO, M.,  
LELAND, F.E. Y SIRBASKU D.A. 1982.  
Identification of estrogen-inducible growth factors  
(estromedins) for a rat an human mammary cells in culture.  
In vitro, 18:961-979.
- ILLERA MARTIN, M. 1989.  
Trabajar en experimentacion animal.  
Fundacion Universidad Empresa. Madrid
- INCH, W.R., MCCREDIE, J.A. Y SUTHERLAND, R.M. 1970.  
Growth of nucular carcinomas in rodents compared with multicell  
spheroids in tissue culture.  
Growth 34:271-282.
- INGLEBY, H. Y MOORE, L. 1956.  
Periodic roentgenographic studies of a growing mammary cancer.  
Cancer 143:1888-1894.

- ISAACS, J.T. 1986  
Genetic control of resistance to chemically induced mammary adenocarcinogenesis in rat.  
Cancer Res. 46:3958-3966
- JAIN, R.K. 1987.  
Transport of molecules in the tumor interstitium: a review.  
Cancer Res., 47:3039-3051.
- JAKESZ, R., SMITH, C.A., AITKEN, S., HUFF, K., SCHUETTE, W., SHACKNEY, S. Y LIPPMAN, M. 1984.  
Influence of cell proliferation and cell cycle phase on expression of estrogen receptor in MCF-7 breast cancer cells.  
Cancer Res. 44:619-625.
- JENSEN, E.V. Y JACOBSON, H.I. 1962.  
Basic guide to the mechanism of estrogen action.  
Rec. Prog. Horm. Res. 18:387-395
- JENSEN, E.V. Y DESOMBRE, E.R. 1973.  
Estrogen-receptor interaction. Estrogenic hormones effect transformation of specific receptor proteins to a biochemically functional form.  
Science, 182:126-130
- JOHNSON, T.S., BAIN, E., RAJU, M.R. Y MARTIN, J.C. 1980.  
Correlation of the growth of Chinese hamster spheroids with cytokinetic parameters.  
Cytometry, 1:65-77
- JONES, A.C., STRATFORD, I.J., WILSON, P.A., Y PECKHAM. 1982.  
In vitro cytotoxic drug sensitivity testing of human tumour xenografts grown as multicellular tumour spheroids.  
Br. J. Cancer 46: 870-877
- KAHN, R.H. 1954.  
Effect of estrogen and of vitamin A on vaginal cornification in tissue culture.  
Nature, 174: 317-322
- KATZENELLENBOGEN, B.S. 1980.  
Dynamics of steroid hormone receptor action.  
A. Rev. Physiol. 42:17-35.
- KERR, D.J., WHELDON, T.E., HYDES, S., KAYE, S.B. 1988.  
Cytotoxic drugs penetration studies in multicellular tumor spheroids.  
Xenobiotica, 18:641-648.

KERR, D.J., WHELDON, T.E., KERR, A.M., FRESHNEY, R.I., KAYE, S.B. 1986.

The effect of Adryamicin and 4'-deoxydoxorubicin on cell survival of human lung tumour cells grown in monolayer and as spheroids.

Br.J. Cancer, 54:423-429.

KERR, D.J., WHELDON, T.E., RUSSEL, J.G. 1987

The effect of non-ionic surfactant Brij 30 on the cytotoxicity of Adriamycin in monolayer spheroids and clonogenic culture systems.

Eur. J. Cancer Clin. Oncol, 23:1315:1322.

KING, W.J., DESOMBRE E.R., JENSEN, E.V. Y GREEN, G.L. 1985.

Comparison of immunocytochemical and steroid-binding assays for estrogen receptor in human breast tumors.

Cancer Res. 45: 293-304.

KING, W.J. Y GREENE, G.L. 1984.

Monoclonal antibodies localize estrogen receptor in the nuclei of target cells.

Nature, 307:745-747.

KNUDSON, Jr. A.G. 1985.

Hereditary cancer, oncogenes and antioncogenes.

Cancer Res. 45:1437-1444

KOBOYASHI, T. Y BAKAY, L. 1971.

The extracellular space in experimental brain tumors.

Acta Neurol. Scand. 47:307-314.

KOCH, A.L. 1975.

The kinetics of mycelial growth.

J. Gen. Microbiol. 89:209-216.

KOVNAT, A., BUICK, R.N. Y CHOO, B. 1988.

Malignant properties of sublines selected from a human bladder cell-line that contains an activated c-Ha-ras oncogene.

Cancer Res., 48:4993-5000.

LAIRD, A.K. 1964.

Dynamics of tumor-growth.

Br. J. Cancer, 18:490-502.

LAIRD, A.K. 1965.

Dynamics of tumor growth: Comparison of growth rates and extrapolation of growth curve to one cell.

Br. J. Cancer, 19:278-291.

- LANDRY, J. Y FREYER, J.P. 1984.  
Regulatory mechanisms in spheroidal aggregates of normal and cancerous cells.  
En: Spheroids in Cancer Research. Methods and Perspectives.  
Acker, H., Carlsson, J., Durand, R y Sutherland, R.M. eds.  
Springer Verlag, Berlin Heidelberg. pp. 95:51-66.
- LASKLY, R.A., FAIRMAN, M.P. Y BLOW, J.J. 1989.  
S phase of the cell cycle.  
Science, 246:609-614.
- LAW, L.W. 1952.  
Origin of the resistance of leukemia cells to folic acid antagonists.  
Nature, 169:628-629.
- LECHNER, J.F. Y MCKEEHAN, W.L. 1984.  
Symposium: control of cell growth by nutrients.  
Federation Proc. 43:107-139.
- LEES, R.K., SORDAT, B. Y MACDONALD, H.R. 1981.  
Multicellular tumor spheroid of human colon carcinoma origin.  
Exp. Cell. Biol. 49:207-219
- LIOTTA, L.A. 1984.  
Tumor invasion and metastases: role of the basement membrane.  
Am. J. Pathol. 117:339-347.
- LIPPMAN, M.E. Y BOLAN, G. 1975.  
Oestrogen-responsive human breast cancer in long term tissue culture.  
Nature, 256:592-593.
- LIPPMAN, M.E., DICKSON, R.B., BATES, S. et al. 1986.  
Autocrine and paracrine growth regulation of human breast cancer.  
Breast Cancer Res. Treat. 7:59-70.
- LIPPMAN, M.E., DICKSON, R.B., GELMANN, E.P., ROSEN, N., KNABEE, C., BATES, S., BRONZERT, D., HUFF, K. Y KASID, A. 1987.  
Growth regulation of human breast carcinoma occurs through regulated growth factor secretion.  
J. Cell. Biochem. 35:1-16.
- LOPEZ-GONZALEZ, J.D. DEL MORAL R., OLEA, N., RUIZ DE ALMODOVAR, J.M. Y PEDRAZA V. 1989.  
Cinética de proliferación y de liberación del antígeno polipeptídico tisular en células MCF-7. Influencia hormonal.  
Rev. Esp. Fisiol. 45:227-234.

LURIA, S. Y DELBRUCK, M. 1943.  
Mutations in bacteria from virus sensitive to virus resistance.  
Genetics, 28:491.

MALAN-SHIBLEY, L E IYPE, P.T. 1981.  
The influence of culture conditions on cell morphology and  
tyrosine aminotransferase levels in rat liver epithelial cell  
lines.  
Exp. Cell Res. 131:363-371.

MARTIN, L. 1980.  
Estrogens, antiestrogens and the regulation of cell  
proliferation in the female reproductive tract in vivo. En:  
Estrogens in the Environment. MacLachlan, J. Ed. Elsevier, North  
Holland, New York. 103-130.

MARX, J.L. 1987.  
Human trials of new cancer therapy begins.  
Science 236, 778-779.

MARX, J.L. 1988.  
Cell growth control takes balance.  
Science, 239:975-976

MAYNEORD, W.V. 1932.  
On a law of growth of Jensen's rat sarcoma.  
Am J. Cancer. 16:841-846.

MAYR, E. 1982.  
The growth of Biological Thought.  
Harvard University Press, Cambridge, MA.

MAZOUJIAN, G., PINKUS, G.S., DAVIS, S. Y HAAGENSEN, D.E. 1983.  
Immunohistochemistry of a gross cystic disease fluid protein  
(GCDFP 15) of the breast. A marker of apocrine epithelium and  
breast carcinomas with apocrine features.  
Am. J. Pathol. 110:105-112.

McALLISTER, R.M., REED, G. Y HUEBNER, R.J., 1967.  
Colonial growth in agar of cells derived from nonvirus-induced  
hamster tumours.  
J. Natl. Cancer 39:43-53.

MCCARTY, K.S., SZABO, E., FLOWERS, J.L. et al. 1986.  
Use of a monoclonal anti-estrogen receptor antibody in the  
immunohistochemical evaluation of human tumors.  
Cancer Res (Supl.) 46:4244-4248.

- MCCORMICK, J.J. Y MAHER, V.M. 1988.  
Towards an understanding of the malignant transformation of  
diploid human fibroblasts.  
Mutation Res. 199:273-291.
- MCCREDIE, J.A., INCH, W.R., KRUIV, J. Y WATSON, T.A. 1965.  
The rate of tumor growth in animals.  
Growth, 29:331-347.
- MECHLER, B.M., MCGINNIS, W., GEHRING, W.J. 1985.  
Molecular cloning of lethal (2) giant larvae, a recessive  
oncogene of *Drosophila melanogaster*.  
EMBA J. 4:1551-1555
- MENDELSON, M.L. 1962.  
Autoradiographic analysis of cell proliferation in spontaneous  
breast cancer C3H mouse. III. The growth fraction.  
J. Natl. Cancer Inst., 28:1015-1029.
- MILLER, M.A. y KATZENELLENBOGEN, B.S. 1983.  
Characterization and quantitation of antiestrogen binding sites  
in estrogen receptor positive and negative human breast cancer  
cell lines.  
Cancer Res. 43:3090-3096.
- MOLLER, U. KEIDING, N. Y ENGEL, F. 1982.  
Subclassification of cells in S phase in a partially  
synchronized cell system.  
Cell Tissue Kinet. 15:157-166
- MOORE, M.R. 1981.  
An insulin effect on cytoplasmic estrogen receptor in the human  
breast cancer cell line MCF-7.  
J. Biol. Chem. 256:3637-3640.
- MORAL, R. DEL, 1988.  
Aspectos clínicos y experimentales de la hormonodependencia  
tumoral en cáncer de mama.  
Tesis Doctoral. Universidad de Granada. pp 444.
- MORAL, R. DEL, RUIZ DE ALMODOVAR, J.M., FERNANDEZ, J. LOPEZ-  
GONZALEZ, J.D., OLEA, N. Y PEDRAZA, V. 1990.  
Relación entre actividad proliferativa celular y  
homonodependencia en la línea celular de cáncer mamario MCF-7.  
Rev. Esp. Fisiol. (en prensa).
- MUELLER, G.C., VONDERHAAR, B., KIM, U.H., LEMAHIEU, M. 1972.  
Estrogen action: an inroad to cell biology.  
Recent. Prog. Horm. Res. 28:1-22

- MUELLER-KLIESSER, W.F. 1987.  
Multicellular spheroids, a review on cellular aggregates in cancer research.  
J. Cancer Res. Clin. Oncol. 113:101-122.
- MUELLER-KLIESSER, W.F. Y SUTHERLAND, R.M. 1982.  
Influence of convection in the growth medium on oxygen tensions in multicellular tumor spheroids.  
Cancer Res. 42: 237-242.
- MULCAHY, R.T., ROSENKRANS, W.A., PENNEY, D.P. Y COOPER, R.A. 1985. The growth and morphology of FRTL-5 thyroid epithelial cells grown as multicellular spheroids in vitro.  
In vitro, 21:513-520.
- MURRAY, A.W. Y KIRSCHNER, M.W. 1989.  
Dominoes and clocks: the union of two views of the cell cycle.  
Science, 246:614-621.
- NEDERMAN, T., CARLSSON, J. Y MALMQVIST, M. 1981.  
Penetration of substances into tumor tissue -a methodological study on cellular spheroids. In Vitro 17:290-299
- NEDERMAN, T. NORLING, B., GLIMELIUS, B., CARLSSON, J. Y BRUNCK, B. 1984.  
Demonstration of an extracellular matrix in multicellular tumor spheroids.  
Cancer Res. 44:3090-3097
- NEDERMAN, T. Y TWENTYMAN, P. 1984.  
Spheroids for studies of drug effects. En: Spheroids in Cancer Research. Methods and Perspectives. Acker, H., Carlsson, J., Durand, R y Sutherland, R.M. eds. Springer Verlag, Berlin Heidelberg.85-101
- NEUFELD, D.S., RIPLEY, S., HENDERSON, A. Y OZER, H.L. 1987.  
Immortalization of human fibroblasts transformed by origin-defective simian virus 40.  
Mol. Cel. Biol. 7:2749-2802.
- NORTON, L. 1988.  
A gompertzian model of human breast cancer growth.  
Cancer Res. 48:7067-7071.
- NORTON, L. Y SIMON, R. 1977.  
Tumor size, sensitivity to therapy, and the design of cancer treatment.  
Cancer Treat. Rep. 61:1307-1317.

- NORTON, L. Y SIMON, R. 1986.  
The Norton-Simon hypothesis revisited.  
Cancer Treat. Rep. 70:163-169.
- NORTON, L. 1989.  
Correspondence re: Larry Norton, A gompertzian mode of human breast cancer growth.  
Cancer Res. 49:6443-6444
- O'FARRELL, P.H., EDGAR, B.A., LAKICH, D. Y LEHNER, C.F. 1989.  
Directing cell division during development.  
Science, 246:635-640.
- OLEA, N., VILLALOBOS, M., THOMAS, J., LOPEZ-GONZALEZ, J.D., RUIZ DE ALMODOVAR, J.M. Y V. PEDRAZA. 1987.  
Cinética de proliferación en cultivos celulares MCF-7. II. Sincronización y reclutamiento celular hormonalmente-inducidos.  
Rev. Esp. Fisiol. 43:215-222.
- OLEA, N., DEVLEESCHOUWER, N., LECLERCQ, G. Y HEUSON, J-C. 1985.  
Assay for estrogen and progesterone receptors of breast cancer cell lines in monolayer culture.  
Eur. J. Cancer Clin. Oncol. 21:965-973.
- OLEA, N., SAKABE, K., SOTO, A.M. Y SONNENSCHNEIN, C. 1990.  
The proliferative effect of "antiandrogen" on the androgen-sensitive human prostate tumor cell line LNCaP.  
Endocrinology, 126:1457-1463.
- O'MALLEY, B.W. Y MEANS, A.R. 1974.  
Female steroid hormones and target cell nuclei.  
Science, 183:610-615
- OSBORNE, C.K., BOLAN, G., MONACO, M.E. Y LIPPMAN, M.E. 1976.  
Hormone responsive human breast cancer in long-term tissue culture: effect of insulin.  
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 73:4536-4540.
- PARDEE, A.B. 1989.  
G<sub>1</sub> events and regulation of cell proliferation.  
Science, 246:603-608.
- PERTSCHUK, L.P., EISENBERG, K.B., CARTER, A.C. Y FELDMAN, J.G.  
Immunohistological localization of estrogen receptors in breast cancer with monoclonal antibodies.  
Cancer. 55:1513-1518.



- PIERCE, G.B. 1983.  
The cancer cells and its control by the embryo.  
A. J. Pathol. 113:117-125.
- PIERCE, G.B. 1967.  
Teratocarcinoma: model for a developmental concept of cancer.  
En: Current Topics in Developmental Biology. Moscona, A.A. y  
Monroy, A. eds. Academic Press. New York, 223-246.
- POURREAU-SCHNEIDER, N., MARTIN, P.M., CHARPIN, C., JACQUEMIER,  
J., SAEZ, S. Y NANDI, S. 1984a.  
How culture conditions modulate the morphofunctional  
differentiation of the estradiol-sensitive mammary cell line  
(MCF-7).  
J. Steroid Biochem. 20:407-415. 1984.
- POURREAU-SCHNEIDER, N., BERTHOIS, Y., MITTRE, H., CHARPIN, C.,  
JACQMIER, J. Y MARTIN, P.M. 1984b.  
Estrogen response of MCF-7 cells grown on diverse substrates and  
in suspension culture: promotion of morphological heterogeneity,  
modulation of progestin receptor induction: cell-substrate  
interactions on collagen gels.  
J. Steroid. Biochem. 21:763-771.
- PRESCOTT, D.M. 1976.  
Reproduction of Eukariotic Cells, Academic Press, New York, N.Y.
- PRINGLE, J.R. 1989.  
Cell multiplication: editorial review.  
Current Opinion in Cell Biology. 1:237-240.
- RATAFIA, M. 1989.  
Serum-free markets.  
Biotechnology. 7:574-575.
- RETSKY, M., SWARTZENDRUBER, D., WARDWELL, R., BAME, Y P. 1989.  
Correspondance re: Larry Norton. A gompertzian model of humar  
breast cancer growth.(Cancer Res. 48:7067-7071, 1988.)  
Cancer Res. 49:6443-6444.
- ROCKWELL, S.C., KALLMAN, R.F. Y FAJARDO, L.F. 1972.  
Characteristics of a serially transplanted mouse mammary tumor  
and its tissue-culture-adapted derivative.  
J. Natl. Cancer Inst. 49:735-749.
- ROFSTAD, E.K., WAHL, A., DAVIES, C.L. Y BRUSTAD, T. 1986.  
Growth characteristics of human melanoma multicellular spheroids  
in liquid-overlay culture: comparisons with the tumour  
xenografts. Cell Tissue Kinet. 19:205-216.

- ROSENSTRAUS, M.J., SPADORO, J.P. Y NILSSON, J. 1983.  
Cell position regulates endodermal differentiation in embryonal carcinoma aggregates.  
Dev. Biol., 98:110-117.
- RUBIN, H. 1985.  
Cancer as a dynamic development disorder.  
Cancer Res. 45:2935-2942.
- RUDDON, R.W. 1987.  
Cancer Biology.  
Oxford University Press, New York, N.Y.
- SACKS, P.G., MILLER, M.W. Y SUTHERLAND, R.M. 1981.  
Influences of growth conditions and cell-cell contact on responses of tumor cells to ultrasound.  
Radiat. Res. 87:175-186.
- SAGER, R. 1986  
Genetic suppression of tumor formation: A new frontier in cancer research.  
Cancer Res. 46:15-73 15-80.
- SCHAEETER, M. 1972.  
Biochemistry of Bacterial growth.  
Ed. Mandelstam, J. y Mckillen, K. Blackwell Scientific. Oxford.  
p 137.
- SCHUURMANS, A.L.G., BOLT, J. Y MULDER, E. 1988.  
Androgen receptor-mediated growth and epidermal growth factor receptor induction in the human prostate cell line LNCaP.  
Urol. Int. 44:71-76.
- SCHWARTZ, M. 1961.  
A biomathematical approach to clinical tumor growth.  
Cancer, 14:1272-1294.
- SHAIN, S.A. Y HUOT, R.I. 1987.  
Proliferation of AXC/SSh rat prostate cancer cells in vitro is androgen modulated.  
J. Steroid Biochem. 27:1-3.
- SIMPSON-HERREN, L. Y LLOYD, H.H. 1970.  
Kinetic parameter and growth curves for experimental tumor systems.  
Cancer Chemother. Rep. 54:143-174.

