utilización de modelos biológicos sencillos -líneas celulares tumorales mamarias establecidas- que responden específicamente a la acción estrogénica a través de la estimulación de los procesos biosintéticos de ciertas proteínas y del incremento subsecuente de la proliferación celular (54,76,94,178).

Las funciones biológicas de las proteínas inducidas son, en muchos casos, desconocidas (63). Utilizando el procedimiento analítico de electroforesis unidimensional para proteínas, Notides y Gorski (218) fueron los primeros en descubrir la existencia de una "proteína" (IP) cuyos niveles se incrementaban en presencia de estradiol. La demostración de que esa sustancia estaba compuesta por una mezcla de proteínas, que podían ser separadas por procedimientos convencionales (195,240,264) condujo a la identificación de varios de sus componentes. Uno de ellos resultó ser la isoenzima tipo cerebral de la creatín-quinasa (BB-CK) que es una proteína reguladora de la concentración intracelular de ATP (240) y que fue considerada como clave en la respuesta trófica del útero a la hormona (195). En el útero de rata la IP se considera como un componente del citosol, puesto que se encuentra en el sobrenadante del homogeneizado del tejido uterino cuando se centrifuga a alta velocidad (105.000 g) (113). Sin embargo, en el tejido muscular esquelético la enzima creatín-quinasa se encuentra asociada con las proteínas del citoesqueleto (11,65) y esta asociación se ha demostrado también en líneas celulares de mamífero puestas en cultivo (91).

El citoesqueleto ha sido implicado en gran número de procesos celulares entre los que se incluyen la movilidad celular, los procesos de transferencia intracelular de macromoléculas, la coordinación de las actividades entre el núcleo y el citoplasma, los fenómenos de secreción e incluso la división celular (130) y se piensa (196) que, de acuerdo con su función de generador de energía, los incrementos en la isoenzima BB-CK derivados de la activación estrogénica, puedan estar relacionados con la estimulación hormonal de cualquiera de las funciones que se atribuyen al citoesqueleto. La demostración de la existencia de relación entre la BB-CK y la actina en el útero de rata estimulado "in vivo" con 17β-Estradiol apoya esta hipótesis (196).

Los efectos del 17β-Estradiol sobre la célula diana, en lo que a inducion de síntesis proteica se refiere, pueden ser esquematizados en la forma siguiente:

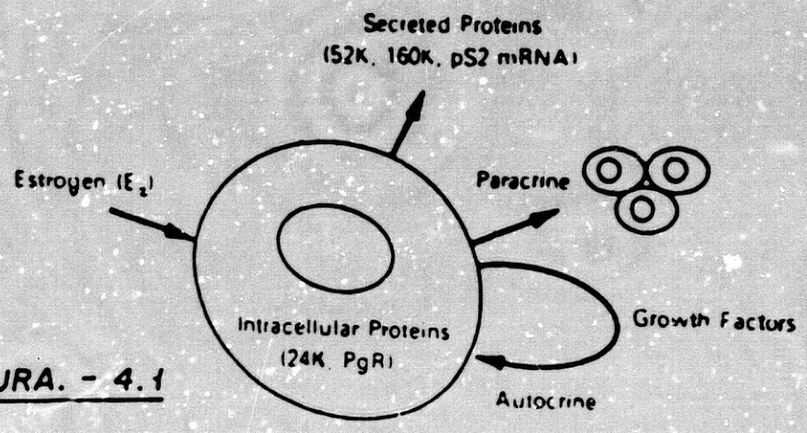


FIGURA. - 4.1

Esquema de la síntesis proteica inducida por el 17βE_2 (tomado de Lippman y col. (182)).

El conocimiento de la importancia del citoesqueleto en los procesos proliferativos celulares, la asociación existente entre las proteínas estrógeno-inducidas y los constituyentes macro-moleculares de esa estructura, la demostración de que el estradiol modifica de manera drástica el aspecto morfológico de las células blanco de la acción estrogénica (302) y, por último, la relación demostrada entre el antígeno polipeptídico tisular y el citoesqueleto celular (311) constituyen los pilares en que se apoya esta memoria de investigación cuya hipótesis de trabajo se enunció en el apartado 1.10.

Los resultados obtenidos (Tabla III-1 y III-2) demuestran que el antígeno polipeptídico tisular es detectable, por radioinmunoensayo, en el medio de cultivo de dos líneas celulares tumorales mamarias establecidas MCF-7 y EVSA-T, y que su concentración resulta dependiente de la densidad celular. En efecto, la representación gráfica de los niveles de TPA (en ordenadas) frente a la cantidad de DNA (en abscisas) (Figs. 4.2. y 4.3.), demuestra que entre ambas magnitudes existe una relación lineal. Utilizando el procedimiento de ajuste, por mínimos cuadrados, de los puntos experimentales a una recta es posible obtener los valores de los parámetros, pendiente y ordenada en el origen, que definen la relación entre el TPA y el número de células en el cultivo, expresado, éste último, en base a la cantidad de DNA observado.

LINEA CELULAR MCF-7.
TPA LIBERADO AL MEDIO DE CULTIVO.
RELACION CON LA DENSIDAD CELULAR.

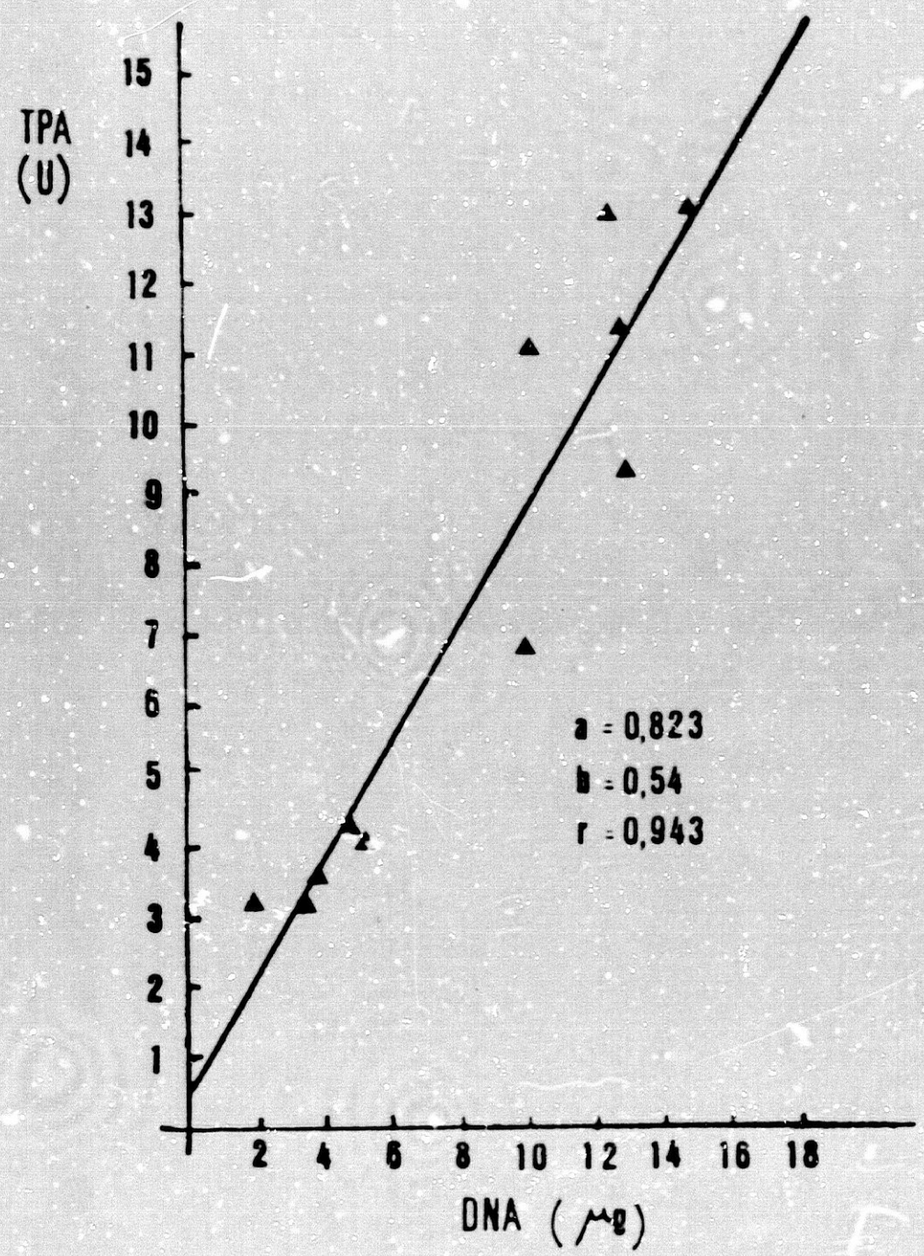


FIGURA. - 4.2

LINEA CELULAR EVSA-T.
TPA LIBERADO AL MEDIO DE CULTIVO.
RELACION CON LA DENSIDAD CELULAR.

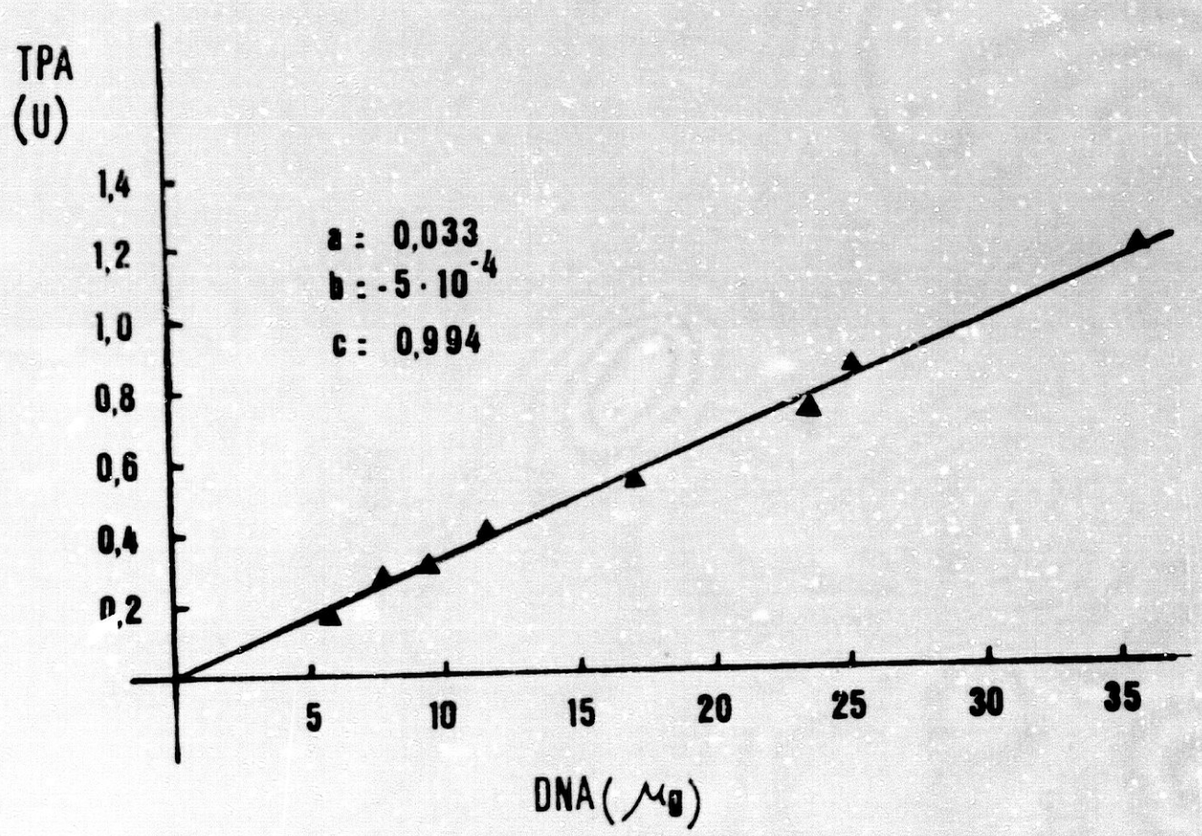


FIGURA. - 4.3

La ecuacion que liga la cantidad de TPA liberado al medio con el DNA cuantificado sobre el tapiz celular es, para la población celular MCF-7, la siguiente:

$$TPA = 0'823 \times [DNA] + 0'54$$

(El coeficiente de correlación estimado, $r = 0'943$, permite afirmar que la relación encontrada es estadísticamente significativa).

El resultado obtenido para el ajuste de los puntos experimentales correspondientes a la línea celular EVSA-T es, por otra parte, el siguiente:

$$TPA = 0'033 \times [DNA] - 0'0005$$

($r = 0'994$).

La pendiente de ambas ecuaciones indica la cantidad de antígeno polipeptídico tisular que se libera al medio de cultivo por cada µg de DNA. De la comparación de ambas pendientes es fácil deducir que la liberación de TPA al medio es aproximadamente 25 veces superior en la línea celular MCF-7 que en la línea EVSA-T.