- SIRBASKU, D.A. 1978.  
Estrogen induction of growth factors specific for hormone-responsive mammary, pituitary and kidney tumor cells.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 75:3786-3792
- SKINNER, M.A., SWAIN, M., SIMMONS, R., MCCARTHY, K.S., SULLIVAN, D.C. E IGLEHART, J.D. 1988.  
Nonpalpable breast lesions at biopsy: a detailed analysis of radiographic features.  
Ann. Surg. 208:203-208.
- SKIPPER, H.E. 1987.  
Comparison of the response of MAM 16/C tumors in mice and breast cancer in women to the same three-drug combination (CAF), using the same dose intensity unit and the same normalization standard. Souther Res. Inst. Booklet 14:79-81.
- SKIPPER, H. Y SCHABEL, F. 1982.  
Quantitative and cytokinetic studies in experimental tumor systems.  
En: Cancer Medicine, Holland, J.F. y Frei, E. eds. Lea and Febiger. Philadelphia. pp 636-648.
- SKIPPER, H., SCHABEL, F. Y LLOYD, H. 1979.  
Dose-response and tumor cell repopulation rate in chemotherapeutic trials.  
Adv. Cancer Chemother. 1:205-253.
- SKUSE, G.R. Y ROWLEY, P.T. 1989.  
Tumor supressor genes and inherited predisposition to malignancy.  
Seminars Oncol. 16:128-137.
- SONNENSCHN, C., OLEA, N., PASANEN, M.E. Y SOTO, A.M. 1989.  
Negative controls od cell proliferation: Human prostate cancer cells and androgens.  
Cancer Res. 49:3474-3481.
- SONNENSCHN, C. Y SOTO, A.M. 1980  
... But, are estrogens per se growth promoting hormones?.  
J. Natl Cancer Inst. 64: 211-215
- SONNENSCHN, C. Y SOTO, A.M. 1981.  
Cell multiplications in metazoans: evidence for negative control of initiation in rat fibroblasts.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78:3702-3705.

SONNENSCHNEIN, C. Y SOTO, A.M. 1987.  
An overview on cell multiplication- Positive or negative  
Control?. In Biological activities of Alpha-Fetoprotein. Ed  
Mizejewski, G.J. y Jacobson, H.I. CRC Press Inc. Boca Raton, FL.

SOTO, A.M. Y SONNENSCHNEIN, C. 1985.  
The role of estrogens on the proliferation of human breast tumor  
cells (MCF-7).  
J. Steroid. Biochem. 23:87-94.

SOTO, A.M. Y SONNENSCHNEIN, C. 1987.  
Control of cell proliferation in estrogen sensitive cells: the  
case for negative controls.  
Endocrine Rev. 8:44-52.

SOTO, A.M., MURAI, J.T., SIITERI, P.K. Y SONNENSCHNEIN, C. 1986.  
Control of cell proliferation: evidence for negative control on  
estrogen-sensitive t47D human breast cancer cells.  
Cancer Res. 46:2271-2275.

SOULE, H.D., VAZQUEZ, J., LONG, A., ALBERT, S. Y BRENNAN, M.  
1973. A human cell line from a pleural effusion derived from a  
breast carcinoma.  
J. Natl. Cancer Inst. 51: 1409-1416.

SPANG-THOMSEN, M Y VINDELLOV, L. 1984.  
Proliferation kinetics of a human malignant melanoma serially  
grown in nude mice.  
Cell Tissue Kinet. 17:401-411

SPEER, J.F., PETROVSKY, V.E., RETSKY, M.W. Y WARDWELL, R.H.  
1984. A stochastic numerical model of breast cancer that  
simulates clinical data.  
Cancer Res., 44:4124-4130.

STEEL, G.G. 1977.  
Growth rate of tumors.  
En : "Growth kinetics of tumors". Oxford University Press.  
Oxford. Inglaterra. pp. 5-55.

STEEL, G.G., COUTERNAY, V.C. Y BECKHAM, M.J. 1983.  
The response to chemotherapy of a variety of human tumour  
xenografts.  
Br. J. Cancer 47:1-13.

STORMSHACK, F., LEAKE, R. WEITZ, N. Y GORSKI, J. 1976.  
Stimulatory and inhibitory effects of estrogens on uterine DNA  
synthesis.  
Endocrinology, 99:1501-1510.

SULLIVAN, P.W. Y SALMON, S.E. 1972.  
Kinetics of tumor growth and regression in IgG multiple myeloma.  
J. Clin. Invest. 51:1697-1708.

SUTHERLAND, R.L., GREEN, M.D., HALL, R.E., REDDEL, R.R. Y TAYLOR, I.W. 1983b  
Tamoxifen induces accumulation of MCF-7 human mammary carcinoma cells in the G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase of the cell cycle.  
Eur. J. Cancer Clin. Oncol. 19:615-621.

SUTHERLAND, R.L. HALL, R.E. Y TAYLOR, I.A. 1983a  
Cell proliferation kinetics of MCF-7 human mammary carcinoma cells in culture and effects of tamoxifen on exponentially growing and plateau-phase cells.  
Cancer Res. 43:3998-4006.

SUTHERLAND, R.L. WATTS, C.K.W. Y CLARKE, C.L. 1988.  
Oestrogen actions. En: Hormones and their actions. Part I.  
Cooke, B.A., King, R.J.B. y Van der Molen, H.J. eds. Elsevier Science Publishers B.V. 197-214.

SUTHERLAND, R.M. 1986.  
Importance of critical metabolites and cellular interactions the biology of microregions of tumors.  
Cancer, 58:1668:1680.

SUTHERLAND, R.M. 1988.  
Cell and environment interactions in tumor microregions: the multicell spheroid model.  
Science 240: 177-184

SUTHERLAND, R.M., BUCHEGGER, F., SCHREYER, M., VACCA, A. Y MACH J-P. 1987.  
Penetration and binding of radiolabeled anti-carcinoembryonic antigen monoclonal antibodies and their antigen binding fragments in human colon multicellular tumor spheroids.  
Cancer Res. 47:1627-1633.

SUTHERLAND, R.M., CARLSSON, J., DURAND, R. Y YUHAS, J. 1981.  
Spheroids in cancer research.  
Cancer Res. 41: 2980-2984.

SUTHERLAND, R.M. Y DURAND, R.E. 1973.  
Hypoxic cells in an in vitro tumour model.  
Int. J. Radiat. Biol. 23: 235-246.

- SUTHERLAND, R.M. Y DURAND, R.E. 1976.  
Radiation response of multicell spheroid -an in vitro tumour model.  
Curr. Top. Rad. Res. Quart. 11:87-139.
- SUTHERLAND, R.M. Y DURAND, R.E. 1984.  
Growth and cellular characteristics of multicell spheroids.  
En: "Spheroids in Cancer Research. Methods and Perspectives".  
Acker, H., Carlsson, J., Durand, R y Sutherland, R.M. (eds).  
Springer Verlag, Berlin Heidelberg. pp 24-49.
- SUTHERLAND, R.M., EDDY, H.A., BAREHAM, B., REICH, K., VANATWERP, D., 1979.  
Resistance to Adryamicin in multicellular spheroids.  
Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 5:1225-1230.
- SUTHERLAND, R.M., INCH, W.R., MCCREDIE, J.A. Y KRUUV, J. 1970.  
A multi-component radiation survival curve using an in vitro tumour model.  
Int. J. Radiat. Biol. 18. 491-499
- SUTHERLAND, R.M., MCCREDIE, J.A. E INCH, W.R. 1971.  
Growth of multicell spheroids in tissue culture as a model of nodular carcinomas  
J. Natl Cancer. Inst. 46:113-120
- SUTHERLAND, R.M., SORDART, B., BARNAT, I., GABBERT, H., BOURRAT, B. Y MUELLER-KLIESER, W. 1986.  
Oxygenation and differentiation in multicellular spheroids of human colon carcinoma.  
Cancer Res. 46:5320-5329
- SWAN, G.W. 1977.  
Tumor cell populations dynamics.  
In: Some current mathematical topics in cencer research. Sponsor series. University Microfilms International. Ann Arbor. Michigan. pp 1-8.
- SWAN, G.W. Y VINCENT, T.L. 1977.  
Optimal control analysis in the chemotherapy of IgG multiple myeloma.  
Bull. Math. Biol. 39:317-337.
- SWEIGERT, S.E. Y ALPEN, E.L. 1986.  
Dynamics of cell kinetic parameters during 9L spheroid growth.  
Cell Tissue Kinet. 19:567-576.

TANNOCK, I.F. 1968.

The relation between cell proliferation and the vascular system in a transplanted mouse mammary tumour.  
Br. J. Cancer 22:258-273.

TAYLOR, C.M., BLANCHARD, B. Y ZAVA, D.T. 1984.

A simple method to determine whole cell uptake of radio labelled oestrogen and progesterone and their subcellular localization in breast cancer cell lines in monolayer culture.  
J. Steroid. Biochem. 20:1083-1088

TOFT, D. Y GORSKI, J. 1966.

A receptor molecule for estrogen, isolation from rat uterus and preliminary characterization.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 55:1574-1577

TWENTYMAN, P.R. 1983.

Exclusion of host cells during spheroid formation from disaggregated solid tumours.  
Br. J. Cancer. 47:541-544

UMBREIT, J. Y ROSEMAN, S. 1975.

A requirement for reversible binding between aggregating embryonic cells before adhesion.  
J. Biol. Chem. 250:9360-9368.

URUSHIHARA, H. Y TAKEICHI, M. 1980.

Cell-cell adhesion molecules: identification of a glycoprotein relevant to the  $Ca^{2+}$ -independent aggregation of chinese hamster fibroblasts.  
Cell, 20:363-371.

VAIDYA, V.G. Y ALEXANDRO, F.J. 1982.

Evaluation of some mathematical models for tumor growth.  
Int. J. Bio-Medical Computing. 13:19-35.

VAUPEL, P., KALLINOWSKI, F. Y OKUNIEFF, P. 1989.

Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: A review.  
Cancer Res., 49:6449-6465.

VILLALOBOS, M., OLEA, N., GORGOJO, L., LOPEZ-GONZALEZ, J.D., RUIZ DE ALMODOVAR, J.M. Y V. PEDRAZA. 1987.

Cinética de proliferación en cultivos celulares MCF-7. I. Influencia relativa de los estrógenos y antiestrógenos sobre el crecimiento de la población celular.  
Rev. Esp. Fisiol. 43:209-214.

- VOGT, M.Y. DULBECCO, R. 1960.  
Virus-cell interaction with a tumor-producing virus.  
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 46:365-377.
- WALKER, R.A. 1978.  
The demonstration of alpha-lactalbumin in human breast carcinomas.  
J. Pathol. 129:37-42.
- WALKER, R.A. 1980.  
Demonstration of carcino-embryonic antigen in human breast carcinomas by the immunoperoxidase technique.  
J. Clin. Pathol. 33:356-361.
- WALKER, R.A., MURRAY, T., HILDITCH, T.E. et al. 1988.  
A tumor spheroid model for antibody-targeted therapy of micrometastasis.  
Br. J. Cancer, 58:13-16.
- WATSON, J.V. 1976.  
The cell proliferation kinetics of the EMT6/M/AC mouse tumour at four volumes during unperturbed growth in vivo.  
Cell Tissue Kinet. 9:147-155
- WELSHONS, W.V., LIEBERMAN, M.E. Y GORSKI, J. 1984.  
Nuclear localization of unoccupied oestrogen receptors.  
Nature, 307:747-749.
- WEST, G.W., WEICHSELBAUM, R., LITTLE, J.B. 1980.  
Limited penetration of methotrexate into human osteosarcoma spheroids as a proposed model of solid tumor resistance to adjuvant chemotherapy.  
Cancer Res. 40:3665-3668.
- WEST, C.M.L., SHANDU, R.R. Y STRATFORD, I.J. 1984.  
The radiation response of V79 and human tumour multicellular spheroids -cell survival and growth delay studies.  
Br. J. Cancer 50:143-155
- WIBE, E., BERG, J.P., TVEIT, K.M., NESLAND, J.M. Y LUNDE, S. 1984.  
Multicellular spheroids grown directly from human tumour material.  
Int. J. Cancer, 34:21-33.
- WIDDOWSON, E.M. 1988.  
Nutrition and cell organ growth. In Modern Nutrition in Health and Disease.  
Ed Shils, M.E. y Young, V.R. Lea & Fibiger, Philadelphia, PN, pp. 617-629.



WIGLE, J.C., SACKS, P.G. KENG, P.C. Y SUTHERLAND, R.M. 1983.  
Evaluation of the effect on intracellular contact on the  
response to hyperthermia and ultrasound.  
Abstracts 2nd International Spheroid Congress. Dortmund, 160:27.

WIKE-HOOLEY, J.L., HAVEMAN, J Y REINHOLD, H.S. 1984.  
The relevance of tumour pH to the treatment of malignant  
disease. Radiother. Oncol. 2:343-366.

WURSTER, K., HEBERLING, D. Y RAPP, W. 1980.  
Carcinoembryonic antigen (CEA) and lactoferrin (LF) in benign  
and malignant disease of the breast. A contribution to the  
immunohistochemical demonstration of marker substances.  
Geburtsh. Frauenheilkd, 40:412-420.

YOSHIDA, C. Y TAKEICHI, M. 1982.  
Teratocarcinoma cell adhesion: identification of a cell-surface  
protein involved in calcium-dependent cell aggregation.  
Cell, 28:217-224.

YUHAS, J.M. Y LI, A.P. 1978.  
Growth fraction as the major determinant of multicellular tumor  
spheroid growth rates.  
Cancer Res. 38:1528-1532.

YUHAS, J.M., LI, A.P., MARTINEZ, A.O. Y LADMAN, A.J. 1977.  
A simplified method for production and growth of multicellular  
tumor spheroids (MTS).  
Cancer Res. 3639-3643.

YUHAS, J.M., TARLENTON, A.E., MOLZEN, K.B. 1978.  
Multicellular tumor spheroids formation by breast cancer cells  
isolated from different sites.  
Cancer Res. 38:2486-2491.

VII. ANEXO

```

1 DIM H$(30,3):DIM H$(30,13):DIM L$(30,13):DIM A$(50)
5 CLS
10 COLOR 15:LOCATE 5,30:PRINT"MENU PRINCIPAL":COLOR 7
20 LOCATE 8,17:PRINT"1. INTRODUCCION DE DATOS"
30 LOCATE 10,17:PRINT"2. MODIFICACION O ADICION DE DATOS"
40 LOCATE 12,17:PRINT"3. PROCESAMIENTO DE DATOS"
50 LOCATE 14,17:PRINT"4. REPRESENTACIONES GRAFICAS"
55 LOCATE 16,17:PRINT"5. LISTADOS"
60 LOCATE 18,17:PRINT"6. SALIDA AL SISTEMA"
65 LOCATE 22,10:PRINT"Pulsa la opción deseada":M$=INKEY$
70 M=VAL(M$)
80 IF M$="" THEN GOTO 65
85 IF M<1 OR M>6 THEN GOTO 65
90 ON M GOTO 500,5000,10000,17000,20000,25000
300 FOR AJ=1 TO 30
310 PRINT#1,"0"
320 NEXT AJ
330 RETURN
500 CLS
505 COLOR 15:LOCATE 1,30:PRINT "INTRODUCCION DE DATOS":COLOR 7
510 LOCATE 3,5:PRINT"TABLA NUMERO: ____":LOCATE 3,19:INPUT "",N$:N=VAL(N$)
512 IF N=0 THEN GOTO 510
515 GOSUB 4900
517 LOCATE 3,25:PRINT"NOMBRE: _____":LOCATE 3
,33:INPUT"",NM$:GOSUB 4965:GOSUB 520:GOTO 540
520 LOCATE 5,3:PRINT "DATO":LOCATE 5,20:PRINT"a":LOCATE 5,35:PRINT"b":LOCATE 5,5
0:PRINT"t"
530 LOCATE 6,2:PRINT"____":LOCATE 6,15:PRINT"____":LOCATE 6,30:PRINT"__
____":LOCATE 6,45:PRINT"____"
535 LOCATE 23,1:PRINT"PULSA F PARA TERMINAR":RETURN
540 OPEN "O",1,"T"+N$
550 J=6:R=-6
551 J=J+1:IF J=22 THEN CLS:J=7:R=9:LOCATE 3,5:PRINT"TABLA NUMERO: ";N:LOCATE 3,2
5:PRINT"NOMBRE: ";NM$:GOSUB 520
560 LOCATE J,4:PRINT J+R
580 LOCATE J,20:INPUT"",A$
590 IF A$="F" OR A$="E" THEN PRINT#1,"F":GOSUB 300:CLOSE 1:CLS:GOTO 4500
600 LOCATE J,35:INPUT"",B$
605 IF VAL(B$)<VAL(A$) THEN C$=A$:A$=B$:B$=C$
610 PRINT#1,A$
620 PRINT#1,B$
630 LOCATE J,50:INPUT"",TI$
640 PRINT#1,TI$
650 GOTO 551
4500 LOCATE 3,10:PRINT"DESEA INTRODUCIR MAS DATOS? S/N ":A$=INKEY$
4510 IF A$="S" THEN GOTO 500
4520 IF A$<>"N" THEN GOTO 4500
4530 GOTO 5
4900 OPEN"R",#2,"TABLAS",40
4910 FIELD#2,40 AS NN$
4915 GET#2,NN$=NN$
4920 IF NN$<>"_____ " THEN PRINT "ESTA TABLA Y
A EXISTE, DESEAS VOLVER AL MENU? S/N":GOTO 4930

```

```

4925 RETURN
4930 A$=INKEY$:IF A$="" THEN GOTO 4930
4940 IF A$="S" OR A$="s" THEN CLOSE 2:GOTO 5
4950 IF A$<>"N" AND A$<>"n" THEN GOTO 4930
4960 CLOSE 2:GOTO 500
4965 NM$=NM$+"*"
4966 LSET NN$=NM$
4970 PUT#2,N:CLOSE 2
4990 RETURN
5000 CLS
5010 COLOR 15:LOCATE 5,25:PRINT"MENU DE MODIFICACIONES":COLOR 7
5020 LOCATE 9,17:PRINT"1. MODIFICACION DEL NOMBRE DE LA TABLA"
5030 LOCATE 12,17:PRINT"2. MODIFICACION DE DATOS DE UNA TABLA"
5040 LOCATE 15,17:PRINT"3. ADICION DE DATOS A UNA TABLA"
5045 LOCATE 18,17:PRINT"4. VOLVER AL MENU PRINCIPAL"
5050 LOCATE 22,10:PRINT"Pulsa la opcion deseada ":M$=INKEY$
5060 M=VAL(M$)
5070 IF M$="" THEN GOTO 5050
5080 IF M<1 OR M>4 THEN GOTO 5050
5090 ON M GOTO 5100,6000,7000,8000
5100 CLS
5110 LOCATE 5,1:PRINT"TABLA NUMERO: _____":LOCATE 5,15:INPUT"",N$:N=VAL(N$)
5120 IF N=0 THEN GOTO 5000
5130 OPEN"R",82,"TABLAS",40
5140 FIELD#2,40 AS NN$
5150 GET#2,N:NM$=NN$
5160 IF NM$="_____ " THEN PRINT "ESTA TABLA NO
EXISTE, DESEAS VOLVER AL MENU? S/N":GOTO 5170
5169 GOTO 5201
5170 A$=INKEY$:IF A$="" THEN GOTO 5170
5180 IF A$="S" THEN CLOSE 2:GOTO 5000
5190 IF A$<>"N" THEN GOTO 5170
5200 CLOSE 2:GOTO 5100
5201 FOR X=1 TO LEN(NM$)
5202 IF MID$(NM$,X,1)="*" OR MID$(NM$,X,1)="&" THEN P$=MID$(NM$,X,1):NM$=LEFT$(N
M$,X-1):GOTO 5210
5203 NEXT X
5210 LOCATE 5,21:PRINT"NOMBRE: ";NM$
5220 LOCATE 10,10:PRINT"NUEVO NOMBRE: _____":
LOCATE 10,24:INPUT"",NM$:IF NM$="" THEN CLOSE 2:GOTO 5000
5225 NM$=NM$+P$
5230 LSET NN$=NM$
5240 PUT#2,N:CLOSE 2
5250 GOTO 5000
6000 CLS
6010 PRINT "TABLA NUMERO: _____":LOCATE 1,15:INPUT"",N$:N=VAL(N$)
6020 IF N=0 THEN PRINT"ESTA TABLA NO EXISTE, DESEAS VOLVER AL MENU? S/N":GOTO 60
25
6022 GOSUB 7030
6023 GOTO 6070
6025 A$=INKEY$:IF A$="" THEN GOTO 6025
6030 IF A$="S" THEN GOTO 5000
6040 IF A$<>"N" THEN GOTO 6025

```

```

6050 GOTO 6000
6070 OPEN "I",1,"T"+N$
6075 FOR X=1 TO 30
6080 INPUT#1,A$
6085 IF A$="F" THEN GOTO 6130
6090 INPUT#1,B$
6100 INPUT#1,TI$
6110 H$(X,1)=A$:H$(X,2)=B$:H$(X,3)=TI$
6120 NEXT X
6130 CLOSE 1
6140 LOCATE 3,1:PRINT"DATO":LOCATE 3,9:PRINT "a":LOCATE 3,15:PRINT "b":LOCATE 3,
21:PRINT "c"
6150 LOCATE 4,1:PRINT" _____"
6160 FOR Y=1 TO X-1
6165 IF Y<10 THEN LOCATE Y+4,3:GOTO 6170
6166 LOCATE Y+4,2:GOTO 6170
6170 PRINT Y:LOCATE Y+4,11-LEN(H$(Y,1)):PRINT H$(Y,1):LOCATE Y+4,17-LEN(H$(Y,2))
:PRINT H$(Y,2):LOCATE Y+4,23-LEN(H$(Y,3)):PRINT H$(Y,3)
6180 NEXT Y
6190 LOCATE 3,30:PRINT "CUANTOS DATOS VAS A MODIFICAR?: ____":LOCATE 3,62:INPUT
"",MD$:MD=VAL(MD$):IF MD=0 THEN GOTO 5000
6195 FOR X=1 TO MD
6200 LOCATE 5,30:PRINT "NUMERO DE DATO: ____":LOCATE 5,46:INPUT"",Z$:Z=VAL(Z$):IF
Z=0 OR Z>Y THEN GOTO 6200
6210 LOCATE 7,30:PRINT"MODIFICACION DE a/b/t: _":LOCATE 7,53:INPUT"",ZI$:IF ZI$<
>"A"AND ZI$<"a"AND ZI$<"b"AND ZI$<"B"AND ZI$<"t"AND ZI$<"T"THEN GOTO 6210
6220 LOCATE 9,30:PRINT "NUEVO ";ZI$;": ____":LOCATE 9,39:INPUT"",NV$
6230 IF ZI$="a" OR ZI$="A" THEN H$(Z,1)=NV$
6240 IF ZI$="b" OR ZI$="B" THEN H$(Z,2)=NV$
6250 IF ZI$="t" OR ZI$="T" THEN H$(Z,3)=NV$
6260 NEXT X
6270 OPEN"O",1,"T"+N$
6280 FOR X=1 TO Y-1
6290 PRINT#1,H$(X,1)
6300 PRINT#1,H$(X,2)
6310 PRINT#1,H$(X,3)
6320 NEXT X
6330 PRINT#1,"F"
6340 GOSUB 300:CLOSE 1
6350 GOTO 5000
7000 CLS
7010 LOCATE 1,1:PRINT"TABLA NUMERO: ____":LOCATE 1,15:INPUT"",N$
7020 N=VAL(N$):IF N=0 THEN GOTO 7010
7025 GOSUB 7030
7027 GOTO 7120
7030 OPEN"R",#2,"TABLAS",40
7040 FIELDS#2,40 AS NN$
7050 GET#2,N
7060 NN$=NN$
7070 IF NN$=" _____" THEN PRINT"ESTA TABLA NO
EXISTE, DESEA VOLVER AL MENU S/N ":GOTO 7080
7071 FOR J=1 TO LEN(NN$)
7072 IF MID$(NN$,J,1)="&" THEN MID$(NN$,J,1)="&"

```

```

7073 NEXT J
7074 LSET NN$=NM$
7075 PUT#2,N
7079 CLOSE 2:RETURN
7080 A$=INKEY$:IF A$="" THEN GOTO 7080
7090 IF A$="S" OR A$="s" THEN CLOSE 2:GOTO 5000
7100 IF A$<>"N" AND A$<>"n" THEN GOTO 7080
7110 CLOSE 2:GOTO 7000
7120 OPEN"I",1,"T"+N$
7130 FOR X=1 TO 30
7140 INPUT#1,A$
7150 IF A$="F" THEN GOTO 7190
7160 INPUT#1,B$:INPUT#1,C$
7170 H$(X,1)=A$:H$(X,2)=B$:H$(X,3)=C$
7180 NEXT X
7190 CLOSE 1
7200 LOCATE 5,3:PRINT "DATO":LOCATE 5,20:PRINT"a":LOCATE 5,35:PRINT"b":LOCATE 5,
50:PRINT"t"
7210 LOCATE 6,2:PRINT"_____":LOCATE 6,15:PRINT"_____":LOCATE 6,30:PRINT"
_____":LOCATE 6,45:PRINT"_____ "
7220 LOCATE 23,1:PRINT"PULSA F PARA TERMINAR"
7230 N=X-1
7240 N=N+1
7250 LOCATE N+7-X,5:PRINT N:LOCATE N+7-X,20:INPUT"",H$(N,1):IF H$(N,1)="F" OR H$
(N,1)="f" THEN GOTO 7280
7260 LOCATE N+7-X,35:INPUT"",H$(N,2):LOCATE N+7-X,50:INPUT"",H$(N,3)
7265 IF H$(N,1)>H$(N,2) THEN C$=H$(N,1):H$(N,1)=H$(N,2):H$(N,2)=C$
7270 GOTO 7240
7280 OPEN"O",1,"T"+N$
7290 FOR X=1 TO N-1
7300 PRINT#1,H$(X,1):PRINT#1,H$(X,2):PRINT#1,H$(X,3)
7310 NEXT X
7320 PRINT#1,"F"
7330 GOSUB 300:CLOSE 1
7340 GOTO 5000
8000 GOTO 5
10000 CLS
10010 COLOR 15:LOCATE 3,27:PRINT"PROCESAMIENTO DE DATOS":COLOR 7
10020 LOCATE 6,15:PRINT"1. AJUSTE DEL TIEMPO Y CALCULO DE DATOS DE CADA TABLA"
10030 LOCATE 8,15:PRINT"2. AJUSTE POR ECUACION GOMPERTZIANA"
10040 LOCATE 10,15:PRINT"3. AJUSTE POR DIAMETROS EQUIVALENTES"
10050 LOCATE 12,15:PRINT"4. AJUSTE POR ECUACION VERHULST-PEARL"
10060 LOCATE 14,15:PRINT"5. AJUSTE POR ECUACION BERTALANFFY"
10080 LOCATE 16,15:PRINT"6. VOLVER AL MENU PRINCIPAL"
10090 LOCATE 22,10:PRINT"Pulsa la opcion deseada":A$=INKEY$
10100 IF A$="" THEN GOTO 10090
10110 A=VAL(A$):IF A=0 OR A>6 THEN GOTO 10090
10120 ON A GOTO 10500,11000,12000,13000,15000,5
10500 CLS
10505 LOCATE 3,5:PRINT"DESDE LA TABLA NUMERO: _____":LOCATE 5,5:PRINT"HASTA LA TA
BLA NUMERO: _____"
10509 LOCATE 3,28:INPUT"",N1$:N1=VAL(N1$):IF N1=0 OR N1>5000 THEN GOTO 10000
10510 LOCATE 5,28:INPUT"",N2$:N2=VAL(N2$):IF N2=0 OR N2>5000 OR N2<N1 THEN GOTO
10505

```

```

10515 LOCATE 23,1:COLOR 15:PRINT"Tiempo ajustado S/N":COLOR 7
10519 CD$=INKEY$:IF CD$="" THEN GOTO 10519
10520 IF CD$<>"s" AND CD$<>"n" AND CD$<>"N" AND CD$<>"S" THEN GOTO 10519
10525 X=N1-1:LOCATE 23,1:COLOR 15:PRINT"Espera un momento, estoy calculando":COL
OR 7
10526 X=X+1:IF X>N2 THEN GOTO 10000
10527 GOSUB 10900
10528 IF P=1 THEN GOTO 10526
10530 OPEN"I",1,"T"+RIGHT$(STR$(X),LEN(STR$(X))-1)
10540 FOR Y=1 TO 30
10550 INPUT#1,H$(Y,1):IF H$(Y,1)="F" THEN GOTO 10580
10560 INPUT#1,H$(Y,2):INPUT#1,H$(Y,3)
10565 H$(Y,1)=VAL(H$(Y,1)):H$(Y,2)=VAL(H$(Y,2)):H$(Y,3)=VAL(H$(Y,3))
10570 NEXT Y
10580 CLOSE 1
10585 FOR Z=1 TO Y-1
10586 FOR R=4 TO 13
10587 H$(Z,R)=0
10588 NEXT R:NEXT Z
10590 FOR Z=1 TO Y-1
10600 H$(Z,4)=(H$(Z,1)^2*H$(Z,2))^(1/3)
10610 H$(Z,5)=H$(Z,1)^2*H$(Z,2)*3.14159/6
10620 H$(Z,6)=H$(Z,5)/H$(1,5)
10630 H$(Z,7)=H$(Z,5)/3000
10640 H$(Z,8)=H$(Z,4)/H$(1,4)
10650 H$(Z,9)=H$(Z,4)/(3000*6/3.14159)^(1/3)
10660 H$(Z,10)=LOG(H$(Z,5))
10670 H$(Z,11)=LOG(H$(Z,6))
10680 H$(Z,12)=LOG(H$(Z,7))
10690 NEXT Z
10695 IF CD$="s" OR CD$="S" THEN GOTO 10700
10696 GOTO 10870
10700 M$=0
10705 FOR Y=1 TO Z
10710 IF H$(Y,5)>1800000000 THEN GOTO 10725
10720 NEXT Y
10725 F1$=0:F2$=0:F3$=0:F4$=0
10730 FOR J=1 TO Y-1
10740 F1$=F1$+(H$(J,3)+M$)*H$(J,12)
10750 F2$=F2$+(H$(J,3)+M$)
10760 F3$=F3$+H$(J,12)
10770 F4$=F4$+(H$(J,3)+M$)^2
10780 NEXT J
10790 B$=(F1$-F2$*F3$/(Y-1))/(F4$-F2$^2/(Y-1))
10800 A$=(F3$/(Y-1))-(B$*F2$/(Y-1))
10810 IF A$>1 THEN M$=M$+1$:GOTO 10725
10820 IF A$>.1 THEN M$=M$+.1$:GOTO 10725
10830 M$=M$+.1
10840 FOR J=1 TO Z
10850 H$(J,13)=H$(J,3)+M$
10860 NEXT J
10870 OPEN"O",1,"DT"+RIGHT$(STR$(X),LEN(STR$(X))-1)
10880 FOR J=1 TO Z-1

```

```

10882 PRINT#1,H$(J,1):PRINT#1,H$(J,2):PRINT#1,H$(J,3):PRINT#1,H$(J,4):PRINT#1,H$(
(J,5):PRINT#1,H$(J,6):PRINT#1,H$(J,7):PRINT#1,H$(J,8)
10884 PRINT#1,H$(J,9):PRINT#1,H$(J,10):PRINT#1,H$(J,11):PRINT#1,H$(J,12):PRINT#1
,H$(J,13)
10886 NEXT J
10888 PRINT#1,-1:CLOSE 1
10890 R=0:GOTO 10526
10900 OPEN"R",#2,"TABLAS",40:FIELD#2,40 AS NN$
10920 GET#2,X:NN$=NN$
10921 FOR J=1 TO LEN(NN$)
10922 IF MID$(NN$,J,1)="&" THEN CLOSE 2:P=1:RETURN
10923 IF MID$(NN$,J,1)="$" THEN MID$(NN$,J,1)="$":GOTO 10926
10924 IF MID$(NN$,J,1)="*" THEN MID$(NN$,J,1)="$":GOTO 10926
10925 NEXT J
10926 LSET NN$=NN$
10927 PUT#2,X
10930 IF NN$="_____ " THEN CLOSE 2:P=1:RETURN
10940 P=0:CLOSE 2:RETURN
11000 CLS
11010 LOCATE 5,20:COLOR 15:PRINT"AJUSTE POR ECUACION GOMPERTZIANA":COLOR 7
11020 LOCATE 9,10:PRINT "1. CALCULO CON TIEMPO REAL"
11030 LOCATE 12,10:PRINT"2. CALCULO CON TIEMPO AJUSTADO"
11040 LOCATE 20,5:COLOR 15:PRINT"Pulsa la opción deseada":COLOR 7
11050 A$=INKEY$:IF A$="" THEN GOTO 11050
11060 A=VAL(A$):IF A<1 OR A>2 THEN GOTO 11050
11070 IF A=1 THEN A=3:B=11:O$=" CON TIEMPO REAL"
11075 IF A=2 THEN A=13:B=12:O$=" CON TIEMPO AJUSTADO"
11078 CLS
11080 LOCATE 5,5:PRINT"DESDE LA TABLA NUMERO: _____":LOCATE 5,28:INPUT"",N1$:N1=
VAL(N1$):IF N1=0 OR N1>5000 THEN GOTO 11080
11090 LOCATE 7,5:PRINT"HASTA LA TABLA NUMERO: _____":LOCATE 7,28:INPUT"",N2$:N2=
VAL(N2$):IF N2<N1 OR N2>5000 THEN GOTO 11090
11100 X=N1-1
11110 X=X+1:IF X>N2 THEN GOTO 10000
11120 GOSUB 22900
11130 IF P=0 THEN GOTO 11110
11135 OPEN"1",1,"DT"+RIGHT$(STR$(X),LEN(STR$(X))-1)
11140 FOR T1=1 TO 30
11150 FOR T2=1 TO 13
11160 INPUT#1,H$(T1,T2):IF H$(T1,T2)=-1 THEN GOTO 11175
11170 NEXT T2:NEXT T1
11175 CLOSE 1
11176 K#=0
11177 FOR Y=1 TO T1-1
11178 IF K#<H$(Y,B) THEN K#=H$(Y,B)
11179 NEXT Y
11180 K#=K#+.00000000001#
11185 FOR Y=1 TO T1-1
11190 H$(Y,1)=LOG(K#-H$(Y,B))
11200 NEXT Y
11210 F1#=0:F2#=0:F3#=0:F4#=0:F5#=0
11220 FOR Y=1 TO T1-1
11230 F1#=F1#+H$(Y,1)

```



```

11240 F20=F20+H0(Y,A)
11250 F30=F30+H0(Y,1)*H0(Y,A)
11260 F40=F40+H0(Y,1)^2
11270 F50=F50+H0(Y,A)^2
11280 NEXT Y
11290 ALFA0=(F30-F10*F20/(T1-1))/(F50-F20^2/(T1-1))
11300 K10=EXP((F10-ALFA0*F20)/(T1-1))
11310 VAR0=K10-K0:IF ABS(VAR0)<K0/1000000 THEN GOTO 11400
11320 R=R+1
11330 IF R=1 THEN DIF0=VAR0:INC0=10000:IF DIF0<0 THEN GOTO 11110
11340 IF SGN(DIF0)=SGN(VAR0) THEN K0=K0+INC0:GOTO 11185
11350 K0=K0-INC0:INC0=INC0*.10:K0=K0+INC0:GOTO 11185
11400 DETER0=(F30-F10*F20/(T1-1))^2/((F50-F20^2/(T1-1))*(F40-F10^2/(T1-1)))
11410 ALFA0=(INT(-ALFA0*10000+.5))/100
11420 AO0=INT(-K0*ALFA0*1000)/1000
11430 DETER0=INT(DETER0*1000)/1000
11450 CLS:PRINT"          AJUSTE DE CURVA POR ECUACION GOMPERTZIANA";00
11460 PRINT:PRINT
11470 PRINT"TABLA NUMERO: ";X;"          NOMBRE: ";LEFT$(NM0,J-1)
11480 PRINT:PRINT
11490 PRINT"          Ao = 0";AO0;"          a = ";ALFA0;"x10^-2          COEF. CORR
ELACION = ";DETER0
11500 OPEN "I",1,"T"+RIGHT$(STR$(X),LEN(STR$(X))-1)
11510 FOR AJU=1 TO 30
11515 FOR RRU=1 TO 3
11520 INPUT#1,H0(AJU,RRU):IF H0(AJU,RRU)="F" THEN GOTO 11550
11540 NEXT RRU:NEXT AJU
11550 FOR RRU=1 TO 30:INPUT#1,AJ0(RRU):NEXT RRU
11555 CLOSE 1
11560 OPEN "O",1,"T"+RIGHT$(STR$(X),LEN(STR$(X))-1)
11570 FOR RJU=1 TO AJU-1
11580 FOR RRU=1 TO 3
11590 PRINT#1,H0(RJU,RRU)
11592 NEXT RRU:NEXT RJU
11593 IF A=3 THEN PRINT#1,"F":PRINT#1,STR$(AO0):PRINT#1,STR$(ALFA0):PRINT#1,STR$(
DETER0):FOR RRU=4 TO 30:PRINT#1,AJ0(RRU):NEXT RRU
11594 IF A=13 THEN PRINT#1,"F":FOR RRU=1 TO 3:PRINT#1,AJ0(RRU):NEXT RRU:PRINT#1,
STR$(AO0):PRINT#1,STR$(ALFA0):PRINT#1,STR$(DETER0):FOR RRU=7 TO 30:PRINT#1,AJ0(R
RU):NEXT RRU
11598 CLOSE 1
11600 R=0:GOTO 11110
12000 CLS
12010 LOCATE 3,25:PRINT"AJUSTE POR DIAMETROS EQUIVALENTES"
12020 LOCATE 7,15:PRINT"1.- TIEMPO REAL":LOCATE 10,15:PRINT"2.- TIEMPO AJUSTADO"
12030 LOCATE 20,5:PRINT"Pulsa la opción deseada":A0=INKEY$:IF A0="" THEN GOTO 12
030
12035 A=VAL(A0):IF A<1 OR A>2 THEN GOTO 12030
12040 CLS
12050 LOCATE 3,5:PRINT"DESDE LA TABLA: _____":LOCATE 3,21:INPUT"" ,N10::N1=VAL(N1
0):IF N1=0 OR N1>5000 THEN GOTO 12050
12060 LOCATE 6,5:PRINT"HASTA LA TABLA: _____":LOCATE 6,21:INPUT"" ,N20::N2=VAL(N2
0):IF N2<N1 OR N2>5000 THEN GOTO 12050
12070 IF A=1 THEN A=8:B=3