Las determinaciones séricas de TPA, en enfermos de cáncer, han sido ampliamente utilizadas como test de

screening para el diagnóstico de recurrencia tumoral (24,29,294,295). El análisis de los resultados publicados en la última década pone claramente de manifiesto que, si bien el TPA tiene cierta utilidad como marcador tumoral en casi todos los procesos neoplásicos, la precisión diagnóstica, cuando el resultado del ensayo se compara con el verdadero estado de salud o enfermedad de los pacientes, dista en muchos casos del 100 %. El hallazgo descrito, que es común para éste y para otros marcadores tumorales, sugiere que las células del proceso maligno, con independencia de sus características histopatológicas expresan, sólo en ocasiones, determinados antígenos.

Estudios en los que se ha comparado, por otra parte, la forma celular y el citoesqueleto de las células de cáncer de mama (39) han demostrado la existencia de, al menos, tres patrones morfológicos caracterizados por: I.- Células pequeñas redondeadas con disminución aparente de la red de microtúbulos y microfilamentos; II.- Células de tipo intermedio que poseen microtúbulos cortos e irregulares y microfilamentos de actina; y III.- Células alargadas con extensas formaciones de microtúbulos largos y microfilamentos desordenados. La observación, aquí descrita, de diferencias importantes entre las cantidades de proteínas inmunológicamente relacionadas con el TPA y/o con las citoqueratinas (311), en el medio de cultivo de dos líneas celulares distintas no debe, por ello, resultar sorprendente.

4.2. PROLIFERACION CELULAR Y CINETICA DE LA LIBERACION DEL ANTIGENO POLIPEPTIDICO TISULAR

La velocidad de crecimiento de las células MCF-7 en cultivo puede ser modulada por numerosas sustancias entre las que se encuentran los estrógenos, antiestrógenos, glucocorticoides, progesterona y andrógenos (178,179,180), sustancias cuya acción es mediada por la presencia de receptores hormonales intracelulares (42,140). Sin embargo, cuando células procedentes de cáncer de mama humano RE (+) crecen en un medio nutriente suplementado con concentraciones óptimas de suero, insulina y otros factores de crecimiento, los esteroides parecen no ejercer ninguna acción que tenga como resultado la activación del ritmo mitótico del cultivo (156). Se ha observado, además, que la velocidad inicial de crecimiento de las células MCF-7 (150) resulta dependiente del número de células con el que se inicia el cultivo, hecho que puede estar en relación con la producción, por parte de las células, de factores autoestimuladores del crecimiento (181). En efecto, entre la densidad de siembra inicial y el tiempo de duplicación de las células MCF-7, medido en las primeras 72 horas de subcultivo, existe una relación estadísticamente cierta, definida por la ecuación (150):

$$y = -ax + b$$

en la que y = log. número de células sembradas
y x = tiempo de duplicación.

De cualquier forma, pasada la fase inicial del cultivo y en condiciones de densidad de siembra y aporte de nutrientes adecuados se alcanza un crecimiento celular que se ajusta, respecto al tiempo, a una curva exponencial. Sobre esa zona es posible deducir el parámetro que corresponde al tiempo de duplicación, T_D. Las variaciones encontradas para el valor T_D de unos experimentos a otros pueden considerarse mínimas (308). Efectivamente, dejando fuera del estudio los datos de crecimiento celular correspondientes a la fase "lag" inicial, hemos calculado el parámetro que caracteriza a la proliferación de las células MCF-7 en MEM + 10% de FCS a partir de los resultados recogidos en la tabla III-3. El ajuste, por mínimos cuadrados, de los puntos experimentales -(DNA, t)- a la ecuación ln DNA f(t) (Fig. 4.4) nos ofrece el siguiente resultado:

$$y = 0'494 + 0'409 \times x; \qquad (r=0'999)$$

donde $y = \ln [DNA]$
y $x =$ tiempo.

El tiempo de duplicación celular ha sido, finalmente, calculado mediante el uso de la ecuación siguiente:

$$T_D = \frac{\ln 2}{K} = \frac{0'693}{0'409} = 1'69 \text{ días} = 40'7 \text{ horas}$$

Este valor de T_D = 40'7 horas está de acuerdo con el resultado obtenido por otros autores (15,308,312) y corresponde también con el descrito por Jakesz y col.

CRECIMIENTO DE MCF-7
EN MEM + FCS.

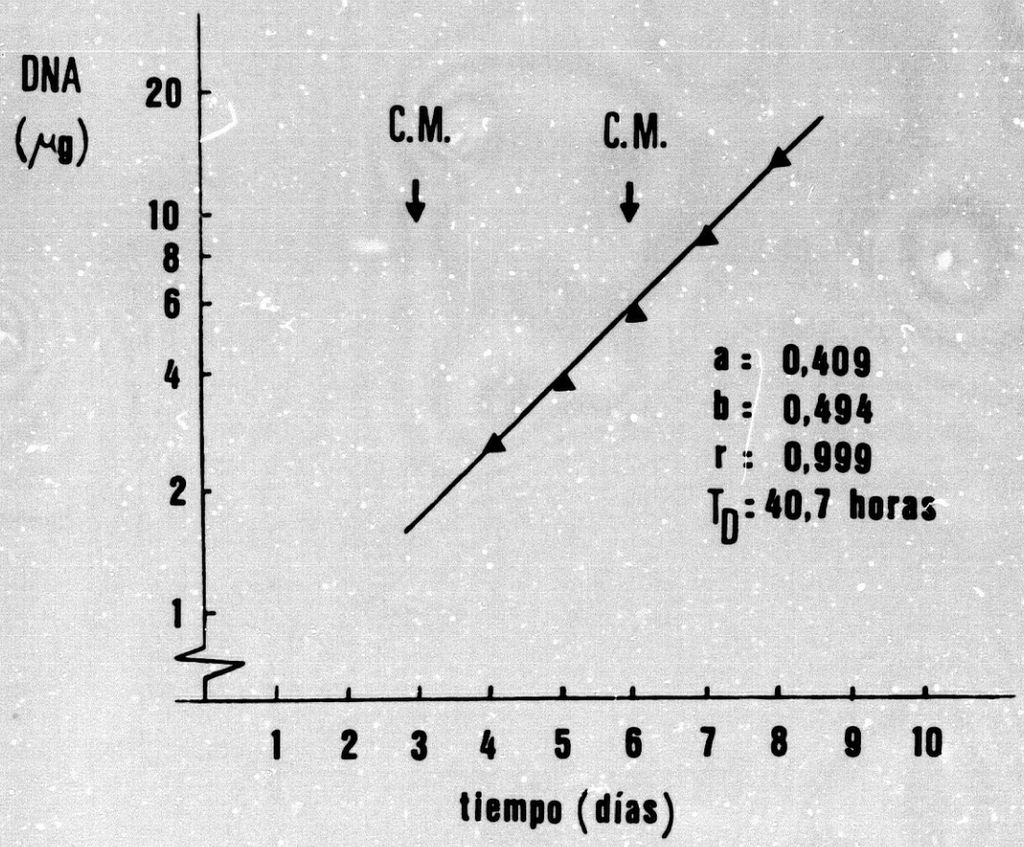


FIGURA. - 4.4

(150) cuando la densidad de siembra inicial se ajusta a 10^5 células.

La liberación de antígeno TPA al medio de cultivo (Tabla III-3) puede someterse al mismo tratamiento (Fig. 4.5). La ecuación que rige la liberación del TPA en función del tiempo a resultado ser, en este sentido, la siguiente:

$$y = 0'455 + 0'425 \times x; \qquad (r = 1'000)$$

ecuación a partir de la cual es posible deducir el tiempo necesario, T_D, para que la cantidad de TPA liberado al medio de cultivo se duplique:

$$T_D = \frac{\ln 2}{K} = \frac{0'693}{0'425} = 1'63 \text{ días} = 39'1 \text{ horas}$$

valor prácticamente equivalente al que corresponde al T_D de las células MCF-7. Este resultado nos autoriza a concluir que la liberación de TPA correlaciona estrechamente con la proli-feración de los elementos celulares del cultivo.

De acuerdo con las ecuaciones que rigen la cinética de crecimiento de las células "in vitro" (apartado 1.6.4.2) podemos, ahora, deducir la fracción de crecimiento de la población celular MCF-7 en las condiciones de cultivo en monocapa definidas por la utilización de MEM + 10% FCS

CINETICA DE LA LIBERACION DE TPA AL MEDIO DE CULTIVO DE MCF-7.

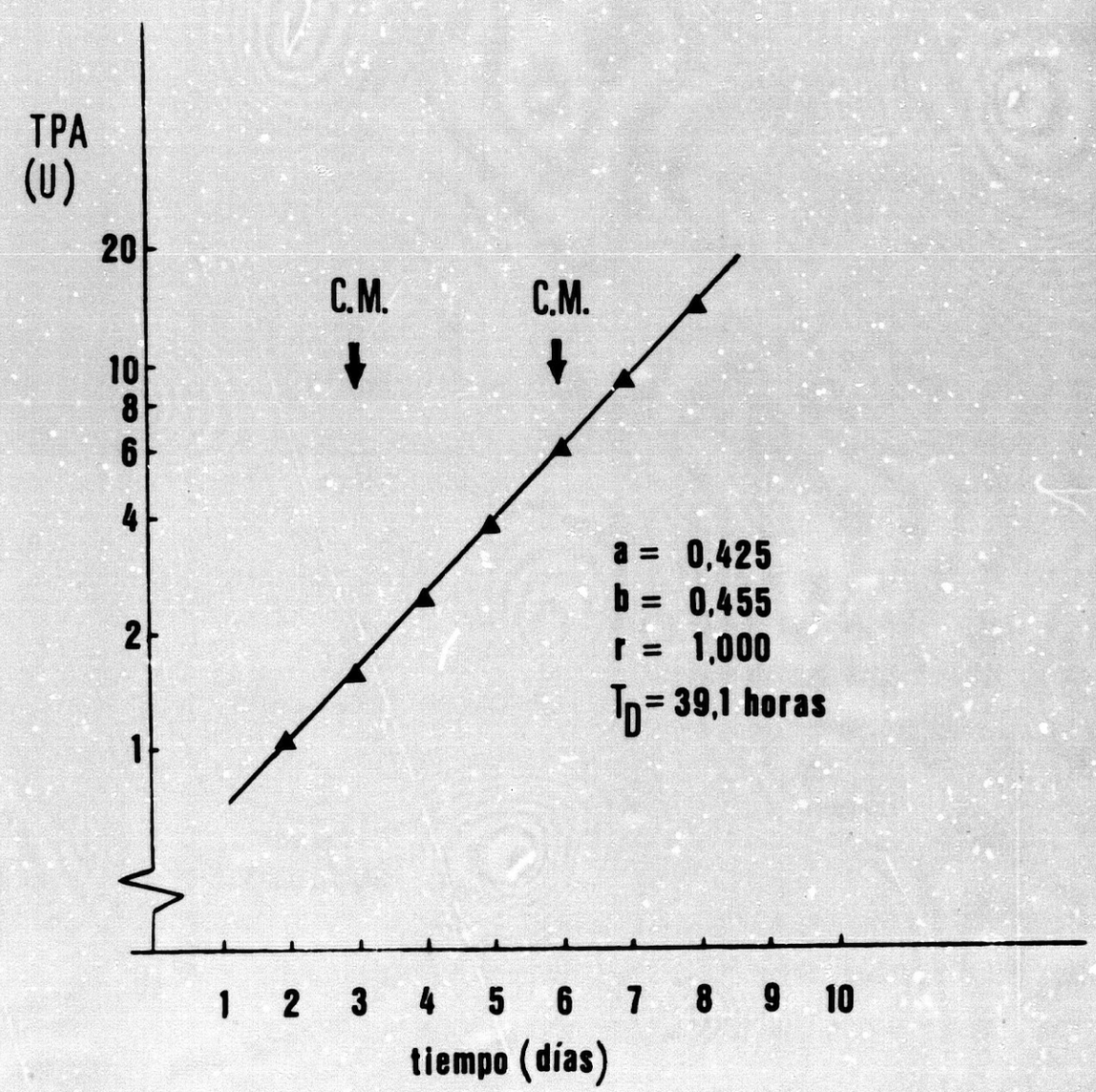


FIGURA. - 4.5

como medio nutriente: 37°C, 5% de CO_2 y 100% de humedad relativa. Para ello, utilizamos las ecuaciones:

$$K = \frac{\ln a}{Tc} \quad y \quad K = \frac{\ln 2}{T_D}$$

a = constante de valor comprendida entre 1 y 2.
Tc = Tiempo de ciclo.

Igualando los segundos términos queda:

$$\frac{\ln a}{Tc} = \frac{\ln 2}{T_D}$$

$$\ln a = \frac{Tc}{T_D} \times \ln 2$$

Conociendo el valor T_D = 40'7 horas y sabiendo que el tiempo de ciclo de las células MCF-7 es 21'9 horas (278) la fracción de crecimiento del cultivo resulta ser:

$$\ln a = \frac{21'9}{40'7} \times 0'693 = 0'373$$

$$a = 1'45$$

Fracción de crecimiento = a - 1 = 0'45

Este resultado nos indica que sólo el 45% de las células del cultivo se encuentran en el compartimento proliferativo. El resto, (55%), células quiescentes, no contribuye al crecimiento de la población.