```

```

12080 IF A=2 THEN A=9:B=13
12100 X=N1-1
12101 X=X+1:IF X=N2+1 THEN GOTO 10000
12102 OPEN"R",82,"TABLAS",40:FIELD#2,40 AS NN#
12103 GET#2,X:NN# = NN#:CLOSE 2
12104 IF NN#="_____ " THEN GOTO 12101
12105 FOR PT=1 TO LEN(NN#):IF MID$(NN#,PT,1)="*" OR MID$(NN#,PT,1)="@" THEN GOTO
12101
12106 IF MID$(NN#,PT,1)="&" THEN GOTO 12111
12107 NEXT PT
12111 FOR AJ=1 TO 30
12112 FOR AJU=1 TO 13
12113 H$(AJ,AJU)=0
12114 NEXT AJU:NEXT AJ
12120 OPEN"I",1,"DT"+RIGHT$(STR$(X),LEN(STR$(X))-1)
12130 FOR AJ=1 TO 30
12140 FOR AJU=1 TO 13
12150 INPUT#1,H$(AJ,AJU):IF H$(AJ,AJU)=-1 THEN CLOSE 1:GOTO 12170
12160 NEXT AJU:NEXT AJ
12170 F1#=0:F2#=0:F3#=0:F4#=0:F5#=0
12180 FOR Y=1 TO AJ-1
12190 F1#=F1#+H$(Y,A)
12200 F2#=F2#+H$(Y,B)
12210 F3#=F3#+H$(Y,A)*H$(Y,B)
12220 F4#=F4#+H$(Y,A)^2
12230 F5#=F5#+H$(Y,B)^2
12240 NEXT Y
12250 D1#=(F3#-F1#*F2#/(AJ-1))/(F5#-F2#^2/(AJ-1)):D1#=STR$(D1#)
12260 D2#=(F1#-D1#*F2#)/(AJ-1):D2#=STR$(D2#)
12270 DETER#=(F3#-F1#*F2#/(AJ-1))^2/((F5#-F2#^2/(AJ-1))*(F4#-F1#^2/(AJ-1))):DETE
R# =STR$(DETER#)
12280 AO#=3*D1#/D2#:AO#=STR$(AO#)
12285 ALFA#=LOG(1+D1#/D2#):ALFA#=STR$(ALFA#)
12290 FOR Y=1 TO AJ-1:H$(Y,1)=LOG(3*D1#/(D2#+D1#*H$(Y,B))):NEXT Y
12291 F1#=0:F2#=0:F3#=0:F4#=0:F5#=0
12292 FOR Y=1 TO AJ-1
12293 F1#=F1#+H$(Y,1)
12294 F2#=F2#+H$(Y,B)
12295 F3#=F3#+H$(Y,1)*H$(Y,B)
12296 F4#=F4#+H$(Y,1)^2
12297 F5#=F5#+H$(Y,B)^2
12298 NEXT Y
12299 R1#=(F3#-F1#*F2#/(AJ-1))/(F5#-F2#^2/(AJ-1))
12300 ALFA#=(F1#-R1#*F2#)/(AJ-1):ALFA#=STR$(ALFA#)
12301 DETERR#=(F3#-F1#*F2#/(AJ-1))^2/((F5#-F2#^2/(AJ-1))*(F4#-F1#^2/(AJ-1))):DET
ERR# =STR$(DETER#)
12302 AO#=EXP(R1#):AO#=STR$(AO#)
12309 CLS
12310 PRINT" AJUSTE DE CURVA POR DIAMETROS EQUIVALENTES ";
12320 IF A=8 THEN PRINT"CON TIEMPO REAL"
12330 IF A=9 THEN PRINT"CON TIEMPO AJUSTADO"
12340 PRINT:PRINT
12350 PRINT"TABLA NUMERO: ";X;"NOMBRE: ";LEFT$(NN#,PT-1)

```

```

12080 IF A=2 THEN A=9:B=13
12100 X=N1-1
12101 X=X+1:IF X=N2+1 THEN GOTO 10000
12102 OPEN"R",#2,"TABLAS",40:FIELD#2,40 AS NN#
12103 GET#2,X:NM#=NN#:CLOSE 2
12104 IF NM#="_____ " THEN GOTO 12101
12105 FOR PT=1 TO LEN(NM#):IF MID$(NM#,PT,1)="*" OR MID$(NM#,PT,1)="@" THEN GOTO
12101
12106 IF MID$(NM#,PT,1)="&" THEN GOTO 12111
12107 NEXT PT
12111 FOR AJ=1 TO 30
12112 FOR AJU=1 TO 13
12113 H$(AJ,AJU)=0
12114 NEXT AJU:NEXT AJ
12120 OPEN"I",1,"DT"+RIGHT$(STR$(X),LEN(STR$(X))-1)
12130 FOR AJ=1 TO 30
12140 FOR AJU=1 TO 13
12150 INPUT#1,H$(AJ,AJU):IF H$(AJ,AJU)=-1 THEN CLOSE 1:GOTO 12170
12160 NEXT AJU:NEXT AJ
12170 F1#=0:F2#=0:F3#=0:F4#=0:F5#=0
12180 FOR Y=1 TO AJ-1
12190 F1#=F1#+H$(Y,A)
12200 F2#=F2#+H$(Y,B)
12210 F3#=F3#+H$(Y,A)*H$(Y,B)
12220 F4#=F4#+H$(Y,A)^2
12230 F5#=F5#+H$(Y,B)^2
12240 NEXT Y
12250 D1#=(F3#-F1#*F2#/(AJ-1))/(F5#-F2#^2/(AJ-1)):D1#=STR$(D1#)
12260 D2#=(F1#-D1#*F2#)/(AJ-1):D2#=STR$(D2#)
12270 DETER#=(F3#-F1#*F2#/(AJ-1))^2/((F5#-F2#^2/(AJ-1))*(F4#-F1#^2/(AJ-1))):DETE
R#=STR$(DETER#)
12280 AO#=3*D1#/D2#:AO#=STR$(AO#)
12285 ALFA#=LOG(1+D1#/D2#):ALFA#=STR$(ALFA#)
12290 FOR Y=1 TO AJ-1:H$(Y,1)=LOG(3*D1#/(D2#+D1#*H$(Y,B))):NEXT Y
12291 F1#=0:F2#=0:F3#=0:F4#=0:F5#=0
12292 FOR Y=1 TO AJ-1
12293 F1#=F1#+H$(Y,1)
12294 F2#=F2#+H$(Y,B)
12295 F3#=F3#+H$(Y,1)*H$(Y,B)
12296 F4#=F4#+H$(Y,1)^2
12297 F5#=F5#+H$(Y,B)^2
12298 NEXT Y
12299 R1#=(F3#-F1#*F2#/(AJ-1))/(F5#-F2#^2/(AJ-1))
12300 ALFA#=(F1#-R1#*F2#)/(AJ-1):ALFA#=STR$(ALFA#)
12301 DETERR#=(F3#-F1#*F2#/(AJ-1))^2/((F5#-F2#^2/(AJ-1))*(F4#-F1#^2/(AJ-1))):DET
ERR#=STR$(DETER#)
12302 AO#=EXP(R1#):AO#=STR$(AO#)
12309 CLS
12310 PRINT" AJUSTE DE CURVA POR DIAMETROS EQUIVALENTES ";
12320 IF A=8 THEN PRINT"CON TIEMPO REAL"
12330 IF A=9 THEN PRINT"CON TIEMPO AJUSTADO"
12340 PRINT:PRINT
12350 PRINT"TABLA NUMERO: ";X;"NOMBRE: ";LEFT$(NM#,PT-1)

```

```

12360 PRINT:PRINT
12370 PRINT "      A0 = ";INT(A0*1000)/1000;"      a = ";INT(ALFA*10000)/
100;"x10-2";"      COEF.CORRELACION = ";INT(DETERR*1000)/1000
12500 OPEN "I",1,"T"+RIGHT$(STR$(X),LEN(STR$(X))-1)
12510 FOR AJU=1 TO 30
12515 FOR RRU=1 TO 3
12520 INPUT#1,H$(AJU,RRU):IF H$(AJU,RRU)="F" THEN GOTO 12550
12540 NEXT RRU:NEXT AJU
12550 FOR RRU=1 TO 24:INPUT#1,AJ$(RRU):NEXT RRU
12555 CLOSE 1
12560 OPEN "O",1,"T"+RIGHT$(STR$(X),LEN(STR$(X))-1)
12570 FOR RJU=1 TO AJU-1
12580 FOR RRU=1 TO 3
12590 PRINT#1,H$(RJU,RRU)
12592 NEXT RRU:NEXT RJU
12593 IF A=8 THEN PRINT#1,"F":FOR RRU=1 TO 6:PRINT#1,AJ$(RRU):NEXT RRU:PRINT#1,D
18:PRINT#1,D2$:PRINT#1,DETER$:FOR RRU=10 TO 24:PRINT#1,AJ$(RRU):NEXT RRU
12594 IF A=9 THEN PRINT#1,"F":FOR RRU=1 TO 9:PRINT#1,AJ$(RRU):NEXT RRU:PRINT#1,A
08:PRINT#1,ALFA$:PRINT#1,DETER$:FOR RRU=13 TO 30:PRINT#1,AJ$(RRU):NEXT RRU
12598 CLOSE 1
12600 GOTO 12101
13000 CLS
13010 LOCATE 3,25:PRINT"AJUSTE POR ECUACION DE VERHULST-PEARL"
13020 LOCATE 7,15:PRINT"1.- TIEMPO REAL":LOCATE 10,15:PRINT"2.- TIEMPO AJUSTADO"
13030 LOCATE 20,5:PRINT"Pulsa la opción deseada":A$=INKEY$:IF A$="" THEN GOTO 13
030
13035 V=VAL(A$):IF V<1 OR V>2 THEN GOTO 13030
13040 CLS
13050 LOCATE 3,5:PRINT"DESDE LA TABLA: _____":LOCATE 3,21:INPUT"N1$":N1=VAL(N1
$):IF N1=0 OR N1>5000 THEN GOTO 13050
13060 LOCATE 6,5:PRINT"HASTA LA TABLA: _____":LOCATE 6,21:INPUT"N2$":N2=VAL(N2
$):IF N2<N1 OR N2>5000 THEN GOTO 13050
13070 IF V=1 THEN A=3:O$="CON TIEMPO REAL"
13080 IF V=2 THEN A=13:O$="CON TIEMPO AJUSTADO"
13100 X=N1-1
13101 X=X+1:IF X=N2+1 THEN GOTO 10000
13102 OPEN"R",#2,"TABLAS",40:FIELD#2,40 AS NN$
13103 GET#2,X:NN$=NN$:CLOSE 2
13104 IF NN$="_____ " THEN GOTO 13101
13105 FOR PT=1 TO LEN(NN$):IF MID$(NN$,PT,1)="*" OR MID$(NN$,PT,1)="%" THEN GOTO
13101
13106 IF MID$(NN$,PT,1)="&" THEN GOTO 13111
13107 NEXT PT
13111 FOR AJ=1 TO 30
13112 FOR AJU=1 TO 13
13113 H$(AJ,AJU)=0
13114 NEXT AJU:NEXT AJ
13120 OPEN"I",1,"DT"+RIGHT$(STR$(X),LEN(STR$(X))-1)
13130 FOR AK=1 TO 30
13140 FOR AJU=1 TO 13
13150 INPUT#1,H$(AK,AJU):IF H$(AK,AJU)=-1 THEN CLOSE 1:GOTO 13165
13160 NEXT AJU:NEXT AK
13165 C#=0

```



```

15000 CLS
15010 LOCATE 3,25:PRINT"AJUSTE POR ECUACION BERTALANFFY"
15020 LOCATE 7,15:PRINT"1.- TIEMPO REAL":LOCATE 10,15:PRINT"2.- TIEMPO AJUSTADO"
15030 LOCATE 20,5:PRINT"Pulsa la opción deseada":A$=INKEY$:IF A$="" THEN GOTO 15
030
15035 V=VAL(A$):IF V<1 OR V>2 THEN GOTO 15030
15040 CLS
15050 LOCATE 3,5:PRINT"DESDE LA TABLA: _____":LOCATE 3,21:INPUT"",N1$:N1=VAL(N1
$):IF N1=0 OR N1>5000 THEN GOTO 15050
15060 LOCATE 6,5:PRINT"HASTA LA TABLA: _____":LOCATE 6,21:INPUT"",N2$:N2=VAL(N2
$):IF N2<N1 OR N2>5000 THEN GOTO 15050
15070 IF V=1 THEN A=3:PR=8:O$="CON TIEMPO REAL"
15080 IF V=2 THEN A=13:PR=9:O$="CON TIEMPO AJUSTADO"
15100 X=N1-1
15101 X=X+1:IF X=N2+1 THEN GOTO 10000
15102 OPEN"R",#2,"TABLAS",40:FIELD#2,40 AS NH$
15103 GET#2,X:NH$=NH$:CLOSE 2
15104 IF NH$="_____ " THEN GOTO 15101
15105 FOR PT=1 TO LEN(NH$):IF MID$(NH$,PT,1)="*" OR MID$(NH$,PT,1)="%" THEN GOTO
15101
15106 IF MID$(NH$,PT,1)="#" THEN GOTO 15111
15107 NEXT PT
15111 FOR AJ=1 TO 30
15112 FOR AJU=1 TO 13
15113 H$(AJ,AJU)=0
15114 NEXT AJU:NEXT AJ
15120 OPEN"1",1,"DT"+RIGHT$(STR$(X),LEN(STR$(X))-1)
15130 FOR AK=1 TO 30
15140 FOR AJU=1 TO 13
15150 INPUT#1,H$(AK,AJU):IF H$(AK,AJU)=-1 THEN GOTO 15170
15160 NEXT AJU:NEXT AK
15170 CLOSE 1:B$=.3#
15175 IF V=2 THEN B$=.95#
15180 PRU=0
15185 FOR Y=1 TO AK-1
15190 H$(Y,1)=LOG(ABS(H$(Y,PR)-1/(1-B$))):IF H$(Y,PR)-1/(1-B$)<0 THEN PRU=1
15200 NEXT Y
15210 F1#=0:F2#=0:F3#=0:F4#=0:F5#=0
15220 FOR Y=1 TO AK-1
15230 F1#=F1#+H$(Y,1)
15240 F2#=F2#+H$(Y,A)
15250 F3#=F3#+H$(Y,1)*H$(Y,A)
15260 F4#=F4#+H$(Y,1)^2
15270 F5#=F5#+H$(Y,A)^2
15280 NEXT Y
15290 C#=(F3#-F1#*F2#/(AK-1))/(F5#-F2#^2/(AK-1))
15300 K#=(F1#-C#*F2#)/(AK-1)
15310 IF PRU=0 THEN B1#=EXP(K#)/(EXP(K#)-1)
15315 B1#=EXP(K#)/(EXP(K#)+1)
15318 DETER#=(F3#-F1#*F2#/(AK-1))^2/((F5#-F2#^2/(AK-1))*(F4#-F1#^2/(AK-1)))
15325 VAR#=ABS(B#-B1#)
15330 IF DETERMAX#<DETER# THEN DETERMAX#=DETER#:BMAX#=B#:CMAX#=C#
15340 R=R+1

```

```

15341 IF V=2 THEN GOTO 15380
15350 IF DETER#>.9 AND VAR#<.001# THEN INC#=.001#:B#=#+INC#:GOTO 15365
15360 IF DETER#>.5 THEN INC#=.01#:B#=#+INC#:GOTO 15365
15362 INC#=.1#:B#=#+INC#:GOTO 15365
15365 IF R<S1 THEN GOTO 15180
15370 GOTO 15400
15380 IF VAR#>.001 OR DETER#<.9 THEN B#=#+.001#:GOTO 15180
15390 GOTO 15370
15400 BL=INT(BMAX#*1000+.5)/1000:CL=-INT(CMAX#*10000!)/10000!:DETEL=INT(DETERMAX
#*1000+.5)/1000
15410 CLS:LOCATE 1,15:PRINT"AJUSTE POR ECUACION BERTALANFFY ";O#
15420 LOCATE 3,10:PRINT"TABLA NUMERO: ";X;"          NOMBRE: ";LEFT$(NM#,PT-1)
15430 LOCATE 6,15:PRINT "b=";BL:LOCATE 6,30:PRINT "c=";CL:LOCATE 6,45:PRINT "COE
F. CORREL.=";DETEL
15440 OPEN "I",1,"T"+RIGHT$(STR$(X),LEN(STR$(X))-1)
15450 FOR AJU=1 TO 30
15460 FOR RRU=1 TO 3
15470 INPUT#1,H$(AJU,RRU):IF H$(AJU,RRU)="F" THEN GOTO 15490
15480 NEXT RRU:NEXT AJU
15490 FOR RRU=1 TO 30:INPUT#1,AJ$(RRU):NEXT RRU
15500 CLOSE 1
15510 OPEN "O",1,"T"+RIGHT$(STR$(X),LEN(STR$(X))-1)
15520 FOR RJU=1 TO AJU-1
15530 FOR RRU=1 TO 3
15540 PRINT#1,H$(RJU,RRU)
15550 NEXT RRU:NEXT RJU
15560 IF A=3 THEN PRINT#1,"F":FOR RRU=1 TO 18:PRINT#1,AJ$(RRU):NEXT RRU:PRINT#1,
STR$(BMAX#):PRINT#1,STR$(CMAX#):PRINT#1,STR$(DETERMAX#):FOR RRU=22 TO 30:PRINT#1
,AJ$(RRU):NEXT RRU
15570 IF A=13 THEN PRINT#1,"F":FOR RRU=1 TO 21:PRINT#1,AJ$(RRU):NEXT RRU:PRINT#1
,STR$(BMAX#):PRINT#1,STR$(CMAX#):PRINT#1,STR$(DETERMAX#):FOR RRU=25 TO 30:PRINT#
1,AJ$(RRU):NEXT RRU
15580 CLOSE 1
15590 R=0:BMAX#=0:CMAX#=0:DETERMAX#=0:GOTO 15101
17000 CHAIN"DIB"
20000 CLS
20005 ILUMA=0:ILUMB=0:ILUMC=0:ILUMD=0:ILUME=0:ILUMF=0:ILUMG=0:ILUMH=0:ILUMI=0:IL
UMJ=0:ILUMK=0:ILUML=0:ILUMM=0
20010 LOCATE 5,33:COLOR 15:PRINT "LISTADOS":COLOR 7
20020 LOCATE 10,20:PRINT"1.- LISTADOS DE NOMBRES DE TABLAS"
20030 LOCATE 13,20:PRINT"2.- LISTADOS DE DATOS DE TABLAS"
20040 LOCATE 16,20:PRINT"3.- LISTADOS DE DATOS DE AJUSTE"
20045 LOCATE 19,20:PRINT"4.- VOLVER AL MENU PRINCIPAL"
20050 LOCATE 22,5:PRINT "Pulsa la opción deseada"
20060 A#=INKEY$:A=VAL(A#):IF A#="" THEN GOTO 20060
20070 IF A=0 OR A>4 THEN GOTO 20060
20080 ON A GOTO 20100,21000,60000,5
20100 CLS:LOCATE 5,5:PRINT"DESDE LA TABLA NUMERO: _____":LOCATE 5,28:INPUT"",Y#
Y=VAL(Y#):IF Y=0 OR Y>5000 THEN GOTO 20100
20110 LOCATE 7,5:PRINT "HASTA LA TABLA NUMERO: _____":LOCATE 7,28:INPUT"",Z#
Z=V
AL(Z#):IF Z<Y OR Z>5000 THEN GOTO 20100
20120 LOCATE 23,1:COLOR 15:PRINT"Por pantalla o impresora P/I":COLOR 7
20123 A#=INKEY$:IF A#="" THEN GOTO 20123

```

```

20124 IF A$="I" OR A$="i" THEN GOTO 20500
20125 CLS
20127 GOSUB 20130
20128 GOTO 20170
20130 LOCATE 23,1:COLOR 15:PRINT"Pulsa una tecla para continuar":COLOR 7
20132 A$=INKEY$:IF A$="" THEN GOTO 20132
20138 CLS:LOCATE 1,30:PRINT "LISTADO DE TABLAS"
20140 PRINT"=====
=====
20150 LOCATE 3,2:PRINT"NUMERO":LOCATE 3,35:PRINT"NOMBRE":LOCATE 3,72:PRINT"ESTAD
O"
20160 PRINT"=====
=====
20165 RETURN
20170 OPEN"R",#2,"TABLAS",40:FIELD#2,40 AS NN$
20175 N=4
20180 FOR X=Y TO Z
20190 GET#2,X
20200 NN$=NN$:IF NN$="_____ " THEN GOTO 20220
20201 FOR I=1 TO LEN(NN$)
20202 IF MID$(NN$,I,1)="*" THEN E$="INT.":GOTO 20206
20203 IF MID$(NN$,I,1)="#" THEN E$="MOD.":GOTO 20206
20204 IF MID$(NN$,I,1)="#" THEN E$="CAL.":GOTO 20206
20205 NEXT I
20206 NN$=LEFT$(NN$,I-1)
20208 N=N+1:IF N=22 THEN N=5:PRINT"=====
=====":GOSUB 20130
20210 LOCATE N,7-LEN(STR$(X)):PRINT X:LOCATE N,22:PRINT NN$:LOCATE N,74:PRINT E$
20220 NEXT X
20230 CLOSE 2
20240 PRINT"=====
=====
20250 LOCATE 23,1:COLOR 15:PRINT"Listado terminado, pulsa una tecla":COLOR 7
20260 A$=INKEY$:IF A$="" THEN GOTO 20260
20270 GOTO 20000
20500 LOCATE 23,1:COLOR 15:PRINT"Prepara la impresora y pulsa una tecla"
20510 A$=INKEY$:IF A$="" THEN GOTO 20510
20520 GOSUB 20540
20530 GOTO 20570
20540 LPRINT "                                LISTADO DE TABLAS"
20550 LPRINT"=====
=====
== =====
20555 LPRINT"          NUMERO                                NOMBRE
          ESTADO "
20560 LPRINT"=====
=====
== =====
20565 RETURN
20570 OPEN"R",#2,"TABLAS",40:FIELD#2,40 AS NN$
20575 LINA=4
20580 FOR X=Y TO Z
20590 GET#2,X
20600 NN$=NN$:IF NN$="_____ " THEN GOTO 20620
20601 FOR I=1 TO LEN(NN$)

```



```

20602 IF MID$(NM$,I,1)="*" THEN E$="INT.":GOTO 20606
20603 IF MID$(NM$,I,1)="#" THEN E$="MOD.":GOTO 20606
20604 IF MID$(NM$,I,1)="#" THEN E$="CAL.":GOTO 20606
20605 NEXT I
20606 NM$=LEFT$(NM$,I-1)
20608 LINA=LINA+1:IF LINA=56 THEN LINA=1:PRINT"=====
=====":GOSUB 20640:GOSUB 20540
20610 LPRINT USING " #####
      \
      \ \ " ;X,NM$,E$
20620 NEXT X
20630 CLOSE 2
20635 GOSUB 20640:GOTO 20000
20640 LPRINT"=====
== =====":FOR LINEA=LINA TO 64:LPRINT:NEXT LINEA:RETURN
20650 LOCATE 23,1:PRINT"                                ":LOCATE 23,1:COL
OR 15:PRINT"Listado terminado, pulsa una tecla":COLOR 7
20660 A$=INKEY$:IF A$="" THEN GOTO 20660
20670 GOTO 20000
21000 CLS
21010 LOCATE 2,25:COLOR 15:PRINT"LISTADOS DE DATOS DE TABLAS":COLOR 7
21020 LOCATE 5,1:PRINT"a) tiempo real -tr-"
21030 LOCATE 7,1:PRINT"b) diametro menor -a-"
21040 LOCATE 9,1:PRINT"c) diametro mayor -b-"
21050 LOCATE 11,1:PRINT"d) tiempo ajustado -ta-"
21060 LOCATE 13,1:PRINT"e) diametro equivalente -d-"
21070 LOCATE 15,1:PRINT"f) diametro relativo a la celula -d/#c-"
21080 LOCATE 17,1:PRINT"g) diametro relativo a #o -d/#o-"
21090 LOCATE 5,40:PRINT"h) volumen -V-"
21100 LOCATE 7,40:PRINT"i) volumen relativo a la celula -V/Vc-"
21110 LOCATE 9,40:PRINT"j) volumen relativo a Vo -V/Vo-"
21120 LOCATE 11,40:PRINT"k) logaritmo de volumen -L(V)-"
21130 LOCATE 13,40:PRINT"l) logaritmo de vol.rel. celula -L(V/Vc)-"
21140 LOCATE 15,40:PRINT"m) logaritmo de vol.rel. Vo -L(V/Vo)-"
21150 LOCATE 22,1:COLOR 15:PRINT"Pulsa las opciones deseadas, para anular una op
ción ya elegida vuelve a pulsar la tecla. Pulsa -Z- para terminar":COLOR 7
21160 A$=INKEY$:IF A$="" THEN GOTO 21160
21170 IF A$="a" OR A$="A" THEN GOTO 21300
21180 IF A$="b" OR A$="B" THEN GOTO 21350
21190 IF A$="c" OR A$="C" THEN GOTO 21400
21200 IF A$="d" OR A$="D" THEN GOTO 21450
21250 IF A$="e" OR A$="E" THEN GOTO 21500
21260 IF A$="f" OR A$="F" THEN GOTO 21550
21265 IF A$="g" OR A$="G" THEN GOTO 21600
21270 IF A$="h" OR A$="H" THEN GOTO 21650
21275 IF A$="i" OR A$="I" THEN GOTO 21700
21280 IF A$="j" OR A$="J" THEN GOTO 21750
21285 IF A$="k" OR A$="K" THEN GOTO 21800
21290 IF A$="l" OR A$="L" THEN GOTO 21850
21295 IF A$="m" OR A$="M" THEN GOTO 21900
21297 IF A$="z" OR A$="Z" THEN GOTO 22000
21298 GOTO 21160
21300 IF ILUMA=0 THEN ILUMA=1:GOTO 21320
21310 ILUMA=0:LOCATE 5,1:PRINT"a) tiempo real -tr-"

```

```

21315 GOTO 21160
21320 LOCATE 5,1:COLOR 15:PRINT"a) tiempo real -tr-":COLOR 7
21330 GOTO 21160
21350 IF ILUMB=0 THEN ILUMB=1:GOTO 21370
21360 ILUMB=0:LOCATE 7,1:PRINT"b) diametro menor -a-"
21365 GOTO 21160
21370 LOCATE 7,1:COLOR 15:PRINT"b) diametro menor -a-":COLOR 7
21380 GOTO 21160
21400 IF ILUMC=0 THEN ILUMC=1:GOTO 21420
21410 ILUMC=0:LOCATE 9,1:PRINT"c) diametro mayor -b-"
21415 GOTO 21160
21420 LOCATE 9,1:COLOR 15:PRINT"c) diametro mayor -b-":COLOR 7
21430 GOTO 21160
21450 IF ILUMD=0 THEN ILUMD=1:GOTO 21470
21460 ILUMD=0:LOCATE 11,1:PRINT"d) tiempo ajustado -ta-"
21465 GOTO 21160
21470 LOCATE 11,1:COLOR 15:PRINT"d) tiempo ajustado -ta-":COLOR 7
21480 GOTO 21160
21500 IF ILUME=0 THEN ILUME=1:GOTO 21520
21510 ILUME=0:LOCATE 13,1:PRINT"e) diametro equivalente -s-"
21515 GOTO 21160
21520 LOCATE 13,1:COLOR 15:PRINT"e) diametro equivalente -s-":COLOR 7
21530 GOTO 21160
21550 IF ILUMF=0 THEN ILUMF=1:GOTO 21570
21560 ILUMF=0:LOCATE 15,1:PRINT"f) diametro relativo a la celula -s/#c-"
21565 GOTO 21160
21570 LOCATE 15,1:COLOR 15:PRINT"f) diametro relativo a la celula -s/#c-":COLOR 7
21580 GOTO 21160
21600 IF ILUMG=0 THEN ILUMG=1:GOTO 21620
21610 ILUMG=0:LOCATE 17,1:PRINT"g) diametro relativo a fo -s/#o-"
21615 GOTO 21160
21620 LOCATE 17,1:COLOR 15:PRINT"g) diametro relativo a fo -s/#o-":COLOR 7
21630 GOTO 21160
21650 IF ILUMH=0 THEN ILUMH=1:GOTO 21670
21660 ILUMH=0:LOCATE 5,40:PRINT"h) volumen -V-"
21665 GOTO 21160
21670 LOCATE 5,40:COLOR 15:PRINT"h) volumen -V-":COLOR 7
21680 GOTO 21160
21700 IF ILUMI=0 THEN ILUMI=1:GOTO 21720
21710 ILUMI=0:LOCATE 7,40:PRINT"i) volumen relativo a la celula -V/Vc-"
21715 GOTO 21160
21720 LOCATE 7,40:COLOR 15:PRINT"i) volumen relativo a la celula -V/Vc-":COLOR 7
21730 GOTO 21160
21750 IF ILUMJ=0 THEN ILUMJ=1:GOTO 21770
21760 ILUMJ=0:LOCATE 9,40:PRINT"j) volumen relativo a Vo -V/Vo-"
21765 GOTO 21160
21770 LOCATE 9,40:COLOR 15:PRINT"j) volumen relativo a Vo -V/Vo-":COLOR 7
21780 GOTO 21160
21800 IF ILUMK=0 THEN ILUMK=1:GOTO 21820
21810 ILUMK=0:LOCATE 11,40:PRINT"k) logaritmo de volumen -L(V)-"
21815 GOTO 21160
21820 LOCATE 11,40:COLOR 15:PRINT"k) logaritmo de volumen -L(V)-":COLOR 7
21830 GOTO 21160

```

```

21850 IF ILUML=0 THEN ILUML=1:GOTO 21870
21860 ILUML=0:LOCATE 13,40:PRINT"1) logaritmo de vol.rel. celula -L(V/Vc)-"
21865 GOTO 21160
21870 LOCATE 13,40:COLOR 15:PRINT"1) logaritmo de vol.rel. celula -L(V/Vc)-":COL
OR 7
21880 GOTO 21160
21900 IF ILUMM=0 THEN ILUMM=1:GOTO 21920
21910 ILUMM=0:LOCATE 15,40:PRINT"m) logaritmo de vol.rel. Vo -L(V/Vo)-"
21915 GOTO 21160
21920 LOCATE 15,40:COLOR 15:PRINT"m) logaritmo de vol.rel. Vo -L(V/Vo)-":COLOR 7
21930 GOTO 21160
22000 N=ILUMA+ILUMB+ILUMC+ILUMD+ILUME+ILUMF+ILUMG+ILUMH+ILUMI+ILUMJ+ILUMK+ILUML+
ILUMM
22005 IF N=0 THEN GOTO 20000
22007 CLS
22010 LOCATE 5,3:PRINT"DESDE LA TABLA NUMERO: ____":LOCATE 7,3:PRINT"HASTA LA T
ABLA NUMERO: ____":LOCATE 5,26:INPUT"",N1$:N1=VAL(N1$)
22020 IF N1=0 OR N1>5000 THEN GOTO 22010
22025 LOCATE 7,26:INPUT"",N2$:N2=VAL(N2$):IF N2<N1 OR N2>5000 THEN GOTO 22010
22026 LOCATE 23,1:COLOR 15:PRINT"longitud de página = __ (66 por omisión)":LOCAT
E 23,22:INPUT"",TP$:TP=VAL(TP$)
22027 IF TP=0 THEN TP=66:LPRINT CHR$(27);"C";CHR$(TP)
22028 LOCATE 23,1:COLOR 15:PRINT"Prepara la impresora y pulsa una tecla  ":COLO
R 7:A$=INKEY$:IF A$="" THEN GOTO 22028
22030 X=N1-1
22040 FOR T1=1 TO 30
22041 FOR T2=1 TO 13
22042 L$(T1,T2)=""
22043 NEXT T2:NEXT T1
22049 X=X+1:IF X>N2 THEN GOTO 20000
22050 GOSUB 22900
22060 IF P=0 THEN GOTO 22040
22070 N=ILUMA+ILUMB+ILUMC+ILUMD+ILUME+ILUMF+ILUMG+ILUMH+ILUMI+ILUMJ+ILUMK+ILUML+
ILUMM
22080 IF N>6 THEN GOSUB 22950
22100 OPEN"I",1,"DT"+RIGHT$(STR$(X),LEN(STR$(X))-1)
22110 FOR T2=1 TO 30
22120 FOR T1=1 TO 13
22130 INPUT#1,H$(T2,T1):IF H$(T2,T1)=-1 THEN CLOSE 1:GOTO 22150
22140 NEXT T1:NEXT T2
22150 FOR T=1 TO T2-1
22160 H$(T,4)=INT(H$(T,4)*100+.5)/100
22170 H$(T,5)=INT(H$(T,5)/10000+.5)/100
22175 H$(T,6)=INT(H$(T,6)*100+.5)/100
22180 H$(T,7)=INT(H$(T,7)*100+.5)/100
22190 H$(T,8)=INT(H$(T,8)*100+.5)/100
22200 H$(T,9)=INT(H$(T,9)*100+.5)/100
22210 H$(T,10)=INT(H$(T,10)*100+.5)/100
22220 H$(T,11)=INT(H$(T,11)*100+.5)/100
22230 H$(T,12)=INT(H$(T,12)*100+.5)/100
22240 H$(T,13)=INT(H$(T,13)*100+.5)/100
22250 NEXT T
22255 FOR IMPR=1 TO 15:LPRINT:NEXT IMPR:IF N>6 THEN GOTO 22657

```

```

22257 LP=0:LPRINT"
22260 IF ILUMA=1 THEN LPRINT"T(dias) ";:LP=LP+1:FOR LPT=1 TO T-1:L$(LPT,LP)=STR$(H$(LPT,3)):NEXT LPT
22270 IF ILUMB=1 THEN LPRINT" a(µm) ";:LP=LP+1:FOR LPT=1 TO T-1:L$(LPT,LP)=STR$(H$(LPT,1)):NEXT LPT
22280 IF ILUMC=1 THEN LPRINT" b(µm) ";:LP=LP+1:FOR LPT=1 TO T-1:L$(LPT,LP)=STR$(H$(LPT,2)):NEXT LPT
22290 IF ILUMD=1 THEN LPRINT"Ta(dias) ";:LP=LP+1:FOR LPT=1 TO T-1:L$(LPT,LP)=STR$(H$(LPT,13)):NEXT LPT
22300 IF ILUME=1 THEN LPRINT" φ(µm) ";:LP=LP+1:FOR LPT=1 TO T-1:L$(LPT,LP)=STR$(H$(LPT,4)):NEXT LPT
22310 IF ILUMF=1 THEN LPRINT" φ/φc ";:LP=LP+1:FOR LPT=1 TO T-1:L$(LPT,LP)=STR$(H$(LPT,9)):NEXT LPT
22320 IF ILUMG=1 THEN LPRINT" φ/φo ";:LP=LP+1:FOR LPT=1 TO T-1:L$(LPT,LP)=STR$(H$(LPT,8)):NEXT LPT
22330 IF ILUMH=1 THEN LPRINT"V·10";CHR$(27);"S";CHR$(0);"6";CHR$(27);"T";"µm";CHR$(27);"S";CHR$(0);"3";CHR$(27);"T";":)";:LP=LP+1:FOR LPT=1 TO T-1:L$(LPT,LP)=STR$(H$(LPT,5)):NEXT LPT
22340 IF ILUMI=1 THEN LPRINT" V/Vc ";:LP=LP+1:FOR LPT=1 TO T-1:L$(LPT,LP)=STR$(H$(LPT,7)):NEXT LPT
22350 IF ILUMJ=1 THEN LPRINT" V/Vo ";:LP=LP+1:FOR LPT=1 TO T-1:L$(LPT,LP)=STR$(H$(LPT,6)):NEXT LPT
22360 IF ILUMK=1 THEN LPRINT" Ln(V) ";:LP=LP+1:FOR LPT=1 TO T-1:L$(LPT,LP)=STR$(H$(LPT,10)):NEXT LPT
22370 IF ILUML=1 THEN LPRINT"Ln(V/Vc) ";:LP=LP+1:FOR LPT=1 TO T-1:L$(LPT,LP)=STR$(H$(LPT,12)):NEXT LPT
22380 IF ILUMM=1 THEN LPRINT"Ln(V/Vo) ";:LP=LP+1:FOR LPT=1 TO T-1:L$(LPT,LP)=STR$(H$(LPT,11)):NEXT LPT
22381 GOSUB 40000
22385 LPRINT""
22387 LPRINT" _____ ";
22390 FOR M=1 TO N-1:LPRINT"_____ ";:NEXT M
22400 LPRINT""
22403 LINEA=18
22405 FOR L=1 TO T-1
22410 LINEA=LINEA+1
22415 LPRINT USING" \ \ \ \ \ "
\ \ \";L$(L,1),L$(L,2),L$(L,3),L$(L,4),L$(L,5),L$(L,6)
22420 NEXT L
22423 GOSUB 50000
22425 GOSUB 22450
22430 GOTO 22040
22450 LPRINT CHR$(27);"N";CHR$(TP-52)
22480 RETURN
22657 LP=0
22660 IF ILUMA=1 THEN LPRINT" a(µm) ";:LP=LP+1:FOR LPT=1 TO T-1:L$(LPT,LP)=STR$(H$(LPT,1)):NEXT LPT
22670 IF ILUMB=1 THEN LPRINT" b(µm) ";:LP=LP+1:FOR LPT=1 TO T-1:L$(LPT,LP)=STR$(H$(LPT,2)):NEXT LPT
22680 IF ILUMC=1 THEN LPRINT"Tr(dias) ";:LP=LP+1:FOR LPT=1 TO T-1:L$(LPT,LP)=STR$(H$(LPT,3)):NEXT LPT
22690 IF ILUMD=1 THEN LPRINT"Ta(dias) ";:LP=LP+1:FOR LPT=1 TO T-1:L$(LPT,LP)=STR$(H$(LPT,13)):NEXT LPT