El crecimiento de las células EVSA-T en MEM + 10% de FCS (Tabla III-4), en las mismas condiciones de temperatura y proporción de CO_2 y humedad que las utilizadas para MCF-7, aparece representado en la Figura 4.6. El ajuste de los puntos experimentales que se situan en la zona de crecimiento exponencial del cultivo a la ecuación $N = N_0 \times e^{kt}$ permite deducir, como en el caso de la línea MCF-7, los parámetros representativos de la proliferación celular. Así, los valores de la pendiente y de la ordenada en el origen correspondientes a los datos de la tabla III-4 son, respectivamente:

$$a = 0'522 \quad ; \quad b = 2'01 \quad ; \quad r = 0'994$$

El valor del coeficiente de correlación lineal, $r = 0'994$, autoriza a pensar que la cinética de crecimiento de la población celular EVSA-T se ajusta a la ecuación propuesta. El valor del tiempo de duplicación encontrado, $T_D = 31'8$ horas, se corresponde con el descrito para esta línea celular, tanto en nuestro laboratorio (308) como en otros centros (85).

La ecuación que rige la liberación de TPA al medio de cultivo (Fig. 4.7) en esta población ha resultado ser, por otra parte, la siguiente:

$$y = 0'065 + 0'523X; \quad (r = 0'994)$$

donde $y = \log [TPA]$ y X = tiempo

CRECIMIENTO DE EVSA-T
EN MEM + FCS.

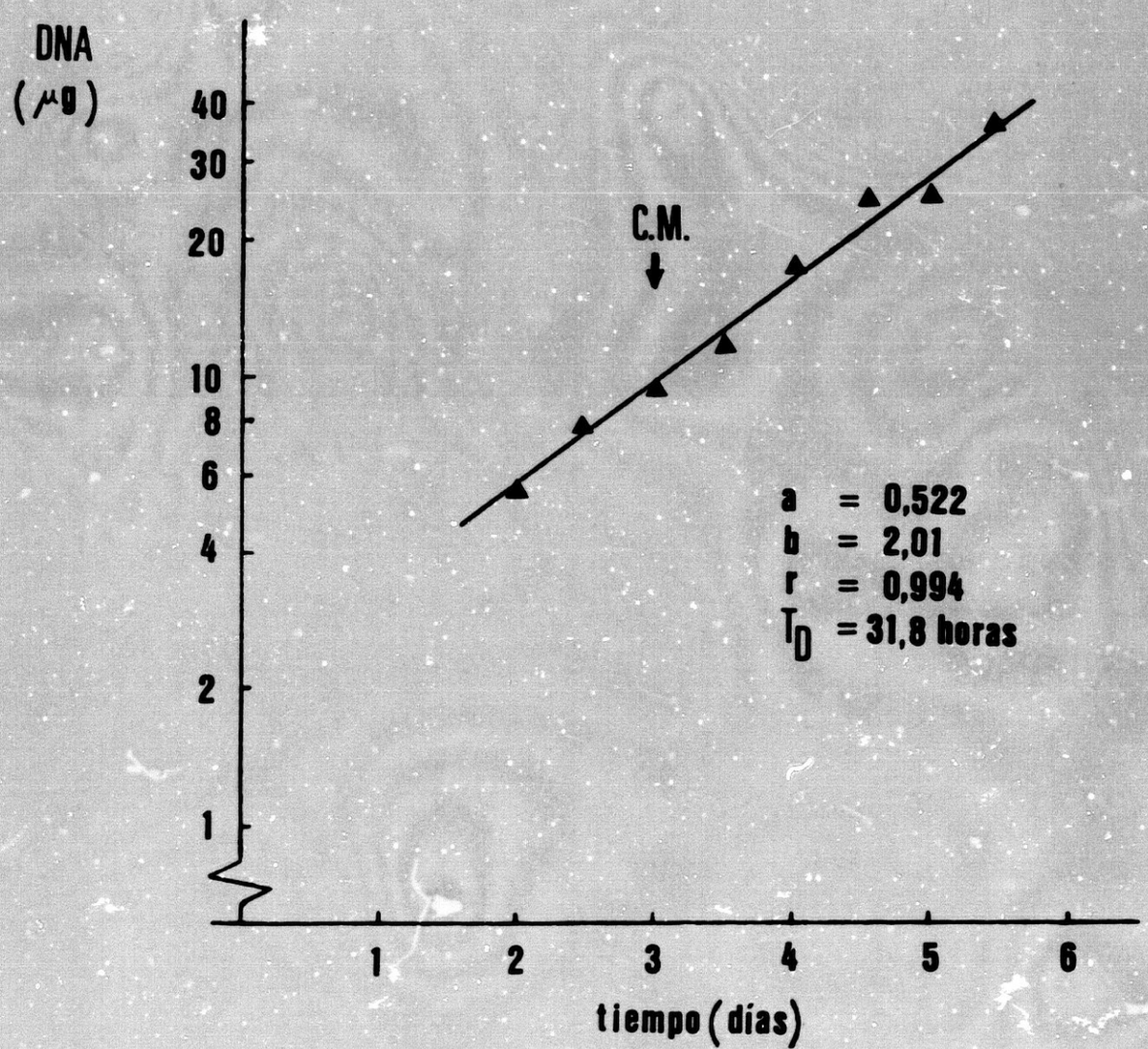


FIGURA. - 4.6

CINETICA DE LA LIBERACION DE TPA AL MEDIO DE CULTIVO DE EVSA-T.

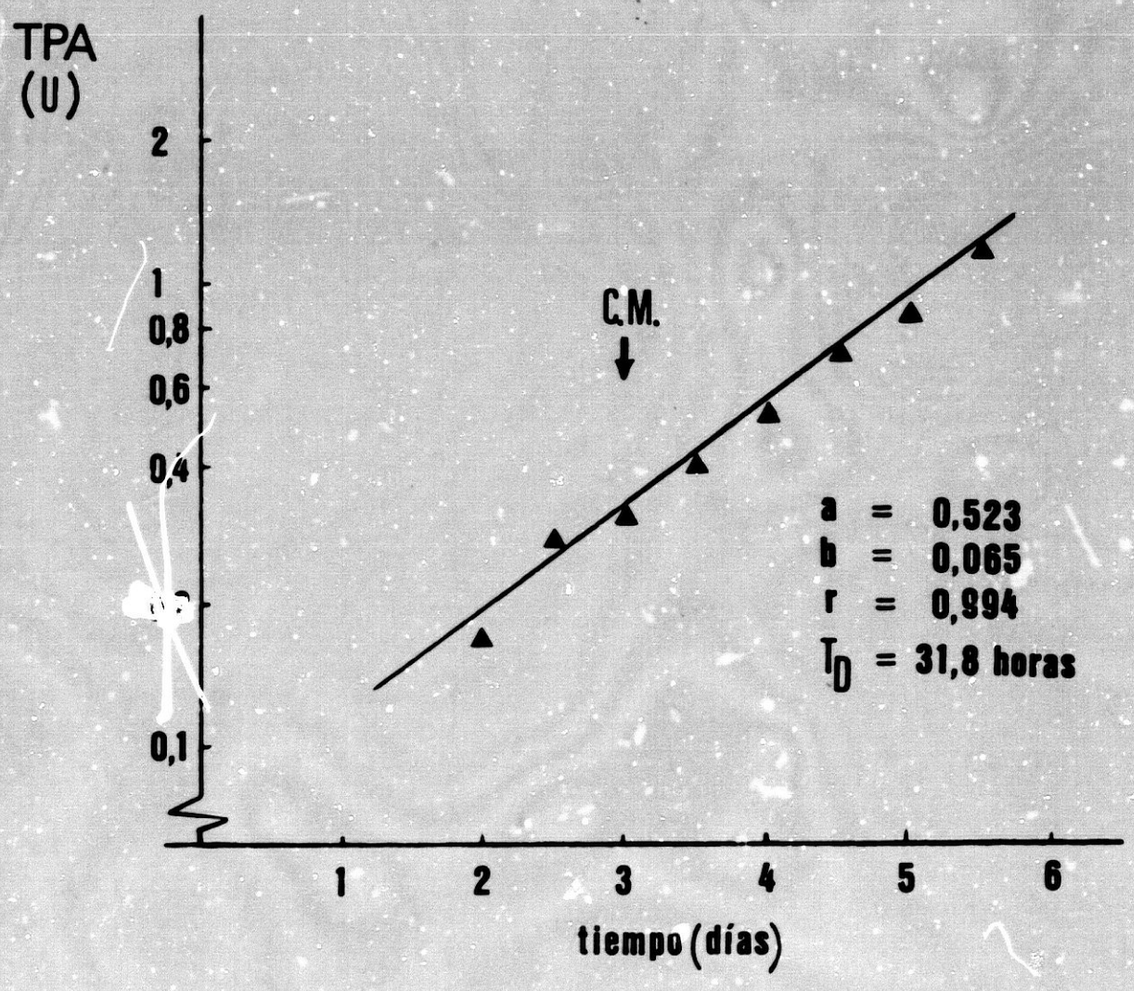


FIGURA . - 4.7

Como el cálculo del tiempo necesario para que la cantidad de TPA presente en el medio de cultivo se duplique, ha arrojado un valor de T_D = 31'8 horas, es posible concluir como en el caso de la población MCF-7, que la secreción de TPA por las células EVSA-T es un fenómeno que corre paralelo a la proliferación de la misma.

Conociendo, por último, el tiempo de ciclo de las células EVSA-T, medido a través de la distancia existente entre dos picos consecutivos de incorporación de timidina tritiada a células que progresan sincrónicamente, hemos deducido la fracción de células que contribuye al crecimiento de la población. Dicha fracción resulta ser:

$$\ln a = \frac{Tc}{T_D} \ln 2 \quad \frac{21}{31'8} \times 0'693 = 0'46$$

$$a = 1'58$$

Fracción de crecimiento = 1'58 - 1 = 0'58

Los resultados anteriores ponen de manifiesto: a) que si bien los tiempos de ciclo de las células MCF-7 y EVSA-T son prácticamente iguales, existen diferencias notables entre el tiempo de duplicación de una y otra línea celular; b) que las fracciones de crecimiento de una y otra población celular son distintas coincidiendo, como era lógico esperar, el menor Tiempo de Duplicación (31'8

noras) con la población de mayor Fracción de Crecimiento (EVSA-T).

4.3. LIBERACION DE TPA AL MEDIO DE CULTIVO. INFLUENCIA HORMONAL

Tanto estudios clínicos como experimentales han demostrado que es posible diferenciar en el cáncer de mama humano dos grandes grupos de tumores caracterizados por su contenido en receptor estrogénico (200). Aproximadamente, el 60% de los tumores que contienen RE responden a la terapia endocrina. La razón de la ausencia de respuesta en el resto de los casos RE(+) es desconocida (200). Quizás podría suponerse que los cánceres refractarios al tratamiento hormonal contienen receptores estrogénicos alterados que son incapaces de enlazarse con eficacia al locus aceptor responsable de la regulación del crecimiento celular. En cualquier caso, se ha pensado que la medida de diferentes sustancias cuya síntesis resulte potenciada o estimulada por el $17\beta E_2$ puede mejorar la caracterización de la hormonodependencia tumoral (194).

En tejidos normales "blanco" de la acción estrogénica, el estradiol regula la síntesis de determinadas proteínas tales como la ovalbúmina en el oviducto de pollo (55), proteína viteliogénica en el hígado de Xenopus (234) y la proteína inducida (218), glucosa-6-fosfato dehidrogenasa (267) y peroxidasa (83) en el útero de rata. La ovoalbúmina, en particular, constituye un marcador útil de la acción hormonal sobre el oviducto (55,201). En

comparación con estos datos, los estudios de regulación hormonal del cáncer de mama tropezaron con dificultades experimentales hasta que se consiguió el establecimiento de líneas celulares tumorales mamarias dotadas del sistema receptor estrogénico (270). El valor potencial de la investigación de este tipo de proteínas es doble (94). De un lado, en investigación clínica podrían configurarse como elementos predictivos de la hormonorrespuesta al tratamiento. De otro, en investigación básica, se dispondría de un producto final a través del cual sería posible cuantificar la magnitud del estímulo.