```



```

40080 FOR FIN=1 TO LPT
40085 COMPR=5-LEN(L$(FIN,XXX)):COMP$=""
40090 FOR COMP=1 TO COMPR
40100 COMP$=COMP$+" "
40110 NEXT COMP
40120 L$(FIN,XXX)=COMP$+L$(FIN,XXX)
40130 NEXT FIN
40140 RETURN
40200 FOR FIN=1 TO LPT
40205 IF CO(FIN,XXX)=0 THEN L$(FIN,XXX)=L$(FIN,XXX)+".00"
40206 IF LEN(L$(FIN,XXX))-CO(FIN,XXX)=1 THEN L$(FIN,XXX)=L$(FIN,XXX)+"0"
40210 COMPR=8-LEN(L$(FIN,XXX)):COMP$=""
40220 FOR COMP=1 TO COMPR
40230 COMP$=COMP$+" "
40240 NEXT COMP
40250 L$(FIN,XXX)=COMP$+L$(FIN,XXX)
40255 NEXT FIN
40260 RETURN
50000 FOR LINA=LINEA TO 45:LPRINT:NEXT LINA
50010 OPEN"I",1,"T"+RIGHT$(STR$(X),LEN(STR$(X))-1)
50020 FOR XY=1 TO 100
50025 INPUT#1,DAT$:IF DAT$="F" THEN GOTO 50030
50028 NEXT XY
50030 FOR XY=1 TO 30:INPUT#1,AJ$(XY):NEXT XY:CLOSE 1
50040 IF VAL(AJ$(1))<1 THEN AJ$(1)="0"+RIGHT$(STR$(INT(VAL(AJ$(1))*1000+.5)/1000),4):GOTO 50050
50045 AJ$(1)=STR$(INT(VAL(AJ$(1))*1000+.5)/1000)
50050 PRU=0
50051 FOR Y=1 TO LEN(AJ$(2))
50052 IF MID$(AJ$(2),Y,1)="D" THEN PRU=Y
50053 NEXT Y
50054 IF PRU=0 THEN GOTO 50060
50055 AJ$(25)=RIGHT$(AJ$(2),LEN(AJ$(2))-PRU):AJ$(25)=STR$(VAL(AJ$(25)))
50056 AJ$(2)=STR$((INT(-VAL(LEFT$(AJ$(2),PRU-1))*100)/100):AJ$(2)=RIGHT$(AJ$(2),LEN(AJ$(2))-1)+"-10":GOTO 50070
50060 IF VAL(AJ$(2))<1 THEN AJ$(2)=STR$(INT(VAL(AJ$(2))*1000+.5)/1000):AJ$(2)="0"+RIGHT$(AJ$(2),LEN(AJ$(2))-1):GOTO 50070
50065 AJ$(2)=STR$(INT(VAL(AJ$(2))*1000+.5)/1000)
50070 AJ$(3)=STR$(INT(VAL(AJ$(3))*1000+.5)/1000):AJ$(3)="0"+RIGHT$(AJ$(3),LEN(AJ$(3))-1)
50071 PRU2=0
50072 FOR Y=1 TO LEN(AJ$(14))
50073 IF MID$(AJ$(14),Y,1)="D" THEN PRU2=Y
50074 NEXT Y
50075 AJ$(26)=RIGHT$(AJ$(14),LEN(AJ$(14))-PRU2):AJ$(26)=STR$(VAL(AJ$(26)))
50076 AJ$(14)=STR$((INT(-VAL(LEFT$(AJ$(14),PRU2-1))*100)/100):AJ$(14)=RIGHT$(AJ$(14),LEN(AJ$(14))-1)+"-10"
50077 AJ$(15)=STR$(INT(VAL(AJ$(15))*1000+.5)/1000):AJ$(15)="0"+RIGHT$(AJ$(15),LEN(AJ$(15))-1)
50078 AJ$(13)=STR$(INT(-VAL(AJ$(13))*1000+.5)/1000):AJ$(13)="0"+RIGHT$(AJ$(13),LEN(AJ$(13))-1)
50080 AJ$(19)=STR$(INT(VAL(AJ$(19))*1000+.5)/1000):AJ$(19)="0"+RIGHT$(AJ$(19),LEN(AJ$(19))-1)

```

```

50090 PRU3=0
50091 FOR Y=1 TO LEN(AJ$(20))
50092 IF MID$(AJ$(20),Y,1)="D" THEN PRU3=Y
50093 NEXT Y
50094 IF PRU3=0 THEN GOTO 50097
50095 AJ$(27)=RIGHT$(AJ$(20),LEN(AJ$(20))-PRU3):AJ$(27)=STR$(VAL(AJ$(27)))
50096 AJ$(20)=STR$(INT(-VAL(LEFT$(AJ$(20),PRU3-1))*100)/100):AJ$(20)=RIGHT$(AJ
$(20),LEN(AJ$(20))-1)+"10":GOTO 50099
50097 IF VAL(AJ$(20))<1 THEN AJ$(20)=STR$(INT(VAL(AJ$(20))*1000+.5)/1000):AJ$(20
)="0"+RIGHT$(AJ$(20),LEN(AJ$(20))-1):GOTO 50099
50098 AJ$(20)=STR$(INT(VAL(AJ$(20))*1000+.5)/1000)
50099 AJ$(21)=STR$(INT(VAL(AJ$(21))*1000+.5)/1000):AJ$(21)="0"+RIGHT$(AJ$(21),LE
N(AJ$(21))-1)
50100 LPRINT "
CORREL.
"
50101 LPRINT "
"
50105 IF PRU<>0 THEN LPRINT "
Gompertz
A";CHR$(27);"S";CHR
$(1);"o";CHR$(27);"T";"=";AJ$(1);"
";"a=";AJ$(2);CHR$(27);"S";CHR$(0);AJ$(25);C
HR$(27);"T";"
";AJ$(3)
50106 IF PRU=0 THEN LPRINT "
Gompertz
A";CHR$(27);"S";CHR$(
1);"o";CHR$(27);"T";"=";AJ$(1);"
";"a=";AJ$(2);"
";AJ$(3)
50110 LPRINT
50120 IF LEN(AJ$(26))=2 THEN LPRINT "
Verhulst-Pearl
S=";AJ$(13
);"
";"D=";AJ$(14);CHR$(27);"S";CHR$(0);AJ$(26);CHR$(27);"T";"
";AJ$(15)
50121 IF LEN(AJ$(26))=3 THEN LPRINT "
Verhulst-Pearl
S=";AJ$(13
);"
";"D=";AJ$(14);CHR$(27);"S";CHR$(0);AJ$(26);CHR$(27);"T";"
";AJ$(15)
50130 LPRINT
50140 IF PRU3<>0 THEN LPRINT "
Bertalanffy
B=";AJ$(19);"
";
"B=";AJ$(20);CHR$(27);"S";CHR$(0);AJ$(27);CHR$(27);"T";"
";AJ$(21)
50150 IF PRU3=0 THEN LPRINT "
Bertalanffy
B=";AJ$(19);"
";
B="AJ$(20);"
";AJ$(21)
50160 RETURN
60000 CLS
60005 LOCATE 5,3:PRINT"DESDE LA TABLA NUMERO: _____":LOCATE 7,3:PRINT"HASTA LA T
ABLA NUMERO: _____":LOCATE 5,26:INPUT"",N1$:N1=VAL(N1$)
60010 IF N1=0 OR N1>5000 THEN GOTO 60005
60015 LOCATE 7,26:INPUT"",N2$:N2=VAL(N2$):IF N2<N1 OR N2>5000 THEN GOTO 60005
60020 LOCATE 23,1:COLOR 15:PRINT"Prepara la impresora y pulsa una tecla ":COLO
R 7:A$=INKEY$:IF A$="" THEN GOTO 60020
60030 X=N1-1
60040 X=X+1:IF X>N2 THEN GOTO 20000
60050 GOSUB 22900
60060 IF P=0 THEN GOTO 60040
60070 LPRINT:LPRINT:LPRINT"TABLA NUMERO: ";X;"
NOMBRE: ";LEFT$(NM$,J-1)
60080 LPRINT
60090 OPEN"I",1,"T"+RIGHT$(STR$(X),LEN(STR$(X))-1)
60100 FOR XY=1 TO 100
60110 INPUT#1,DAT$:IF DAT$="F" THEN GOTO 60130
60120 NEXT XY
60130 FOR XY=1 TO 30:INPUT#1,AJ$(XY):NEXT XY:CLOSE 1
60140 IF VAL(AJ$(1))<1 THEN AJ$(1)="0"+RIGHT$(STR$(INT(VAL(AJ$(1))*1000+.5)/1000
),4):GOTO 60150

```

```

60145 AJ$(1)=STR$(INT(VAL(AJ$(1))*1000+.5)/1000)
60150 PRU=0
60151 FOR Y=1 TO LEN(AJ$(2))
60152 IF MID$(AJ$(2),Y,1)="D" THEN PRU=Y
60153 NEXT Y
60154 IF PRU=0 THEN GOTO 60160
60155 AJ$(25)=RIGHT$(AJ$(2),LEN(AJ$(2))-PRU):AJ$(25)=STR$(VAL(AJ$(25)))
60156 AJ$(2)=STR$((INT(-VAL(LEFT$(AJ$(2),PRU-1))*100)/100):AJ$(2)=RIGHT$(AJ$(2),
LEN(AJ$(2))-1)+"·10":GOTO 60170
60160 IF VAL(AJ$(2))<1 THEN AJ$(2)=STR$(INT(VAL(AJ$(2))*1000+.5)/1000):AJ$(2)="0
"+RIGHT$(AJ$(2),LEN(AJ$(2))-1):GOTO 60170
60165 AJ$(2)=STR$(INT(VAL(AJ$(2))*1000+.5)/1000)
60170 AJ$(3)=STR$(INT(VAL(AJ$(3))*1000+.5)/1000):AJ$(3)="0"+RIGHT$(AJ$(3),LEN(AJ
$(3))-1)
60171 PRU2=0
60172 FOR Y=1 TO LEN(AJ$(14))
60173 IF MID$(AJ$(14),Y,1)="D" THEN PRU2=Y
60174 NEXT Y
60175 AJ$(26)=RIGHT$(AJ$(14),LEN(AJ$(14))-PRU2):AJ$(26)=STR$(VAL(AJ$(26)))
60176 AJ$(14)=STR$((INT(-VAL(LEFT$(AJ$(14),PRU2-1))*100)/100):AJ$(14)=RIGHT$(AJ
$(14),LEN(AJ$(14))-1)+"·10"
60177 AJ$(15)=STR$(INT(VAL(AJ$(15))*1000+.5)/1000):AJ$(15)="0"+RIGHT$(AJ$(15),LE
N(AJ$(15))-1)
60178 AJ$(13)=STR$(INT(-VAL(AJ$(13))*1000+.5)/1000):AJ$(13)="0"+RIGHT$(AJ$(13),L
EN(AJ$(13))-1)
60180 AJ$(19)=STR$(INT(VAL(AJ$(19))*1000+.5)/1000):AJ$(19)="0"+RIGHT$(AJ$(19),LE
N(AJ$(19))-1)
60190 PRU3=0
60191 FOR Y=1 TO LEN(AJ$(20))
60192 IF MID$(AJ$(20),Y,1)="D" THEN PRU3=Y
60193 NEXT Y
60194 IF PRU3=0 THEN GOTO 60197
60195 AJ$(27)=RIGHT$(AJ$(20),LEN(AJ$(20))-PRU3):AJ$(27)=STR$(VAL(AJ$(27)))
60196 AJ$(20)=STR$((INT(-VAL(LEFT$(AJ$(20),PRU3-1))*100)/100):AJ$(20)=RIGHT$(AJ
$(20),LEN(AJ$(20))-1)+"·10":GOTO 60199
60197 IF VAL(AJ$(20))<1 THEN AJ$(20)=STR$(INT(VAL(AJ$(20))*1000+.5)/1000):AJ$(20
)="0"+RIGHT$(AJ$(20),LEN(AJ$(20))-1):GOTO 60199
60198 AJ$(20)=STR$(INT(VAL(AJ$(20))*1000+.5)/1000)
60199 AJ$(21)=STR$(INT(VAL(AJ$(21))*1000+.5)/1000):AJ$(21)="0"+RIGHT$(AJ$(21),LE
N(AJ$(21))-1)
60200 LPRINT " CORREL.
"
60201 LPRINT "
"
60205 IF PRU<>0 THEN LPRINT " Gompertz A";CHR$(27);"S";CHR
$(1);"o";CHR$(27);"T";"=";AJ$(1);" "; "a=";AJ$(2);CHR$(27);"S";CHR$(0);AJ$(25);C
HR$(27);"T";" " ;AJ$(3)
60206 IF PRU=0 THEN LPRINT " Gompertz A";CHR$(27);"S";CHR
(1);"o";CHR$(27);"T";"=";AJ$(1);" "; "a=";AJ$(2);" ";AJ$(3)
60210 LPRINT Verhulst-Pearl S= ";AJ$(13)
60220 IF LEN(AJ$(26))=2 THEN LPRINT " ";AJ$(15)
);" "; "D=";AJ$(14);CHR$(27);"S";CHR$(0);AJ$(26);CHR$(27);"T";"

```



```
60221 IF LEN(AJ$(26))=3 THEN LPRINT "          Verhulst-Pearl      S= ";AJ$(13
);" "; "D=";AJ$(14);CHR$(27);"S";CHR$(0);AJ$(26);CHR$(27);"T";"      ";AJ$(15)
60230 LPRINT
60240 IF PRU3<>0 THEN LPRINT "          Bertalanffy      B= ";AJ$(19);" ";
"B=";AJ$(20);CHR$(27);"S";CHR$(0);AJ$(27);CHR$(27);"T";"      ";AJ$(21)
60250 IF PRU3=0 THEN LPRINT "          Bertalanffy      B= ";AJ$(19);" ";
B="AJ$(20);"          ";AJ$(21)
60260 GOTO 60040
```

```

1 REM "representaciones gráficas"
2 DIM RX$(30):DIM RY$(30):DIM RRX$(11):DIM RRY$(11)
3 DIM H$(30,13)
5 CLS
6 GOTO 300
10 SCREEN 2
11 GOSUB 10000
20 PSET(100,0)
30 LINE -(100,190)
40 LINE -(605,190)
50 PSET (95,10):LINE -(100,10)
60 PSET (95,28):LINE -(100,28)
70 PSET (95,46):LINE -(100,46)
80 PSET (95,64):LINE -(100,64)
90 PSET (95,82):LINE -(100,82)
100 PSET (95,100):LINE -(100,100)
110 PSET (95,118):LINE -(100,118)
120 PSET (95,136):LINE -(100,136)
130 PSET (95,154):LINE -(100,154)
140 PSET (95,172):LINE -(100,172)
150 PSET (95,190):LINE -(100,190)
160 PSET (100,192):LINE -(100,190)
170 PSET (150,192):LINE -(150,190)
180 PSET (200,192):LINE -(200,190)
190 PSET (250,192):LINE -(250,190)
200 PSET (300,192):LINE -(300,190)
210 PSET (350,192):LINE -(350,190)
220 PSET (400,192):LINE -(400,190)
230 PSET (450,192):LINE -(450,190)
240 PSET (500,192):LINE -(500,190)
250 PSET (550,192):LINE -(550,190)
260 PSET (600,192):LINE -(600,190)
270 PSET (604,189)
271 PSET (604,191)
272 PSET (603,192)
273 PSET (603,188)
274 PSET (99,1)
275 PSET (98,2)
276 PSET (101,1)
277 PSET (102,2)
280 GOTO 1000
300 LOCATE 1,30:COLOR 15:PRINT"REPRESENTACIONES GRAFICAS":COLOR 7
301 FOR L=1 TO 80:LOCATE 3,L:PRINT"=":NEXT L
302 FOR L=1 TO 80:LOCATE 21,L:PRINT"=":NEXT L
303 FOR L=4 TO 20:LOCATE L,1:PRINT"||":NEXT L
304 FOR L=4 TO 20:LOCATE L,25:PRINT"||":NEXT L
305 FOR L=4 TO 20:LOCATE L,60:PRINT"||":NEXT L
306 FOR L=4 TO 20:LOCATE L,80:PRINT"||":NEXT L
307 LOCATE 3,25:PRINT"||":LOCATE 3,60:PRINT"||"
308 LOCATE 21,25:PRINT"||":LOCATE 21,60:PRINT"||"
309 LOCATE 3,1:PRINT"||":LOCATE 21,1:PRINT"||":LOCATE 3,80:PRINT"||":LOCATE 21,80:P
RINT"||"
310 LOCATE 4,3:PRINT"1. V frente a t"

```

```

310 LOCATE 4,3:PRINT"1. V frente a t"
320 LOCATE 6,3:PRINT"2. V/Vc frente a t"
330 LOCATE 8,3:PRINT"3. V/Vo frente a t"
340 LOCATE 10,3:PRINT"4. Ln(V) frente a t"
350 LOCATE 12,3:PRINT"5. Ln(V/Vc) frente a t"
360 LOCATE 14,3:PRINT"6. Ln(V/Vo) frente a t"
370 LOCATE 16,3:PRINT"7.  $\bar{e}$  frente a t"
380 LOCATE 18,3:PRINT"8.  $\bar{e}/\bar{e}c$  frente a t"
384 LOCATE 20,3:PRINT"9.  $\bar{e}/\bar{e}o$  frente a t"
386 LOCATE 6,27:PRINT"a) Ajuste ecuación Gompertziana"
388 LOCATE 10,27:PRINT"b) Ajuste diámetros equivalentes"
390 LOCATE 14,27:PRINT"c) Ajuste ecuación Verhulst-Pearl"
392 LOCATE 18,27:PRINT"d) Ajuste ecuación Bertalanffy"
394 LOCATE 8,62:PRINT"x) Tiempo real"
396 LOCATE 16,62:PRINT"y) Tiempo ajustado"
399 A$="":B$="":C$="":D$=""
400 LOCATE 23,1:COLOR 15:PRINT"Pulsa las opciones deseadas o Z para terminar":CO
LOR 7
410 A$=INKEY$:A=VAL(A$):IF A$="z" OR A$="Z" THEN GOTO 1960
415 IF A$="" THEN GOTO 410
420 IF A<1 THEN GOTO 410
430 GOSUB 5000
432 B$=INKEY$:IF B$<>"a" AND B$<>"A" AND B$<>"b" AND B$<>"B" AND B$<>"c" AND B$<
>"c" AND B$<>"d" AND B$<>"D" THEN GOTO 432
434 IF B$="" THEN GOTO 432
436 GOSUB 6000
444 C$=INKEY$:IF C$="" THEN GOTO 444
445 IF C$<>"x" AND C$<>"X" AND C$<>"y" AND C$<>"Y" THEN GOTO 445
447 GOSUB 6100
448 LOCATE 23,1:PRINT"
449 LOCATE 23,1:COLOR 15:PRINT"Es correcto S/N":COLOR 7
450 D$=INKEY$:IF D$="" THEN GOTO 450
451 IF D$<>"S" AND D$<>"s" THEN GOTO 310
452 CLS:LOCATE 3,5:PRINT"TABLA NUMERO: _____":LOCATE 3,18:INPUT"N",N:N=VAL(N):IF
N=0 OR N>5000 THEN GOTO 452
453 GOSUB 7000
460 OPEN"I".1,"DT"+N$
470 FOR RP=1 TO 30
480 FOR RC=1 TO 13
490 INPUT#1,H$(RP,RC):IF H$(RP,RC)=-1 THEN CLOSE 1:GOTO 520
500 NEXT RC
510 NEXT RP
520 IF A=1 THEN GY=5
521 IF A=2 THEN GY=7
522 IF A=3 THEN GY=6
523 IF A=4 THEN GY=10
524 IF A=5 THEN GY=12
525 IF A=6 THEN GY=11
526 IF A=7 THEN GY=4
527 IF A=8 THEN GY=9
528 IF A=9 THEN GY=8
529 IF C$="x" OR C$="X" THEN GX=3
530 IF C$="y" OR C$="Y" THEN GX=13
540 FOR RC=1 TO RP-1