La primera demostración de la existencia de un "producto" -el receptor de progesterona- de la estimulacion estrogénica en cáncer de mama humano se debe a Horwitz y Mc Guire (142) que utilizaron como modelo biológico la línea celular MCF-7. Esta proteína se estudia hoy de manera rutinaria sobre los especímenes tumorales de cáncer mamario y ha resultado ser un "marcador" válido para la investigación de la sensibilidad del tumor a las hormonas. En efecto, la predicción de la respuesta positiva al tratamiento endocrino en los casos RE (+) - RPg (+), alcanza un porcentaje de aciertos claramente superior al que se consigue cuando se utiliza, como criterio exclusivo, la positividad del receptor estrogénico (224). Sin embargo, a causa de las dificultades que presenta el aislamiento y la purificación del RPg y, sobre todo, al hecho de que esta sustancia pertenezca al compartimento intracelular, parece necesario continuar las investigaciones encaminadas a descubrir alguna otra molécula útil.

Para investigar los efectos de los estrógenos 17βEstradiol (17βE_2), 17αEstradiol (17αE_2), Estrona (E_1), Dietilestilbestrol (DES) y el antiestrógeno Hidroxitamoxifeno - (OH-TAM) - sobre la liberación del antígeno polipeptídico tisular al medio de cultivo, hemos realizado el experimento cuyos resultados se especifican en la Tabla III-5. La representación en forma de histograma de los datos de esa tabla (Fig. 4.8) pone claramente de manifiesto que ninguna de las sustancia estrogénicas ensayadas, en las condiciones de cultivo descritas, modifica los niveles de DNA, es decir, no ejercen una acción proliferativa neta sobre la población MCF-7. Efectivamente, puede comprobarse por el examen simple del histograma de la Figura 4.8. que los resultados del experimento control (células MCF-7 no sometidas a ninguna acción hormonal exógena) coinciden con los encontrados en cada uno de los grupos experimentales.

La demostración de la existencia de un efecto estimulador directo del estradiol sobre la línea celular MCF-7 traducible por un incremento del número de células presentes en el cultivo, constituye un claro ejemplo de controversia científica. Los primeros datos ofrecidos por Lippman y col. (178) parecían demostrar que la hormona actuaba estimulando el crecimiento de la población. Sin embargo, distintos grupos de autores fueron incapaces de confirmar ese hallazgo (48,77,95,156). En nuestro laboratorio, la observación del estímulo proliferativo del 17βE_2 sobre la línea celular MCF-7 cultivada en MEM + FCS requiere ciertas condiciones especiales (308). Para el grupo de Leclercq (86), un factor de fundamental importancia lo constituye el suplemento del suero que se

INFLUENCIA DE HORMONAS Y ANTIHORMONAS SOBRE LA PROLIFERACION DE CELULAS MCF-7.

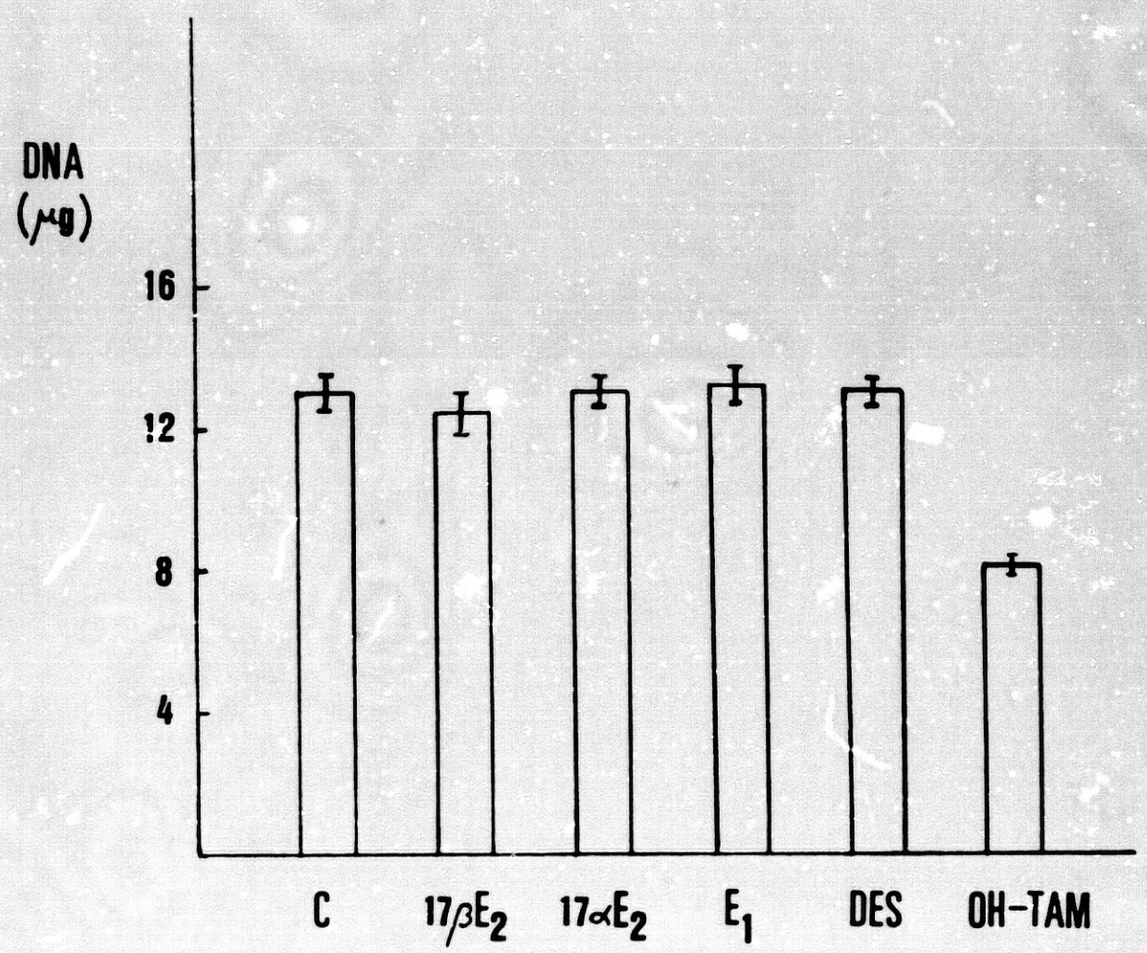


FIGURA. - 4.8

adiciona al medio sintético de cultivo. El efecto positivo del 17βE₂ se observa cuando las células MCF-7 crecen en un MEM suplementado con suero humano libre de esteroides (tratado con carbón-dextrano), pero no es posible objetivar, en respuesta al 17β un incremento en el número de células presente en los cultivos que se efectuan en MEM + FCS o MEM + NBCS (NBCS = suero de vaca recién nacida). Por estas razones se ha propuesto (86,87) que el efecto estimulador del estradiol sobre líneas celulares de cáncer de mama puestas en cultivo necesita de factores séricos intermediarios.

Por otra parte, distintos autores (15,54,76,163,176,212,216,262,312,315,316) han demostrado, tanto sobre MCF-7 como sobre otras líneas celulares de cáncer de mama RE(+) (T47D, CAMA-1, PCM42), la actividad del 17βE₂ como mitógeno. La hipótesis de que los estrógenos actúan, al menos parcialmente, induciendo la secreción de factores autoestimuladores del crecimiento celular se apoya en el trabajo del grupo de Rochefort (50,303,304,315), resultante del cual ha sido la identificación de una glicoproteína de peso molecular 52 Kdalton que reproduce parcialmente los efectos "in vitro" del E₂ sobre el crecimiento y sobre la forma de la superficie de las células MCF-7. El efecto proliferativo del estradiol es dosis-dependiente (378) y su influencia puede verse a niveles de concentración tan bajos como 10^{-12}M. Como quiera que el suero con el que se suplementa el medio de cultivo aporta estrógenos a este nivel de concentración, el tratamiento con carbón-dextrano para eliminar esta sustancia parece fundamental, aunque puede no ser suficiente, puesto que en el suero quedan moléculas

de estrógenos sulfo y gluco conjugados que, tras su transformación enzimática, son utilizadas por la célula MCF-7 (305).

En las condiciones experimentales de nuestro ensayo (cultivo en medio de MEM suplementado con 10% de FCS no tratado con carbón-dextrano) los esteroides endógenos procedentes del suero fetal activan a la población de células MCF-7 a su máximo nivel de proliferación hasta tal punto que el 17βE$_2$ que se adiciona como suplemento (10^{-7}M) no parece ejercer, respecto al grupo control, ninguna acción inductora del crecimiento. Sin embargo, utilizando las mismas condiciones de cultivo, se ha demostrado que la hormona potencia la incorporación del nucleósido timidina tritiada (^{3}HTdR) a células MCF-7 en una forma dependiente de la dosis de 17βE$_2$ (156,183,225,308,312).

Por otra parte, los niveles de TPA cuantificados en el medio de cultivo de las células MCF-7 expuestas a la acción de 17βE$_2$, 17αE$_2$, E$_1$ y DES, no difieren de los que se determinan en el medio de cultivo del grupo celular control (Fig. 4.9.). De aquí podría deducirse que el antígeno polipeptídico tisular es una proteína cuya secreción no resulta modulada por la presencia de sustancias hormonales de acción estrogénica.

En los histogramas de las Figuras 4.8. y 4.9. se incluyen los resultados del efecto que el antiestrógeno OH-TAM ejerce sobre el crecimiento de la población celular y sobre la secreción del antígeno polipeptídico tisular.

INFLUENCIA DE HORMONAS Y ANTIHORMONAS SOBRE LA LIBERACION DE TPA EN LA LINEA CELULAR MCF-7.

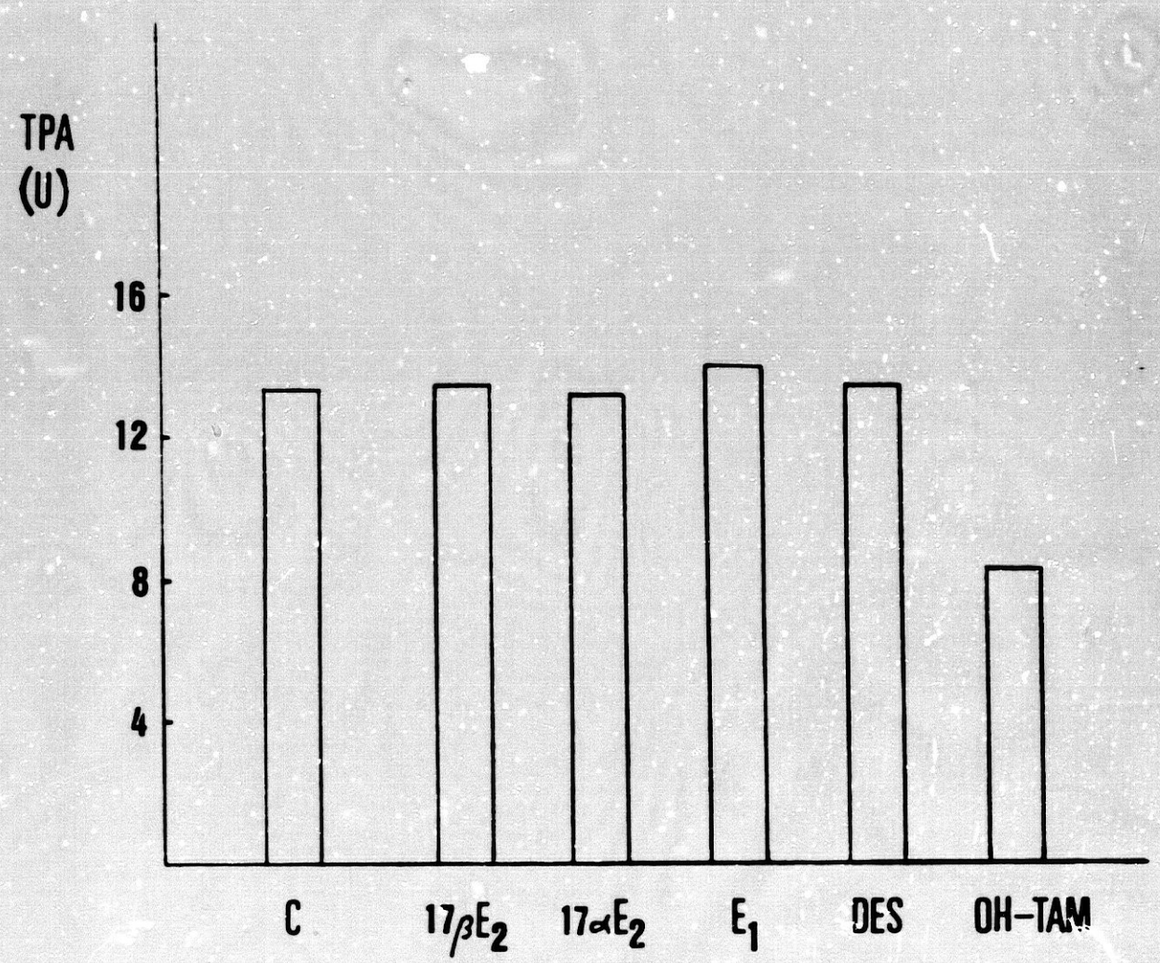


FIGURA.- 4.9

De la comparación de esos resultados con los que corresponden al experimento control, o a cualquiera de los experimentos en los que las células MCF-7 se han tratado con estrógenos, se deduce fácilmente que el OH-TAM inhibe la proliferación celular y la liberación de antígeno polipeptídico tisular. En efecto, tanto la cantidad de DNA como el TPA liberado se reducen aproximadamente al 60% respecto al control.

Es evidente que una manera indirecta de valorar la hormonodependencia de la línea celular ensayada consiste en comprobar los efectos que producen los antiestrógenos sobre su crecimiento. El tamoxifeno, que es una molécula cuya estructura química difiere de la que corresponde al grupo de los esteroides, posee una importante acción antiestrogénica y, como consecuencia de ella, se emplea con frecuencia en el tratamiento del cáncer de mama humano. La administración de tamoxifeno a dosis terapéuticas produce escasos efectos tóxicos sobre las pacientes (208) aproximándose los índices de respuesta obtenidos al 50% y 10% de los casos RE(+) y RE(-), respectivamente (208) (247).

Los primeros estudios que hacen referencia al metabolismo del tamoxifeno demostraron que, tanto el 4-hidroxi-tamoxifeno como el N-dimetil-tamoxifeno son sustancias que derivan de la transformación enzimática del fármaco (4,75,111,112,116). Ambas sustancias mantienen la capacidad antiestrogénica de la molécula original, pero el OH-TAM posee una acción más potente en lo que a la

disminución de la capacidad proliferativa de células MCF-7 se refiere (239).

La actividad del OH-TAM como inhibidor de la proliferación celular en cultivos de células MCF-7 puede ser estadísticamente valorada utilizando el test de Cochran para la comparación de medias.

El procedimiento consiste en calcular la expresión:

$$texp = \frac{|X_1 - X_2|}{\sqrt{\frac{S^2_1}{n_1} + \frac{S^2_2}{n_2}}}$$

donde:

X_1 y X_2 = medias del Grupo Control y del OH-TAM.

S_1 y S_2 = varianzas del Grupo Control y del OH-TAM.

n_1 y n_2 = número de muestras del Grupo Control y del OH-TAM.

y puesto que $n_1 = n_2 = 5$, el resultado de texp se compara con el valor de t_α buscado en la tabla de Student para (n-1) grados de libertad.

Procediendo así, la comparación del crecimiento celular (en términos de DNA), en el Grupo de OH-TAM con el que se observa en el Grupo Control, ofrece el siguiente resultado:

$$texp = \frac{|\ 13 - 8'1\ |}{\sqrt{\frac{(0'5)^2}{5} + \frac{(0'2)^2}{5}}} = 20'3$$

de donde se deduce que la cantidad de células en uno y otro grupo difiere de manera estadísticamente cierta ($p < 0'001$). Este mismo razonamiento puede ser aplicado a los resultados de la cuantificación del TPA en el medio de cultivo celular. En este caso resulta:

$$texp = \frac{|\ 6692-4126\ |}{\sqrt{\frac{(301)^2}{5} + \frac{(180)^2}{5}}} = 16'4$$

y nuevamente se demuestra que las diferencias encontradas no son resultado del azar ($p < 0'001$).

4.4. PROLIFERACION CELULAR Y LIBERACION DE TPA TRAS SINCRONIZACION DEL CULTIVO

Se ha demostrado, en cáncer de mama clínico (279), en tejido endometrial humano (280) y de rata (280), en el hígado de rata (321) y en líneas celulares establecidas de cáncer de mama (206), la presencia de un receptor específico, distinto del RE, para los antiestrógenos del grupo del tamoxifeno. La concentración de esa proteína no está relacionada con el contenido intracelular de receptor estrogénico. Su función es desconocida pero se cree que no guarda relación con las modificaciones del crecimiento celular que inducen los antiestrógenos. Se ha sugerido, por ello, que el mecanismo responsable de los efectos antiproliferativos es el enlace del tamoxifeno al receptor de estrógenos (206). Dependiendo del nivel de concentración ensayado, los efectos del TAM pueden ser reversibles -con estradiol- o irreversibles (192). Los efectos reversibles se asocian con la acumulación de las células en la fase G_0/G_1 del ciclo mitótico (277). Los efectos irreversibles predominan a elevadas concentraciones de antiestrógeno en las que, esta sustancia, ejerce una acción citotóxica que induce la muerte celular (277). Existe, por último, un tercer mecanismo inhibitorio que parece no necesitar del concurso del receptor estrogénico y que, aunque no conduce a la citolisis celular, resulta irreversible al estradiol (277). Este hecho sugiere que ciertas acciones del TAM pueden ser independientes del carácter receptor estrogénico positivo o negativo de la línea celular -o el tumor clínico- sometida a tratamiento habiéndose demostrado a este respecto (125) que, sobre líneas

celulares RE(-), el TAM produce inhibición del crecimiento y acumulación de células en fase G_0/G_1.

Los estudios sobre cinética del ciclo celular en células MCF-7 han puesto de manifiesto que cuando los experimentos se inician con células selectivamente colectadas en fase de mitosis, utilizando para ello la técnica de Terasima y Tolmach (287,288), la mayor parte del cultivo (≃ 90-95 % respecto al total de células) se encuentra en fase G_1 para t = 1 hora después de la selección mitótica. Pasadas 7 horas, las células empiezan a abandonar este compartimento entrando progresivamente en fase de síntesis, alcanzando la proporción de elementos en fase S un valor cercano al 80%. Para 16 < t < 20 horas después de la selección, la mayor parte de las células ha completado la fase de síntesis y el período G_2/M finaliza 4 a 6 horas más tarde (285). El tiempo medio de cada una de las fases del ciclo celular, así como la duración media del tiempo necesario para que transcurra un ciclo mitótico completo, es de 9, 9,3 y 3 horas para G_1, S y G_2/M y 21,3 horas para Tc (285). Conjuntamente con esta población de células de rápida cinética, existen otros elementos celulares que no proliferan o lo hacen muy lentamente. La proporción de elementos de cinética lenta en el conjunto de la población es del orden del 15% (285). Estudiando los efectos de TAM sobre células MCF-7 sincrónicas, se ha podido demostrar que estas células son parcialmente sensibles a la acción del antiestrógeno cuando el cultivo se encuentra justamente en la fase G_1 (4 horas después de M). El período de máxima sensibilidad tiene una duración comprendida entre 2 y 4 horas y fuera del mismo el TAM ejerce una acción mínima. El tiempo de

transito por la fase G_1 para la subpoblación celular de cinética lenta se ha estimado en torno a las 30 horas (278). Cuando el antiestrógeno se ensaya a bajas dosis su efecto induce una alteración del "equilibrio" de distribución de las células MCF-7 entre dos estadios cinéticos (lento y rápido), haciendo predominante el número de células con largo tiempo de G_1 (278). Como resultado de este proceso tiene lugar la inhibición del crecimiento celular y la acumulación de células en fase G_1. Esta "sincronización" es máxima a los tres días del tratamiento con TAM (192).

El tratamiento secuencial del cultivo de células MCF-7 con OH-TAM 10^{-7}M. primero, durante 72 horas, y $17\beta E_2$, 10^{-7}M. después, constituye un procedimiento experimental mediante el cual es posible demostrar el efecto proliferativo que ejerce el $17\beta E_2$ sobre los elementos del cultivo utilizando incluso suero de feto de ternera no tratado con carbón-dextrano (221,307,308). En efecto, los resultados obtenidos en este trabajo (Fig. 4.10) confirman la observación anterior. Del estudio de esta gráfica parece deducirse que entre el grupo de células tratado con $17\beta E_2$ 10^{-7}M. y el grupo control, existen ciertas diferencias cuya comparación estadística utilizando el test de Cochran,

PROLIFERACION DE MCF-7 TRAS SINCRONIZACION (OH-TAM) Y RESCATE.

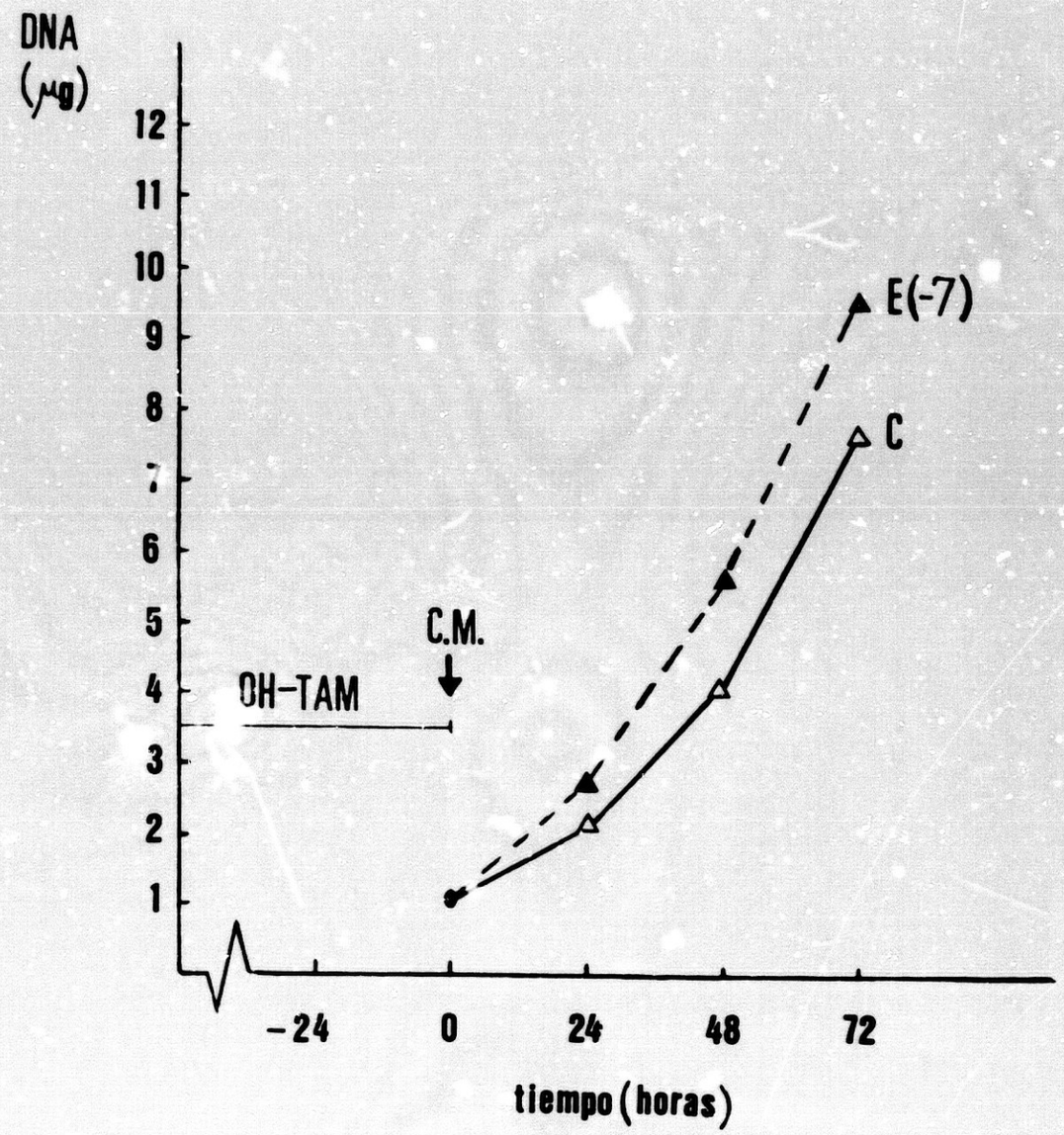


FIGURA. - 4.10

$$texp = \frac{|\ 9'6 - 7'6\ |}{\frac{(0'9)^2}{5} + \frac{(0'5)^2}{5}} = 4'36$$

$p < 0'02$

permite afirmar que el número de células existentes, a las 72 horas del cambio de medio, es superior en el grupo tratado con 17βE$_2$ que en el grupo control. La figura 4.11 ofrece, en forma gráfica, los resultados obtenidos para la cuantificación del antígeno polipeptídico tisular en los medios de cultivo de ambos grupos experimentales.

Utilizando la transformación semilogarítmica de los datos de crecimiento (Fig. 4.12) y de liberación de TPA (Fig. 4.13) es posible, por otra parte, deducir los parámetros que caracterizan la cinética de ambos procesos. Así, la ecuación que liga la cantidad de DNA con el tiempo resulta ser:

$$\ln [DNA] = 1'03 + 0'67 \times t; \qquad (r = 0'999)$$

para el Grupo Control "

$$\ln [DNA] = 1'13 + 0'75 \times t; \qquad (r = 0'990)$$

para el Grupo Estradiol.

LIBERACION DE TPA TRAS SINCRONIZACION DE MCF-7 (OH-TAM) Y RESCATE.