```

```

550 RY$(RC)=RIGHT$(STR$(H$(RC,GY)),LEN(STR$(H$(RC,GY)))-1)
560 RX$(RC)=RIGHT$(STR$(H$(RC,GX)),LEN(STR$(H$(RC,GX)))-1)
570 NEXT RC
574 IF A=1 THEN H$(1,GY)=H$(1,GY)/10^6
575 MINY=H$(1,GY):MAXY=H$(1,GY)
580 FOR RC=2 TO RP-1
585 IF A=1 THEN H$(RC,GY)=H$(RC,GY)/10^6
590 IF H$(RC,GY)<MINY THEN MINY=H$(RC,GY)
595 IF H$(RC,GX)>MAXX THEN MAXX=H$(RC,GX)
600 IF H$(RC,GY)>MAXY THEN MAXY=H$(RC,GY)
610 NEXT RC
620 MINRX=0:MAXRX=INT(MAXX/10+1)*10
630 IF A<4 OR A>6 THEN MINRY=0:GOTO 650
640 MINRY=INT(MINY)
650 MAXRY=MINRY+INT((MAXY-MINRY)/(10^(LEN(STR$(INT(MAXY)-MINRY))-2))+1)*(10^(LEN
(STR$(INT(MAXY)-MINRY))-2))
655 INY=0:INX=0
660 FOR RC=1 TO 11
670 RRY$(RC)=RIGHT$(STR$(INT((MAXRY-INY)*10+.5)/10),LEN(STR$(INT((MAXRY-INY)*10+
.5)/10))-1)
680 RRX$(RC)=RIGHT$(STR$(INT((MAXRX-INX)*10+.5)/10),LEN(STR$(INT((MAXRX-INX)*10+
.5)/10))-1)
690 INY=INY+(MAXRY-MINRY)/10
700 INX=INX+(MAXRX-MINRX)/10
710 NEXT RC
711 FOR RC=1 TO 11
712 FOR PR=1 TO LEN(RRY$(RC))
713 IF MID$(RRY$(RC),PR,1)="." THEN RRY$(RC)=LEFT$(RRY$(RC),PR+1):GOTO 715
714 NEXT PR
715 FOR PR=1 TO LEN(RRX$(RC))
716 IF MID$(RRX$(RC),PR,1)="." THEN RRX$(RC)=LEFT$(RRX$(RC),PR+1):GOTO 718
717 NEXT PR
718 NEXT RC
720 OPEN "I",1,"T"+M$
730 FOR X=1 TO 1000
740 INPUT#1,DAT$
750 IF DAT$="F" THEN GOTO 770
760 NEXT X
770 IF B$="A" AND C$="x" THEN INPUT#1,AO$:INPUT#1,ALFA$:CLOSE 1
771 IF B$="a" AND C$="x" THEN INPUT#1,AO$:INPUT#1,ALFA$:CLOSE 1
772 IF B$="a" AND C$="y" THEN FOR X=1 TO 3:INPUT#1,DAT$:NEXT X:INPUT#1,AO$:INPUT#
1,ALFA$:CLOSE 1
774 IF B$="A" AND C$="y" THEN FOR X=1 TO 3:INPUT#1,DAT$:NEXT X:INPUT#1,AO$:INPUT#
1,ALFA$:CLOSE 1
775 IF B$="A" AND C$="x" THEN INPUT#1,AO$:INPUT#1,ALFA$:CLOSE 1
776 IF B$="a" AND C$="x" THEN INPUT#1,AO$:INPUT#1,ALFA$:CLOSE 1
777 IF B$="a" AND C$="y" THEN FOR X=1 TO 3:INPUT#1,DAT$:NEXT X:INPUT#1,AO$:INPUT#
1,ALFA$:CLOSE 1
778 IF B$="A" AND C$="y" THEN FOR X=1 TO 3:INPUT#1,DAT$:NEXT X:INPUT#1,AO$:INPUT#
1,ALFA$:CLOSE 1
780 IF B$="b" AND C$="x" THEN FOR X=1 TO 6:INPUT#1,DAT$:NEXT X:INPUT#1,AO$:INPUT#
1,ALFA$:CLOSE 1

```

```

781 IF B$="B" AND C$="X" THEN FOR X=1 TO 6: INPUT#1, DAT$: NEXT X: INPUT#1, AO$: INPUT#
1, ALFA$: CLOSE 1
782 IF B$="b" AND C$="X" THEN FOR X=1 TO 6: INPUT#1, DAT$: NEXT X: INPUT#1, AO$: INPUT#
1, ALFA$: CLOSE 1
783 IF B$="B" AND C$="X" THEN FOR X=1 TO 6: INPUT#1, DAT$: NEXT X: INPUT#1, AO$: INPUT#
1, ALFA$: CLOSE 1
784 IF B$="b" AND C$="Y" THEN FOR X=1 TO 9: INPUT#1, DAT$: NEXT X: INPUT#1, AO$: INPUT#
1, ALFA$: CLOSE 1
785 IF B$="B" AND C$="Y" THEN FOR X=1 TO 9: INPUT#1, DAT$: NEXT X: INPUT#1, AO$: INPUT#
1, ALFA$: CLOSE 1
786 IF B$="b" AND C$="Y" THEN FOR X=1 TO 9: INPUT#1, DAT$: NEXT X: INPUT#1, AO$: INPUT#
1, ALFA$: CLOSE 1
787 IF B$="B" AND C$="Y" THEN FOR X=1 TO 9: INPUT#1, DAT$: NEXT X: INPUT#1, AO$: INPUT#
1, ALFA$: CLOSE 1
790 IF B$="c" AND C$="X" THEN FOR X=1 TO 12: INPUT#1, DAT$: NEXT X: INPUT#1, AO$: INPUT
#1, ALFA$: CLOSE 1
791 IF B$="C" AND C$="X" THEN FOR X=1 TO 12: INPUT#1, DAT$: NEXT X: INPUT#1, AO$: INPUT
#1, ALFA$: CLOSE 1
792 IF B$="c" AND C$="X" THEN FOR X=1 TO 12: INPUT#1, DAT$: NEXT X: INPUT#1, AO$: INPUT
#1, ALFA$: CLOSE 1
793 IF B$="C" AND C$="X" THEN FOR X=1 TO 12: INPUT#1, DAT$: NEXT X: INPUT#1, AO$: INPUT
#1, ALFA$: CLOSE 1
794 IF B$="c" AND C$="Y" THEN FOR X=1 TO 15: INPUT#1, DAT$: NEXT X: INPUT#1, AO$: INPUT
#1, ALFA$: CLOSE 1
795 IF B$="C" AND C$="Y" THEN FOR X=1 TO 15: INPUT#1, DAT$: NEXT X: INPUT#1, AO$: INPUT
#1, ALFA$: CLOSE 1
796 IF B$="c" AND C$="Y" THEN FOR X=1 TO 15: INPUT#1, DAT$: NEXT X: INPUT#1, AO$: INPUT
#1, ALFA$: CLOSE 1
797 IF B$="C" AND C$="Y" THEN FOR X=1 TO 15: INPUT#1, DAT$: NEXT X: INPUT#1, AO$: INPUT
#1, ALFA$: CLOSE 1
800 IF B$="d" AND C$="X" THEN FOR X=1 TO 18: INPUT#1, DAT$: NEXT X: INPUT#1, AO$: INPUT
#1, ALFA$: CLOSE 1
801 IF B$="D" AND C$="X" THEN FOR X=1 TO 18: INPUT#1, DAT$: NEXT X: INPUT#1, AO$: INPUT
#1, ALFA$: CLOSE 1
802 IF B$="d" AND C$="X" THEN FOR X=1 TO 18: INPUT#1, DAT$: NEXT X: INPUT#1, AO$: INPUT
#1, ALFA$: CLOSE 1
803 IF B$="D" AND C$="X" THEN FOR X=1 TO 18: INPUT#1, DAT$: NEXT X: INPUT#1, AO$: INPUT
#1, ALFA$: CLOSE 1
804 IF B$="d" AND C$="Y" THEN FOR X=1 TO 21: INPUT#1, DAT$: NEXT X: INPUT#1, AO$: INPUT
#1, ALFA$: CLOSE 1
805 IF B$="D" AND C$="Y" THEN FOR X=1 TO 21: INPUT#1, DAT$: NEXT X: INPUT#1, AO$: INPUT
#1, ALFA$: CLOSE 1
806 IF B$="d" AND C$="Y" THEN FOR X=1 TO 21: INPUT#1, DAT$: NEXT X: INPUT#1, AO$: INPUT
#1, ALFA$: CLOSE 1
807 IF B$="D" AND C$="Y" THEN FOR X=1 TO 21: INPUT#1, DAT$: NEXT X: INPUT#1, AO$: INPUT
#1, ALFA$: CLOSE 1
810 GOTO 10
1000 FOR CC=1 TO RP-1
1010 X=100+500/MAXRX*H$(CC, GX)
1020 Y=190-180/(MAXRY-MINRY)*(H$(CC, GY)-MINRY)
1030 CIRCLE (X, Y), 3

```

```

1040 NEXT CC
1042 IF B$="B" OR B$="b" THEN GOTO 1300
1043 IF B$="C" OR B$="c" THEN GOTO 1400
1044 IF B$="d" OR B$="D" THEN GOTO 1500
1045 IF T=2 THEN 1100
1050 FOR X=1 TO 500
1060 IF A=1 THEN Y=190-180/(MAXRY-MINRY)*H$(1,GY)*EXP(VAL(AO$)/(-VAL(ALFA$))*(1-EXP(VAL(ALFA$)*X*MAXRX/500)))
1061 IF A=2 THEN Y=190-180*H$(1,5)/((MAXRY-MINRY)*3000)*EXP(VAL(AO$)/(-VAL(ALFA$)))*(1-EXP(VAL(ALFA$)*X*MAXRX/500)))
1062 IF A=3 THEN Y=190-180/(MAXRY-MINRY)*EXP(VAL(AO$)/(-VAL(ALFA$)))*(1-EXP(VAL(ALFA$)*X*MAXRX/500)))
1063 IF A=4 THEN Y=190-180/(MAXRY-MINRY)*(LOG(H$(1,5)*EXP(VAL(AO$)/(-VAL(ALFA$)))*(1-EXP(VAL(ALFA$)*X*MAXRX/500))))-MINRY
1064 IF A=5 THEN Y=190-180/(MAXRY-MINRY)*(LOG((H$(1,5)/3000)*EXP(VAL(AO$)/(-VAL(ALFA$)))*(1-EXP(VAL(ALFA$)*X*MAXRX/500))))-MINRY
1065 IF A=6 THEN Y=190-180/(MAXRY-MINRY)*(LOG(EXP(VAL(AO$)/(-VAL(ALFA$)))*(1-EXP(VAL(ALFA$)*X*MAXRX/500))))-MINRY
1066 IF A=7 THEN Y=190-180/(MAXRY-MINRY)*((6/3.14159)*H$(1,5)*EXP(VAL(AO$)/(-VAL(ALFA$)))*(1-EXP(VAL(ALFA$)*X*MAXRX/500))))^(1/3)
1067 IF A=8 THEN Y=190-180/(MAXRY-MINRY)*((H$(1,5)/3000)*EXP(VAL(AO$)/(-VAL(ALFA$)))*(1-EXP(VAL(ALFA$)*X*MAXRX/500))))^(1/3)
1068 IF A=9 THEN Y=190-180/(MAXRY-MINRY)*(EXP(VAL(AO$)/(-VAL(ALFA$)))*(1-EXP(VAL(ALFA$)*X*MAXRX/500))))^(1/3)
1070 IF X=1 THEN PSET (X+100,Y)
1075 LINE -(X+100,Y)
1080 NEXT X
1090 GOTO 1900
1100 FOR X=1 TO 500
1110 IF A=1 THEN Y=190-180/(MAXRY-MINRY)*.003*EXP(VAL(AO$)/(-VAL(ALFA$)))*(1-EXP(VAL(ALFA$)*X*MAXRX/500)))
1111 IF A=2 THEN Y=190-180/(MAXRY-MINRY)*EXP(VAL(AO$)/(-VAL(ALFA$)))*(1-EXP(VAL(ALFA$)*X*MAXRX/500)))
1112 IF A=3 THEN Y=190-180/(MAXRY-MINRY)*(3000/H$(1,5))*EXP(VAL(AO$)/(-VAL(ALFA$)))*(1-EXP(VAL(ALFA$)*X*MAXRX/500)))
1113 IF A=4 THEN Y=190-180/(MAXRY-MINRY)*(LOG(3000*EXP(VAL(AO$)/(-VAL(ALFA$)))*(1-EXP(VAL(ALFA$)*X*MAXRX/500))))-MINRY
1114 IF A=5 THEN Y=190-180/(MAXRY-MINRY)*(LOG(EXP(VAL(AO$)/(-VAL(ALFA$)))*(1-EXP(VAL(ALFA$)*X*MAXRX/500))))-MINRY
1115 IF A=6 THEN Y=190-180/(MAXRY-MINRY)*(LOG((3000/H$(1,5))*EXP(VAL(AO$)/(-VAL(ALFA$)))*(1-EXP(VAL(ALFA$)*X*MAXRX/500))))-MINRY
1116 IF A=7 THEN Y=190-180/(MAXRY-MINRY)*((6/3.14159)*3000*EXP(VAL(AO$)/(-VAL(ALFA$)))*(1-EXP(VAL(ALFA$)*X*MAXRX/500))))^(1/3)
1117 IF A=8 THEN Y=190-180/(MAXRY-MINRY)*(EXP(VAL(AO$)/(-VAL(ALFA$)))*(1-EXP(VAL(ALFA$)*X*MAXRX/500))))^(1/3)
1118 IF A=9 THEN Y=190-180/(MAXRY-MINRY)*((3000/H$(1,5))*EXP(VAL(AO$)/(-VAL(ALFA$)))*(1-EXP(VAL(ALFA$)*X*MAXRX/500))))^(1/3)
1132 IF X=1 THEN PSET (X+100,Y)
1135 LINE -(X+100,Y)
1140 NEXT X
1200 GOTO 1900
1300 Y1=190-180/(MAXRY-MINRY)*VAL(ALFA$)
1310 Y2=190-180/(MAXRY-MINRY)*(VAL(ALFA$)+VAL(AO$)*MAXRX)

```

```

1320 LINE (100,Y1)-(600,Y2)
1330 GOTO 1900
1400 IF T=2 THEN GOTO 1450
1410 FOR X=1 TO 500
1420 IF A=1 THEN K=(-VAL(AO$)/(EXP(VAL(AO$)*X*MAXRX/500))*(-VAL(AO$)/(H$(1,5)*10^6)-VAL(ALFA$)+VAL(ALFA$))/10^6:Y=190-180/(MAXRY-MINRY)*K
1421 IF A=2 THEN K=(-VAL(AO$)/(EXP(VAL(AO$)*X*MAXRX/500))*(-VAL(AO$)/(H$(1,5))-VAL(ALFA$)+VAL(ALFA$)))/3000:Y=190-180/(MAXRY-MINRY)*K
1422 IF A=3 THEN K=(-VAL(AO$)/(EXP(VAL(AO$)*X*MAXRX/500))*(-VAL(AO$)/(H$(1,5))-VAL(ALFA$)+VAL(ALFA$)))/H$(1,5):Y=190-180/(MAXRY-MINRY)*K
1423 IF A=4 THEN K=LOG((-VAL(AO$)/(EXP(VAL(AO$)*X*MAXRX/500))*(-VAL(AO$)/(H$(1,5))-VAL(ALFA$)+VAL(ALFA$))):Y=190-180/(MAXRY-MINRY)*(K-MINRY)
1424 IF A=5 THEN K=LOG((-VAL(AO$)/(EXP(VAL(AO$)*X*MAXRX/500))*(-VAL(AO$)/(H$(1,5))-VAL(ALFA$)+VAL(ALFA$)))/3000):Y=190-180/(MAXRY-MINRY)*(K-MINRY)
1425 IF A=6 THEN K=LOG((-VAL(AO$)/(EXP(VAL(AO$)*X*MAXRX/500))*(-VAL(AO$)/(H$(1,5))-VAL(ALFA$)+VAL(ALFA$)))/H$(1,5)):Y=190-180/(MAXRY-MINRY)*(K-MINRY)
1426 IF A=7 THEN K=((VAL(AO$)/(EXP(VAL(AO$)*X*MAXRX/500))*(-VAL(AO$)/(H$(1,5))-VAL(ALFA$)+VAL(ALFA$)))*6/3.14159)^(1/3):Y=190-180/(MAXRY-MINRY)*K
1427 IF A=8 THEN K=((VAL(AO$)/(EXP(VAL(AO$)*X*MAXRX/500))*(-VAL(AO$)/(H$(1,5))-VAL(ALFA$)+VAL(ALFA$)))/3000)^(1/3):Y=190-180/(MAXRY-MINRY)*K
1428 IF A=9 THEN K=((VAL(AO$)/(EXP(VAL(AO$)*X*MAXRX/500))*(-VAL(AO$)/(H$(1,5))-VAL(ALFA$)+VAL(ALFA$)))/H$(1,5))^(1/3):Y=190-180/(MAXRY-MINRY)*K
1430 IF X=1 THEN PSET (X+100,Y)
1440 LINE -(X+100,Y)
1445 NEXT X:GOTO 1900
1450 FOR X=1 TO 500
1460 IF A=1 THEN Y=190-180/(MAXRY-MINRY)*(-VAL(AO$)/(EXP(VAL(AO$)*X*MAXRX/500))*(-VAL(AO$)/(3000)-VAL(ALFA$)+VAL(ALFA$)))/10^6
1461 IF A=2 THEN K=(-VAL(AO$)/(EXP(VAL(AO$)*X*MAXRX/500))*(-VAL(AO$)/(3000)-VAL(ALFA$)+VAL(ALFA$)))/3000:Y=190-180/(MAXRY-MINRY)*K
1462 IF A=3 THEN K=(-VAL(AO$)/(EXP(VAL(AO$)*X*MAXRX/500))*(-VAL(AO$)/(3000)-VAL(ALFA$)+VAL(ALFA$)))/H$(1,5):Y=190-180/(MAXRY-MINRY)*K
1463 IF A=4 THEN K=LOG((-VAL(AO$)/(EXP(VAL(AO$)*X*MAXRX/500))*(-VAL(AO$)/(3000)-VAL(ALFA$)+VAL(ALFA$))):Y=190-180/(MAXRY-MINRY)*(K-MINRY)
1464 IF A=5 THEN K=LOG((-VAL(AO$)/(EXP(VAL(AO$)*X*MAXRX/500))*(-VAL(AO$)/(3000)-VAL(ALFA$)+VAL(ALFA$)))/3000):Y=190-180/(MAXRY-MINRY)*(K-MINRY)
1465 IF A=6 THEN K=LOG((-VAL(AO$)/(EXP(VAL(AO$)*X*MAXRX/500))*(-VAL(AO$)/(3000)-VAL(ALFA$)+VAL(ALFA$)))/H$(1,5)):Y=190-180/(MAXRY-MINRY)*(K-MINRY)
1466 IF A=7 THEN K=((VAL(AO$)/(EXP(VAL(AO$)*X*MAXRX/500))*(-VAL(AO$)/(3000)-VAL(ALFA$)+VAL(ALFA$)))*6/3.14159)^(1/3):Y=190-180/(MAXRY-MINRY)*K
1467 IF A=8 THEN K=((VAL(AO$)/(EXP(VAL(AO$)*X*MAXRX/500))*(-VAL(AO$)/(3000)-VAL(ALFA$)+VAL(ALFA$)))/3000)^(1/3):Y=190-180/(MAXRY-MINRY)*K
1468 IF A=9 THEN K=((VAL(AO$)/(EXP(VAL(AO$)*X*MAXRX/500))*(-VAL(AO$)/(3000)-VAL(ALFA$)+VAL(ALFA$)))/H$(1,5))^(1/3):Y=190-180/(MAXRY-MINRY)*K
1470 IF X=1 THEN PSET (X+100,Y)
1480 LINE -(X+100,Y)
1490 NEXT X:GOTO 1900
1500 IF T=2 THEN GOTO 1550
1510 FOR X=1 TO 500
1520 IF A=1 THEN K=(H$(1,5))/(1-VAL(AO$))^3*(1-VAL(AO$)*EXP(VAL(ALFA$)*X*MAXRX/500))^3:Y=190-180/(MAXRY-MINRY)*K
1521 IF A=2 THEN K=(H$(1,5))/(3000*(1-VAL(AO$))^3*(1-VAL(AO$)*EXP(VAL(ALFA$)*X*MAXRX/500))^3:Y=190-180/(MAXRY-MINRY)*K