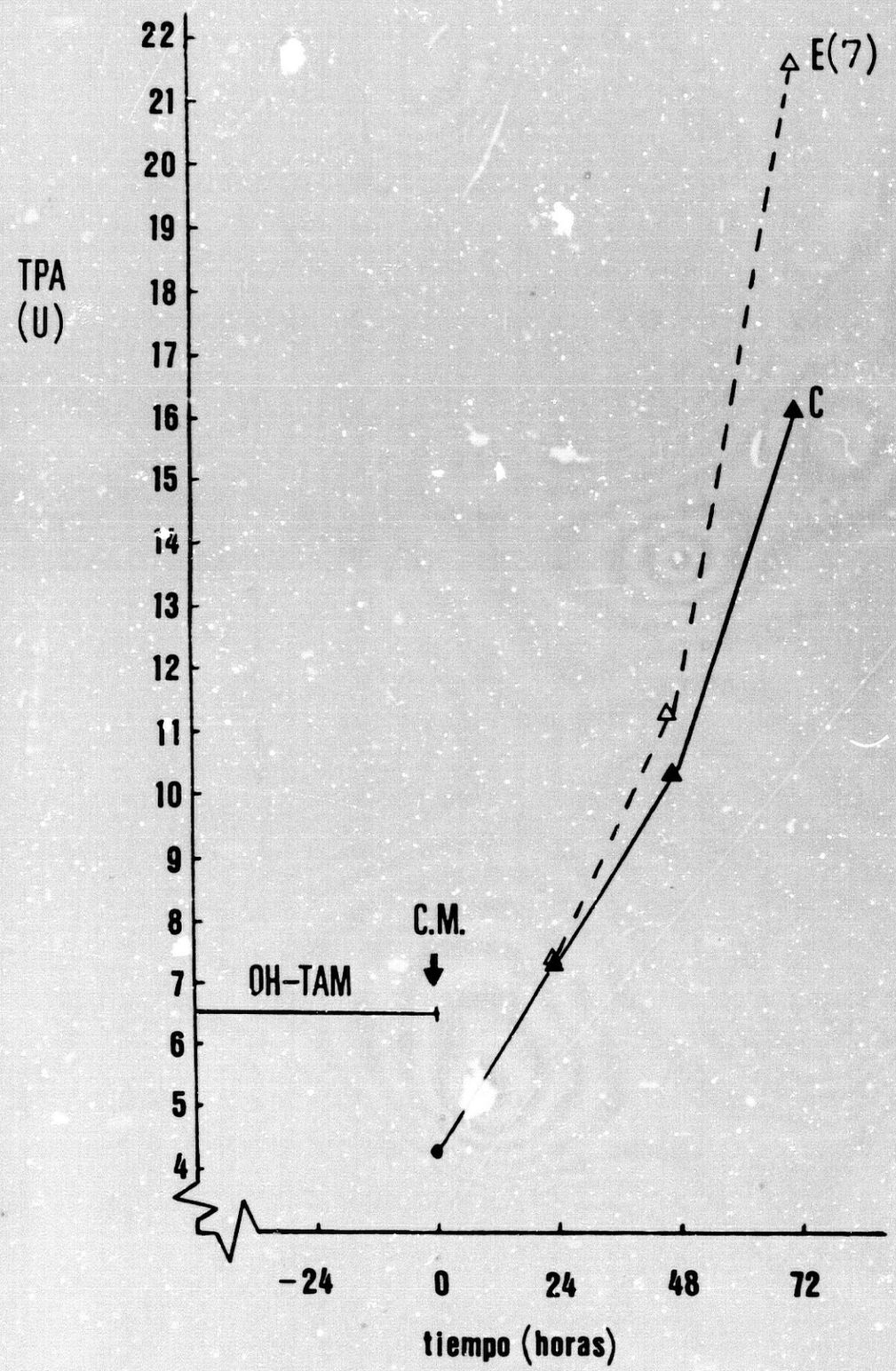


FIGURA. - 4 . 11

PROLIFERACION DE MCF-7 TRAS SINCRONIZACION (OH-TAM) Y RESCATE.

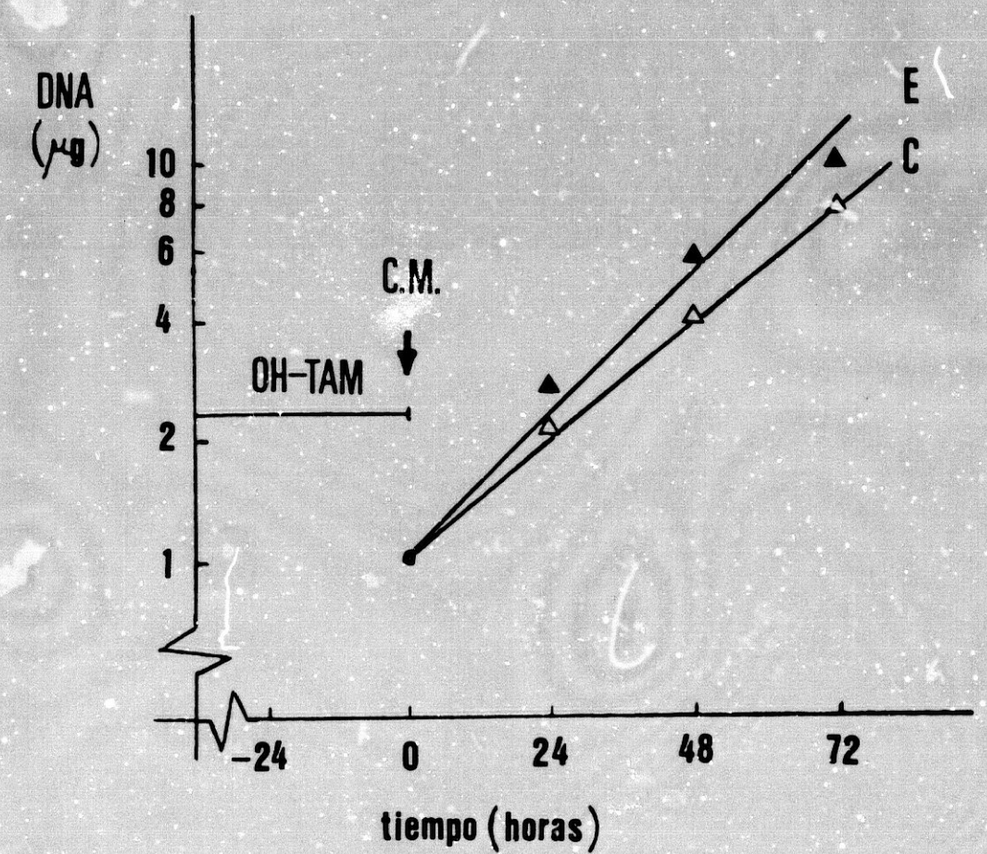


FIGURA. - 4.12

LIBERACION DE TPA TRAS SINCRONIZACION DE MCF-7 (OH-TAM) Y RESCATE.

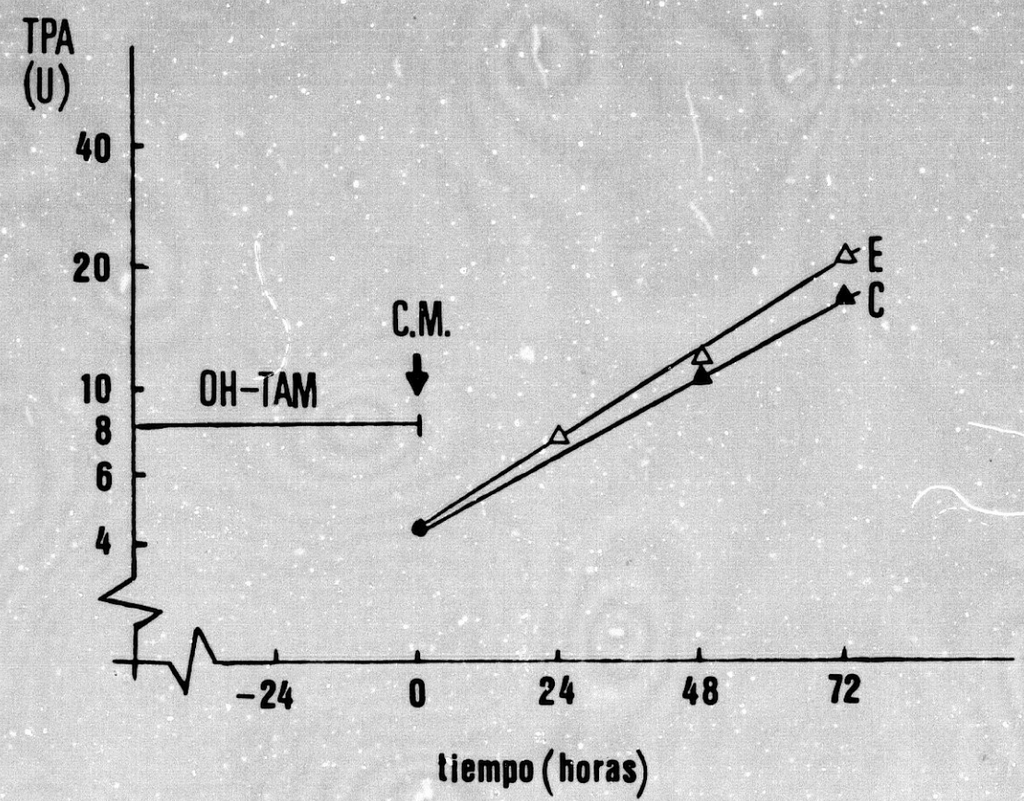


FIGURA.- 4.13

y los Tiempos de Duplicación obtenidos para uno y otro Grupo ofrecen los valores siguientes: 24'8 horas (Grupo Control) y 22'2 horas (Grupo Estradiol), respectivamente. Ambos valores difieren claramente del valor 40'7 horas descrito para T_D en células MCF-7 no sincronizadas (apartado 4.2).

Si calculamos ahora el valor que, teóricamente, corresponde a la fracción de crecimiento de cada uno de los grupos estudiados.

$$\ln a = \frac{21'3}{24'8} \times \ln 2 = 0'595 \qquad a = 1'81$$

Fracción de crecimiento = F_c = a - 1 = 0'81 (Grupo Control).

$$\ln a = \frac{21'3}{22'2} \times \ln 2 = 0'665 \qquad a = 1'94$$

Fracción de crecimiento = F_c = a - 1 = 0'94 (Grupo Estradiol).

se comprueba que el "rescate" de los elementos celulares de la población MCF-7 previamente tratados con OH-TAM, ya sea utilizado MEM + FCS (Grupo Control) o MEM + FCS + 17βE_2 (Grupo Estradiol), es muy eficaz. Por otra parte, las diferencias encontradas para el valor de F_c en este

experimento respecto al dato de F_c obtenido en condiciones estandar (F_c / MCF-7 = 0'45) (Apartado 4.2), confirma las ideas de Sutherland y col. (280) acerca de la acción de los estrógenos sobre la cinética del ciclo celular. Según Sutherland, las células hormonosensibles a la acción del estradiol incrementan su actividad proliferativa a través de los mecanismos siguientes:

1) Incrementando su fracción de crecimiento mediante el reclutamiento de las células quiescentes de la población.

2) Acortando el tiempo de duración del ciclo celular por vía, fundamentalmente, de una reducción de elementos celulares en fase G_1.

3) Disminuyendo la muerte celular.

La demostración experimental de una fracción de crecimiento del 94 % para el grupo tratado con 17βE_2 y del 81 % para el grupo control (no olvidemos la presencia de esteroides endógenos en el FCS que se añade como suplemento) y la obtención de tiempos de duplicación cercanos al tiempo de ciclo (22'2 y 24'8 para los grupos E_2 y C, respectivamente, y 21'3 para el T_c) constituyen, sin duda, una fuerte evidencia en favor de la operatividad de, al menos, dos de los efectos anteriormente mencionados.

4.5. CINETICA DE LA LIBERACION DEL ANTIGENO POLIPEPTIDICO TISULAR AL MEDIO DE CULTIVO EN CONDICIONES DE EXPOSICION CELULAR A LA SECUENCIA OH-TAM / 17βE$_2$.

La Figura 4.14 ofrece en forma gráfica el crecimiento, estudiado a intervalos de 6 horas, de las células MCF-7 sincronizadas con OH-TAM en fase G_0/G_1, cuyo crecimiento se inicia tras el cambio de medio. El análisis de esa representación gráfica pone de manifiesto con claridad que la cantidad de DNA crece, escalonadamente, con el tiempo. En efecto, es posible definir tres ondas sucesivas que corresponden a tres ciclos de división celular completos. La fase de meseta que separa cada una de las zonas de pendiente positiva, define el intervalo G_2/M-G_1 del ciclo mitótico. Los resultados de este experimento demuestran también que el crecimiento celular de la población secuencialmente tratada con OH-TAM y 17βE$_2$ ocurre de manera sincrónica al menos durante los tres primeros ciclos divisorios.

La demostración de la presencia de TPA en el medio de cultivo de las células sometidas a estudio (Fig. 4.15) parece demostrativa de que el proceso de liberación de TPA, cuando las células progresan simultaneamente, tiene lugar en una fase concreta del ciclo mitótico. Ello da origen, probablemente, a la aparición de "escalones" sucesivos. Nuestros resultados confirman los obtenidos por Björklund (27) al estudiar la cinética de liberación de TPA al medio de cultivo de células Hela. Se ha demostrado, en efecto, que la fase en la que tiene lugar este proceso

PROLIFERACION DE MCF-7 TRAS OH-TAM (72 HORAS) Y RESCATE CON MEM+FCS+17βE_2.

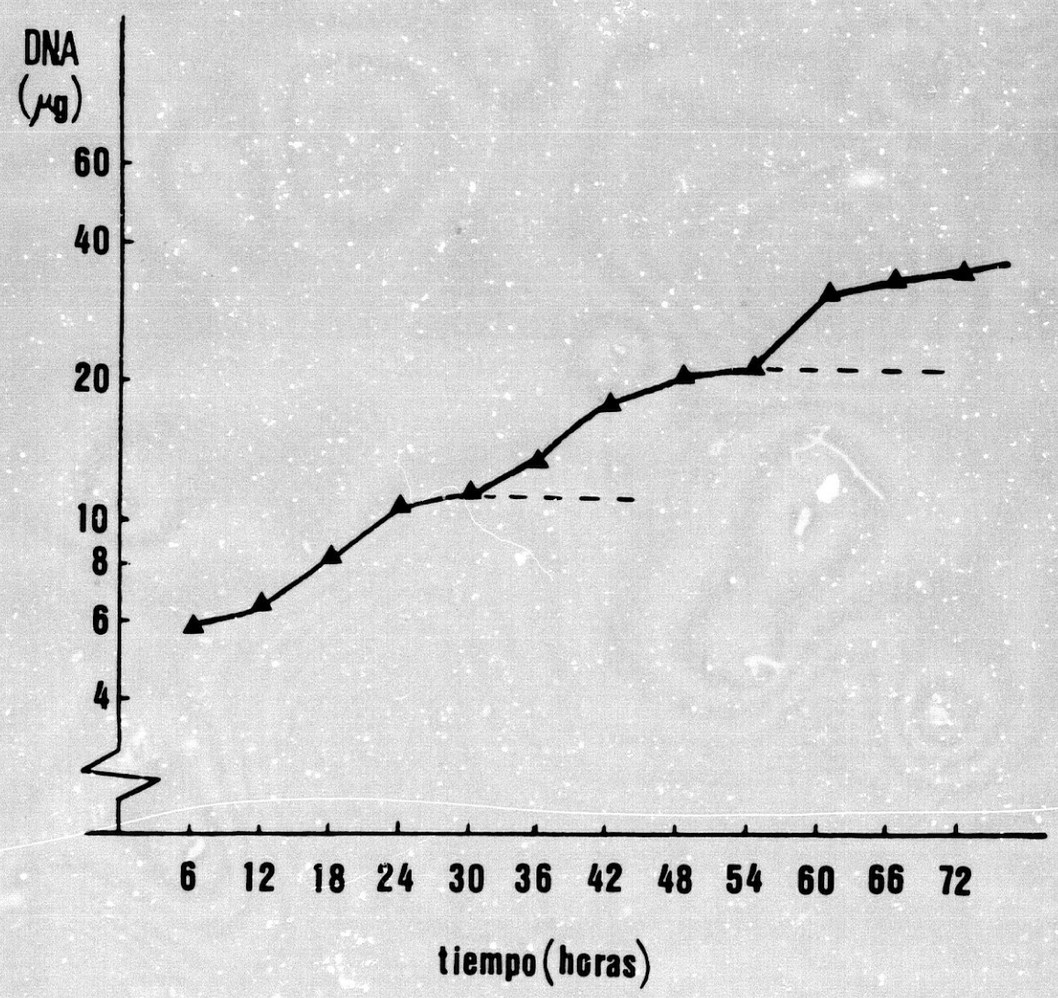


FIGURA - 4 . 14

LIBERACION DE TPA POR MCF-7 TRAS OH-TAM (72 HORAS) Y RESCATE CON MEM+FCS+17βE_2.

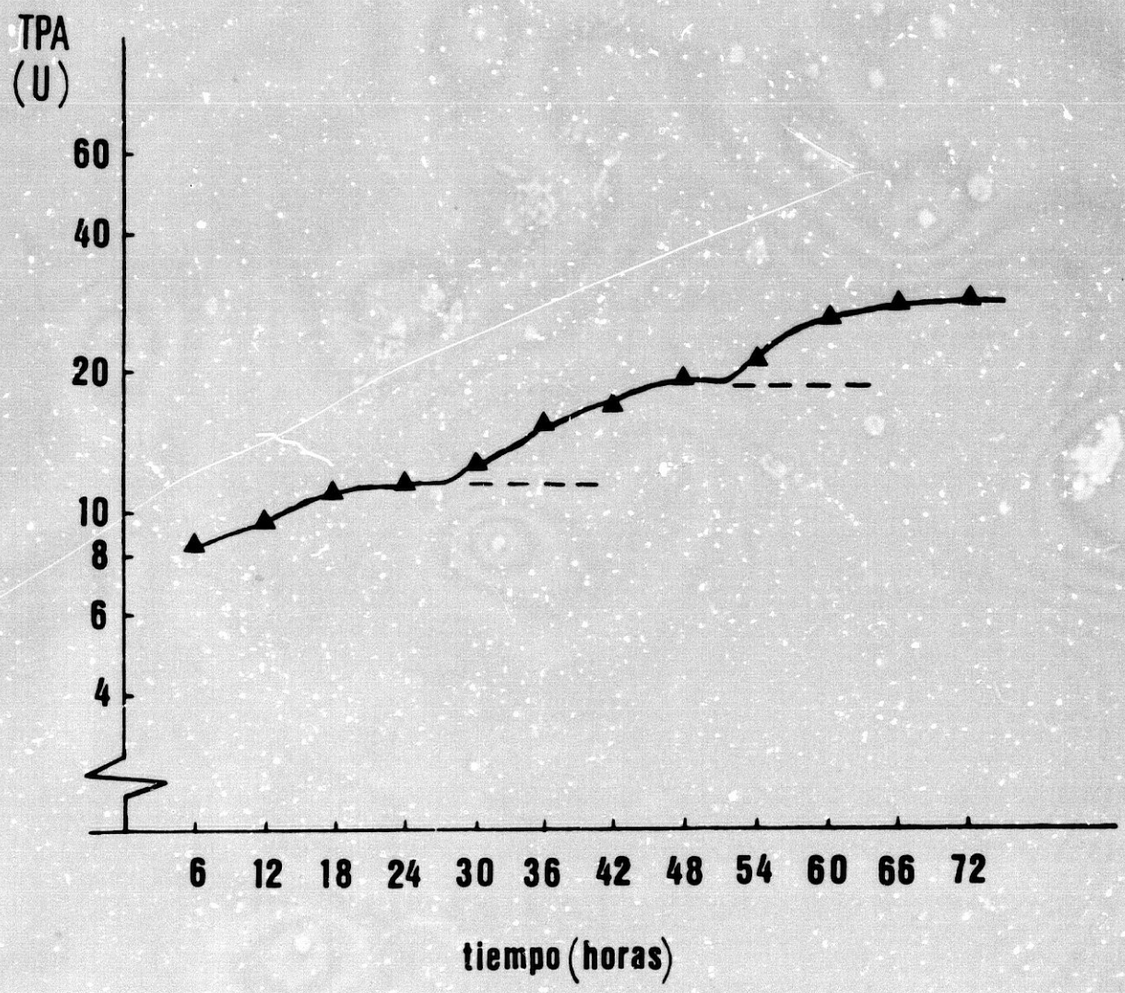


FIGURA.-4.15

se inicia cuando las células han terminado la síntesis de DNA (fase G_2/M) y termina antes de que los elementos celulares comiencen a reduplicar el material genético (fase S). Por otra parte, el contenido intracelular de TPA alcanza su nivel máximo cuando las células están, precisamente, en fase M (25).

4.6. EFECTO DEL EGF SOBRE CULTIVOS SINCRONICOS DE CELULAS MCF-7

El papel de las hormonas peptídicas como sustancias reguladoras del crecimiento de las células cancerosas "in vivo" no se conoce con exactitud. Recientemente Osborne y col. (223) han demostrado que el EGF estimula el crecimiento de células MCF-7 y que estas células poseen receptores específicos en los que el enlace con la proteína se produce con alta afinidad. La afinidad del enlace se ha estudiado efectuando estudios competitivos entre el factor de crecimiento epidermoide, el factor de crecimiento de fibroblastos, la insulina y la hormona del crecimiento (222).

El modelo propuesto para la acción del EGF sobre células en cultivo supone la asociación inmediata de la hormona al receptor y la internalización o "secuestro" del complejo formado, a la que sigue la degradación de la hormona polipeptídica. La transformación de los datos de enlace receptor-hormona ofrece una representación de Scatchard no lineal que resulta difícil de interpretar y cuya forma no puede ser explicada como resultado de los

procesos de internalización y degradación del complejo receptor-hormona. Esta curva de enlace quizás pudiera sugerir la existencia de fenómenos de cooperatividad negativa o de la presencia de distintos locus aceptores para el EGF (105). La acción del EGF sobre células de cáncer de mama en cultivo depende del tipo celular que se esté ensayando. Se ha demostrado, en efecto, que la cantidad de enlace máxima de las células para el factor EGF varía de manera extraordinaria de unas líneas a otras (105). El receptor existe en todas las líneas celulares tumorales mamarias ensayadas por Fitzpatrick y col. (105). Sin embargo, su presencia no garantiza que las células respondan al enlace receptor-hormona incrementando su actividad mitótica. Incluso cuando se utiliza el mismo tipo celular (MCF-7) las investigaciones de distintos grupos de trabajo han resultado contradictorias. Por ejemplo, a diferencia de lo comunicado por Osborne (223) y Fitzpatrick (105), Imai y col. (148) encuentran que el EGF inhibe la síntesis de DNA en las células MCF-7. El hallazgo de resultados discordantes por unos y otros autores se ha intentado explicar en virtud de las distintas condiciones experimentales utilizadas, aunque se considera también la posibilidad de que estas diferencias sean debidas a procesos de selección de ciertos tipos de subclones celulares (105).

Para comprobar los efectos que el EGF ejerce sobre las células MCF-7 sincronizadas por tratamiento con OH-TAM, hemos realizado el experimento cuyos resultados figuran en las Tablas III-9 y III-10. Las representaciones gráficas de los datos, Figuras 4.16 a 4.18, ponen de manifiesto, en primer lugar, que los efectos de adición del EGF al medio

EFECTO DEL EGF SOBRE LA PROLIFERACION DE MCF-7 SINCRONIZADA. GRUPO FCS.

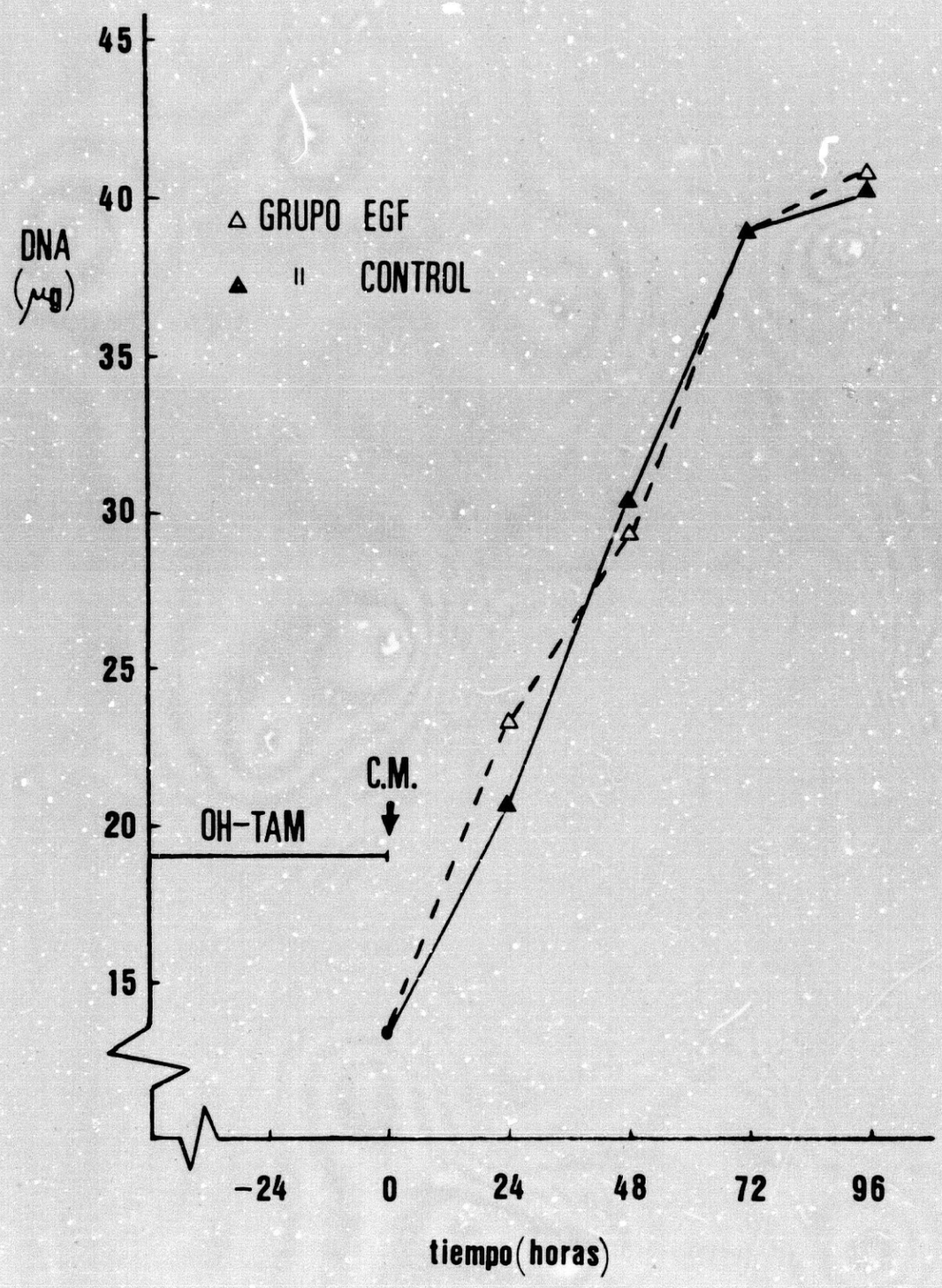


FIGURA.-4.16

EFECTO DEL EGF SOBRE LA PROLIFERACION DE MCF-7 SINCRONIZADA. GRUPO $FCS_{(s)}$: SUERO TRATADO CON CARBON-DEXTRANO.