```

```

1522 IF A=3 THEN K=1/(1-VAL(AO$))^3*(1-VAL(AO$)*EXP(VAL(ALFA$)*X*MAXRX/500))^3:Y
=190-180/(MAXRY-MINRY)*K
1523 IF A=4 THEN K=LOG(H$(1,5))/(1-VAL(AO$))^3*(1-VAL(AO$)*EXP(VAL(ALFA$)*X*MAX
RX/500))^3-MINRY:Y=190-180/(MAXRY-MINRY)*K
1524 IF A=5 THEN K=LOG(H$(1,5))/(3000*(1-VAL(AO$))^3*(1-VAL(AO$)*EXP(VAL(ALFA$)
)*X*MAXRX/500))^3-MINRY:Y=190-180/(MAXRY-MINRY)*K
1525 IF A=6 THEN K=LOG(1/(1-VAL(AO$))^3*(1-VAL(AO$)*EXP(VAL(ALFA$)*X*MAXRX/500)
)^3)-MINRY:Y=190-180/(MAXRY-MINRY)*K
1526 IF A=7 THEN K=((6/3.14159)*H$(1,5)/(1-VAL(AO$))^3*(1-VAL(AO$)*EXP(VAL(ALFA$)
)*X*MAXRX/500))^3)^(1/3):Y=190-180/(MAXRY-MINRY)*K
1527 IF A=8 THEN K=(H$(1,5)/(3000*(1-VAL(AO$))^3*(1-VAL(AO$)*EXP(VAL(ALFA$)*X
*MAXRX/500))^3)^(1/3):Y=190-180/(MAXRY-MINRY)*K
1528 IF A=9 THEN K=(1/(1-VAL(AO$))^3*(1-VAL(AO$)*EXP(VAL(ALFA$)*X*MAXRX/500))^3)
^(1/3):Y=190-180/(MAXRY-MINRY)*K
1530 IF X=1 THEN PSET (X+100,Y)
1540 LINE -(X+100,Y)
1545 NEXT X:GOTO 1900
1550 FOR X=1 TO 500
1560 IF A=1 THEN K=(.003)/(1-VAL(AO$))^3*(1-VAL(AO$)*EXP(VAL(ALFA$)*X*MAXRX/500)
)^3:Y=190-180/(MAXRY-MINRY)*K
1561 IF A=2 THEN K=1/(1-VAL(AO$))^3*(1-VAL(AO$)*EXP(VAL(ALFA$)*X*MAXRX/500))^3:Y
=190-180/(MAXRY-MINRY)*K
1562 IF A=3 THEN K=3000/(H$(1,5)*(1-VAL(AO$))^3*(1-VAL(AO$)*EXP(VAL(ALFA$)*X*MA
XRX/500))^3:Y=190-180/(MAXRY-MINRY)*K
1563 IF A=4 THEN K=LOG(3000/(1-VAL(AO$))^3*(1-VAL(AO$)*EXP(VAL(ALFA$)*X*MAXRX/50
0))^3)-MINRY:Y=190-180/(MAXRY-MINRY)*K
1564 IF A=5 THEN K=LOG(1/(1-VAL(AO$))^3*(1-VAL(AO$)*EXP(VAL(ALFA$)*X*MAXRX/500)
)^3)-MINRY:Y=190-180/(MAXRY-MINRY)*K
1565 IF A=6 THEN K=LOG(3000/(H$(1,5)*(1-VAL(AO$))^3*(1-VAL(AO$)*EXP(VAL(ALFA$)*
X*MAXRX/500))^3)-MINRY:Y=190-180/(MAXRY-MINRY)*K
1566 IF A=7 THEN K=((6/3.14159)*3000/(1-VAL(AO$))^3*(1-VAL(AO$)*EXP(VAL(ALFA$)*X
*MAXRX/500))^3)^(1/3):Y=190-180/(MAXRY-MINRY)*K
1567 IF A=8 THEN K=(1/(1-VAL(AO$))^3*(1-VAL(AO$)*EXP(VAL(ALFA$)*X*MAXRX/500))^3)
^(1/3):Y=190-180/(MAXRY-MINRY)*K
1568 IF A=9 THEN K=(3000/(H$(1,5)*(1-VAL(AO$))^3*(1-VAL(AO$)*EXP(VAL(ALFA$)*X*MA
XRX/500))^3)^(1/3):Y=190-180/(MAXRY-MINRY)*K
1570 IF X=1 THEN PSET (X+100,Y)
1580 LINE -(X+100,Y)
1585 NEXT X:GOTO 1900
1900 LCOPY
1910 SCREEN 0
1920 LOCATE 23,1:COLOR 15:PRINT"Quieres hacer más representaciones S/N":COLOR 7
1930 Q$=INKEY$:IF Q$="" THEN GOTO 1930
1940 IF Q$="s" OR Q$="S" THEN FOR Q=1 TO 30:RX$(Q)="" :RY$(Q)="" :FOR QR=1 TO 13:H
$(Q,QR)=0:NEXT QR:NEXT Q:FOR Q=1 TO 11:RRX$(Q)="" :RRY$(Q)="" :NEXT Q:GOTO 5
1950 IF Q$<>"n" AND Q$<>"N" THEN GOTO 1930
1960 CHAIN "mercedes"
2000 PSET (X+1,Y-1)
2020 PSET (X+2,Y-2)
2030 PSET (X+2,Y-1)
2040 PSET (X+2,Y)
2050 PSET (X+2,Y+1)
2060 PSET (X+2,Y+2)

```



2090 RETURN  
2100 PSET (X,Y-1)  
2110 PSET (X+1,Y-2)  
2120 PSET (X+2,Y-2)  
2130 PSET (X+3,Y-1)  
2140 PSET (X+2,Y)  
2150 PSET (X+1,Y+1)  
2160 PSET (X,Y+2)  
2170 PSET (X+1,Y+2)  
2180 PSET (X+2,Y+2)  
2190 PSET (X+3,Y+2)  
2199 RETURN  
2200 PSET (X,Y-2)  
2210 PSET (X+1,Y-2)  
2220 PSET (X+2,Y-2)  
2230 PSET (X+3,Y-1)  
2240 PSET (X+2,Y)  
2250 PSET (X+1,Y)  
2260 PSET (X+3,Y+1)  
2270 PSET (X+2,Y+2)  
2280 PSET (X+1,Y+2)  
2290 PSET (X,Y+2)  
2299 RETURN  
2300 PSET (X+2,Y-2)  
2310 PSET (X+1,Y-1)  
2320 PSET (X+2,Y-1)  
2330 PSET (X,Y)  
2340 PSET (X+2,Y)  
2345 PSET (X,Y+1)  
2350 PSET (X+1,Y+1)  
2360 PSET (X+2,Y+1)  
2365 PSET (X+3,Y+1)  
2370 PSET (X+2,Y+2)  
2399 RETURN  
2400 PSET (X+3,Y-2)  
2410 PSET (X+2,Y-2)  
2420 PSET (X+1,Y-2)  
2430 PSET (X,Y-2)  
2440 PSET (X,Y-1)  
2445 PSET (X,Y)  
2450 PSET (X+1,Y)  
2460 PSET (X+2,Y)  
2470 PSET (X+3,Y+1)  
2480 PSET (X+2,Y+2)  
2490 PSET (X+1,Y+2)  
2492 PSET (X,Y+2)  
2499 RETURN  
2500 PSET (X+2,Y-2)  
2520 PSET (X+1,Y-2)  
2530 PSET (X,Y-1)  
2540 PSET (X,Y)  
2545 PSET (X,Y+1)  
2550 PSET (X+1,Y+2)

2560 PSET (X+2,Y+2)  
2570 PSET (X+3,Y+1)  
2580 PSET (X+2,Y)  
2590 PSET (X+1,Y)  
2599 RETURN  
2600 PSET (X,Y-2)  
2610 PSET (X+1,Y-2)  
2620 PSET (X+2,Y-2)  
2630 PSET (X+3,Y-2)  
2640 PSET (X+3,Y-1)  
2645 PSET (X+2,Y)  
2650 PSET (X+1,Y+1)  
2660 PSET (X,Y+2)  
2699 RETURN  
2700 PSET (X,Y-1)  
2710 PSET (X+1,Y-2)  
2720 PSET (X+2,Y-2)  
2730 PSET (X+3,Y-1)  
2740 PSET (X+2,Y)  
2745 PSET (X+1,Y)  
2750 PSET (X,Y+1)  
2755 PSET (X+3,Y+1)  
2770 PSET (X+1,Y+2)  
2780 PSET (X+2,Y+2)  
2799 RETURN  
2800 PSET (X+1,Y-2)  
2810 PSET (X+2,Y-2)  
2820 PSET (X+3,Y-1)  
2830 PSET (X,Y-1)  
2840 PSET (X+1,Y)  
2845 PSET (X+2,Y)  
2850 PSET (X+3,Y)  
2860 PSET (X+3,Y+1)  
2870 PSET (X+2,Y+2)  
2880 PSET (X+1,Y+2)  
2899 RETURN  
2900 PSET (X+1,Y-2)  
2910 PSET (X+2,Y-2)  
2920 PSET (X,Y-1)  
2930 PSET (X+3,Y-1)  
2940 PSET (X,Y)  
2945 PSET (X+3,Y)  
2950 PSET (X,Y+1)  
2960 PSET (X+3,Y+1)  
2970 PSET (X+1,Y+2)  
2980 PSET (X+2,Y+2)  
2999 RETURN  
3000 PSET (X+1,Y+2)  
3010 PSET (X+2,Y+2)  
3020 RETURN  
3100 PSET (X,Y-2)  
3110 PSET (X+1,Y-2)  
3120 PSET (X+2,Y-2)

```

3130 PSET (X+3,Y-2)
3135 PSET (X+4,Y-2)
3150 PSET (X+2,Y-1)
3160 PSET (X+1,Y)
3170 PSET (X+3,Y)
3180 PSET (X,Y+1)
3190 PSET (X+4,Y+1)
3200 PSET (X+1,Y+2)
3210 PSET (X+3,Y+2)
3220 PSET (X+2,Y+3)
3230 PSET (X,Y+4)
3240 PSET (X+1,Y+4)
3250 PSET (X+2,Y+4)
3260 PSET (X+3,Y+4)
3270 PSET (X+4,Y+4)
3280 RETURN
3300 PSET (X,Y+4)
3310 PSET (X,Y+3)
3320 PSET (X,Y+2)
3330 PSET (X,Y+1)
3335 PSET (X,Y)
3370 PSET (X+1,Y+3)
3380 PSET (X+2,Y+3)
3390 PSET (X+3,Y+3)
3400 PSET (X+4,Y+2)
3410 PSET (X+4,Y+1)
3420 PSET (X+4,Y)
3450 RETURN
5000 IF A=1 THEN COLOR 15:LOCATE 4,3:PRINT"1. V frente a t":COLOR 7
5010 IF A=2 THEN COLOR 15:LOCATE 6,3:PRINT"2. V/Vc frente a t":COLOR 7
5020 IF A=3 THEN COLOR 15:LOCATE 8,3:PRINT"3. V/Vo frente a t":COLOR 7
5030 IF A=4 THEN COLOR 15:LOCATE 10,3:PRINT"4. Ln(V) frente a t":COLOR 7
5040 IF A=5 THEN COLOR 15:LOCATE 12,3:PRINT"5. Ln(V/Vc) frente a t":COLOR 7
5050 IF A=6 THEN COLOR 15:LOCATE 14,3:PRINT"6. Ln(V/Vo) frente a t":COLOR 7
5060 IF A=7 THEN COLOR 15:LOCATE 16,3:PRINT"7.  $\phi$  frente a t":COLOR 7
5070 IF A=8 THEN COLOR 15:LOCATE 18,3:PRINT"8.  $\phi/\phi_c$  frente a t":COLOR 7
5080 IF A=9 THEN COLOR 15:LOCATE 20,3:PRINT"9.  $\phi/\phi_o$  frente a t":COLOR 7
5090 RETURN
6000 IF B$="a" OR B$="A" THEN COLOR 15:LOCATE 6,27:PRINT"a) Ajuste ecuación Gomp
ertziana":COLOR 7
6010 IF B$="b" OR B$="B" THEN COLOR 15:LOCATE 10,27:PRINT"b) Ajuste diámetros eq
uivalentes":COLOR 7
6020 IF B$="c" OR B$="C" THEN COLOR 15:LOCATE 14,27:PRINT"c) Ajuste ecuación Ver
hulst-Pearl":COLOR 7
6030 IF B$="d" OR B$="D" THEN COLOR 15:LOCATE 18,27:PRINT"d) Ajuste ecuación Ber
talanffy":COLOR 7
6040 RETURN
6100 IF C$="x" OR C$="X" THEN T=1:LOCATE 8,62:COLOR 15:PRINT"x) Tiempo real":COL
OR 7
6110 IF C$="y" OR C$="Y" THEN T=2:LOCATE 16,62:COLOR 15:PRINT"y) Tiempo ajustado
":COLOR 7
6120 RETURN
7000 OPEN"R",#2,"TABLAS",40

```

```

7010 FIELD#2,40 AS NMs
7020 GET#2,N
7030 NMs=NMs
7040 IF NMs<>" " THEN CLOSE 2:RETURN
7045 CLOSE 2:PRINT"ESTA TABLA NO EXISTE, QUIERES CONTINUAR? S/N"
7050 OPs=INKEY$:IF OPs="" THEN GOTO 7050
7060 IF OPs<>"s" AND OPs<>"S" AND OPs<>"n" AND OPs<>"N" THEN GOTO 7050
7070 IF OPs="s" OR OPs="S" THEN GOTO 300
7080 CHAIN"MERCEDES"
10000 IF A=1 THEN PRINT "Vx10- ";:X=39:Y=2:GOSUB 2500:PRINT"( m)";:X=62:GOSUB
3300:X=82:GOSUB 2200
10010 IF A=2 THEN PRINT " V/Vc";
10020 IF A=3 THEN PRINT " V/Vo";
10030 IF A=4 THEN PRINT " Ln(V)";
10040 IF A=5 THEN PRINT " Ln(V/Vc)";
10050 IF A=6 THEN PRINT " Ln(V/Vo)";
10060 IF A=7 THEN PRINT " ";:X=45:Y=2:GOSUB 3100:PRINT"( m)";:X=72:GOSUB
3300:PRINT"";
10070 IF A=8 THEN PRINT " / c";:X=55:Y=2:GOSUB 3100:X=73:GOSUB 3100
10080 IF A=9 THEN PRINT " / o";:X=55:Y=2:GOSUB 3100:X=73:GOSUB 3100
10100 FOR LONG=1 TO LEN(NMs)
10110 IF MID$(NMs, LONG, 1)="#" THEN GOTO 10200
10120 NEXT LONG
10200 PRINT" T:";N; " ";LEFT$(NMs, LONG-1)
10210 IF B$="a" OR B$="A" THEN PRINT " Aj. ec. Gompertz con ";
10220 IF B$="b" OR B$="B" THEN PRINT " Aj. diam. equiv. con ";
10230 IF B$="c" OR B$="C" THEN PRINT " Aj. ec. Verhulst-Pearl con ";
10240 IF B$="d" OR B$="D" THEN PRINT " Aj. ec. Bertalanffy con ";
10250 IF C$="x" OR C$="X" THEN PRINT"t. real"
10260 IF C$="y" OR C$="Y" THEN PRINT"t. ajustado"
10270 FOR X=1 TO 20:PRINT:NEXT X
10280 PRINT"
t(d)"
10290 Y=-8
10299 RC=0
10300 RC=RC+1:IF RC=12 THEN GOTO 10399
10310 Y=Y+18
10320 X=95-LEN(RRY$(RC))*5
10330 OY=OY+1:IF OY=LEN(RRY$(RC))+1 THEN OY=0:GOTO 10370
10340 IF MID$(RRY$(RC), OY, 1)="#" THEN GOSUB 3000:X=X+5:GOTO 10330
10350 IF MID$(RRY$(RC), OY, 1)="0" THEN GOSUB 2900:X=X+5:GOTO 10330
10360 IF MID$(RRY$(RC), OY, 1)="1" THEN GOSUB 2090:X=X+5:GOTO 10330
10361 IF MID$(RRY$(RC), OY, 1)="2" THEN GOSUB 2100:X=X+5:GOTO 10330
10362 IF MID$(RRY$(RC), OY, 1)="3" THEN GOSUB 2200:X=X+5:GOTO 10330
10363 IF MID$(RRY$(RC), OY, 1)="4" THEN GOSUB 2300:X=X+5:GOTO 10330
10364 IF MID$(RRY$(RC), OY, 1)="5" THEN GOSUB 2400:X=X+5:GOTO 10330
10365 IF MID$(RRY$(RC), OY, 1)="6" THEN GOSUB 2500:X=X+5:GOTO 10330
10366 IF MID$(RRY$(RC), OY, 1)="7" THEN GOSUB 2600:X=X+5:GOTO 10330
10367 IF MID$(RRY$(RC), OY, 1)="8" THEN GOSUB 2700:X=X+5:GOTO 10330
10368 IF MID$(RRY$(RC), OY, 1)="9" THEN GOSUB 2800:X=X+5:GOTO 10330
10370 GOTO 10300
10399 RC=12
10400 Y=197

```

```
10410 X=60
10420 RC=RC-1:IF RC=0 THEN GOTO 11500
10425 IF LEN(RRX$(RC))=1 THEN X=X+38
10426 IF LEN(RRX$(RC))=2 THEN X=X+35
10427 IF LEN(RRX$(RC))=3 THEN X=X+32
10430 OX=OX+1:IF OX=LEN(RRX$(RC))+1 THEN OX=0:GOTO 10470
10440 IF MID$(RRX$(RC),OX,1)="." THEN GOSUB 3000:X=X+5:GOTO 10430
10450 IF MID$(RRX$(RC),OX,1)="0" THEN GOSUB 2900:X=X+5:GOTO 10430
10460 IF MID$(RRX$(RC),OX,1)="1" THEN GOSUB 2000:X=X+5:GOTO 10430
10461 IF MID$(RRX$(RC),OX,1)="2" THEN GOSUB 2100:X=X+5:GOTO 10430
10462 IF MID$(RRX$(RC),OX,1)="3" THEN GOSUB 2200:X=X+5:GOTO 10430
10463 IF MID$(RRX$(RC),OX,1)="4" THEN GOSUB 2300:X=X+5:GOTO 10430
10464 IF MID$(RRX$(RC),OX,1)="5" THEN GOSUB 2400:X=X+5:GOTO 10430
10465 IF MID$(RRX$(RC),OX,1)="6" THEN GOSUB 2500:X=X+5:GOTO 10430
10466 IF MID$(RRX$(RC),OX,1)="7" THEN GOSUB 2600:X=X+5:GOTO 10430
10467 IF MID$(RRX$(RC),OX,1)="8" THEN GOSUB 2700:X=X+5:GOTO 10430
10468 IF MID$(RRX$(RC),OX,1)="9" THEN GOSUB 2800:X=X+5:GOTO 10430
10470 IF LEN(RRX$(RC))=1 THEN X=X+7
10475 IF LEN(RRX$(RC))=2 THEN X=X+5
10478 IF LEN(RRX$(RC))=3 THEN X=X+2
10480 GOTO 10420
10500 RETURN
11500 RETURN
20000 FOR X=1 TO 500
20010 Y=190-180/(MAXRY-MINRY)*(VAL(ALFA$)+VAL(AO$)*X*MAXRY/500)^3
20020 IF X=1 THEN PSET (X+100,Y)
20030 LINE -(X+100,Y)
20040 NEXT X
```