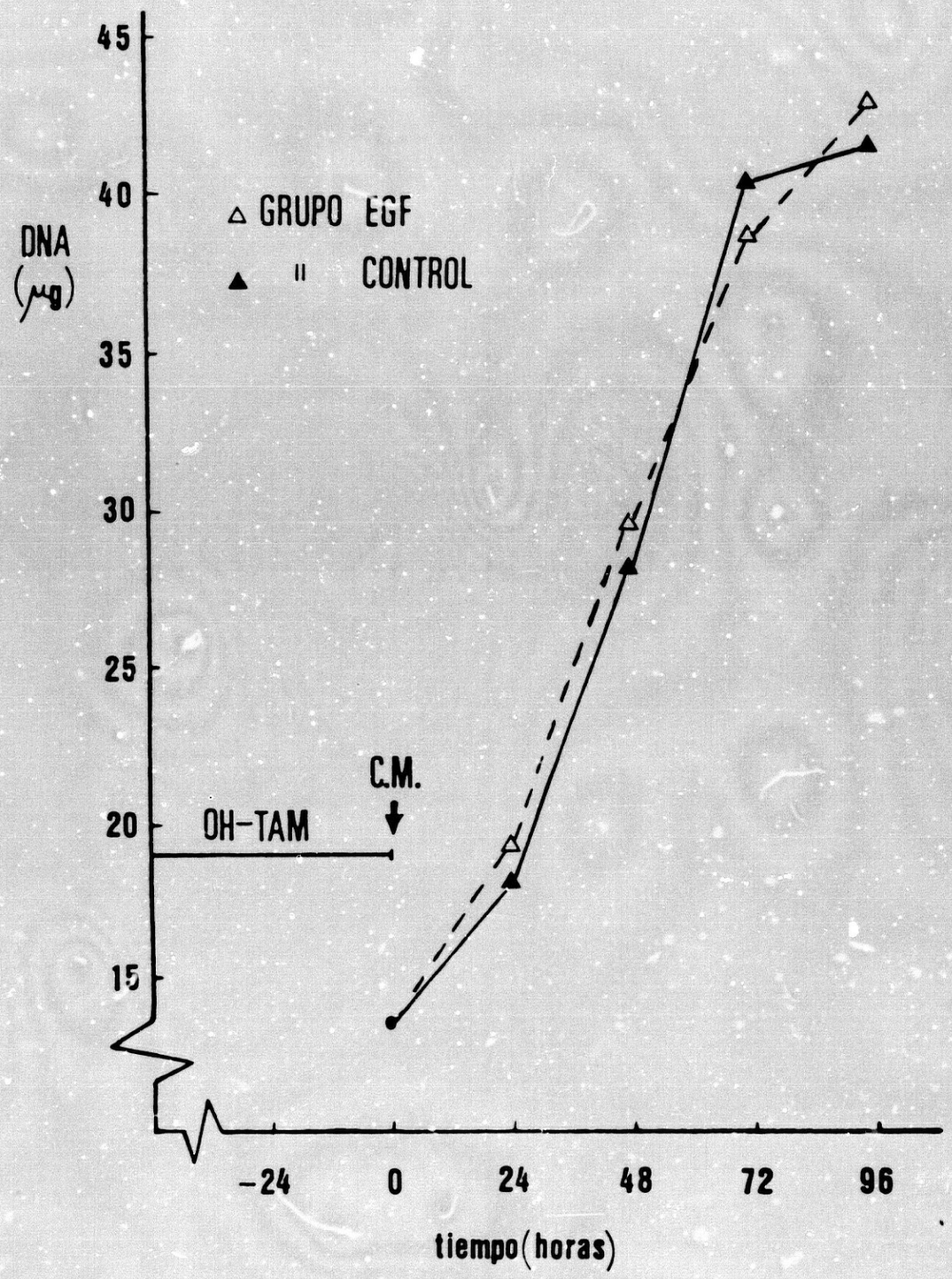


FIGURA. - 4.17

EFECTO DEL EGF SOBRE LA PROLIFERACION DE MCF-7 SINCRONIZADA A LAS 24 HORAS. GRUPOS FCS Y $FCS_{(s)}$.

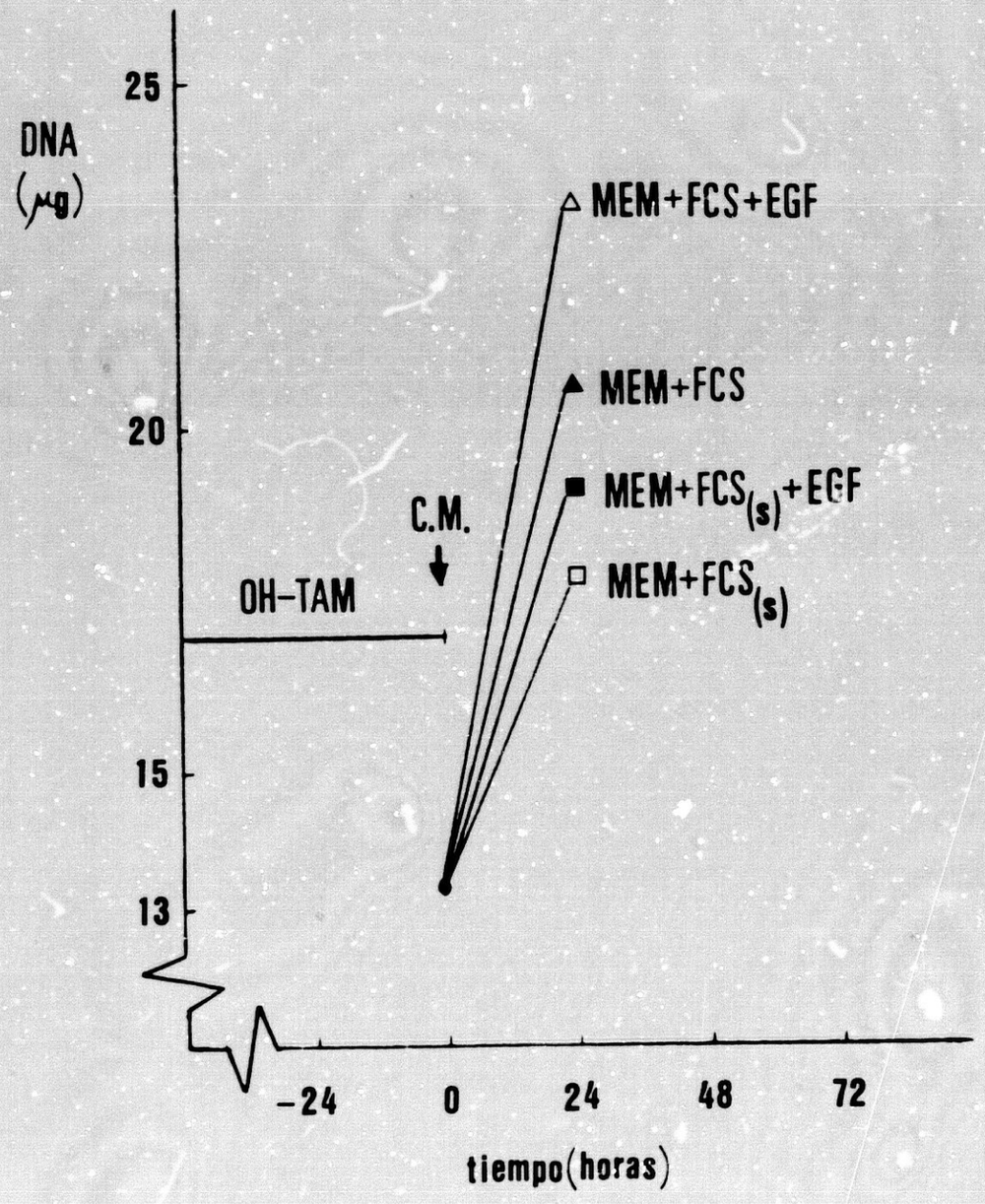


FIGURA - 4.18

de cultivo (MEM + 10% FCS) en el que crecen las células se traducen, a las 24 horas de su adición, por ligeras diferencias en la cantidad de DNA entre unos grupos experimentales y otros.

Para eliminar el efecto del estradiol endógeno procedente del suero de feto de ternera, uno de los experimentos se realizó utilizando como suplemento del MEM suero de feto de ternera tratado con carbón-dextrano FCS (Figs. 4.17 y 4.18). Resulta más fácil analizar los efectos del EGF en cada experimento acudiendo a la representación gráfica de la Figura 4.18, en la que se incluye el crecimiento de todos los grupos en las primera 24 horas, tras el cambio de medio. Del análisis simple de esta gráfica se deduce que la cantidad de DNA (o lo que es igual, el numero de células presente) es máximo en el grupo MEM + FCS + EGF y mínimo en el grupo MEM + FCS$_{(s)}$. Por otra parte, el suplemento de EGF añadido al grupo MEM + FCS$_{(s)}$ no consigue elevar el número de células al mismo dintel que lo hace el FCS no tratado con carbón-dextrano.

Si asignamos el valor de 100 % al crecimiento objetivado en el grupo MEM + FCS + EGF, para el grupo MEM + FCS ese valor resulta ser del 88 % y para los grupos FCS$_{(s)}$ del 82 % y 77 % suplementado con EGF o libre de su influencia, respectivamente. Los datos anteriores permiten sugerir que el EGF ejerce sobre las células MCF-7, un efecto similar al que inducen bajas concentraciones de estradiol ($\simeq 10^{-10}$ en MEM + FCS). Por otra parte, cuando el suero no se trata con carbón-dextrano el EGF parece potenciar la acción del estradiol. En efecto, las

diferencias encontradas resultan estadísticamente significativas ($p < 0'05$) en el grupo de células que crecen en presencia de FCS respecto del grupo celular FCS (s).

Pasadas las primera 24 horas de subcultivo, las diferencias entre los grupos experimentales tienden a disminuir, fenómeno que está en relación, de un lado, con la secreción, por las células neoplásicas del cultivo, de factores de crecimiento semejantes al EGF (TGF(s)) que actúan autoestimulando el crecimiento celular (252) y, de otro, con la desaparición del factor de crecimiento como consecuencia de su propia metabolización.

La representación gráfica de los niveles de TPA cuantificado en el medio de cultivo de cada uno de los grupos ensayados (Figs. 4.19 y 4.20) permite nuevamente afirmar que la liberación de este antígeno es un fenómeno que discurre paralelo a la proliferación celular y que el EGF no induce, ni potencia, su secreción. Sin embargo, si representamos el cociente TPA/DNA frente al tiempo de subcultivo (Fig. 4.21) es evidente que la relación lineal entre el TPA y el DNA se pierde para valores del tiempo comprendidos entre las 72 y las 96 horas. En efecto, durante ese tiempo, las células en cultivo cubren totalmente la superficie de los discos de Petri, es decir, alcanzan la confluencia momento a partir del cual el crecimiento se hace más lento (Figs. 4.16 y 4.17). Las cantidades de TPA cuantificadas en el medio nutriente se incrementan, no obstante ello, de manera exagerada, fenómeno que puede explicarse suponiendo que la liberación

LIBERACION DE TPA. INFLUENCIA DEL EGF.
GRUPO FCS.

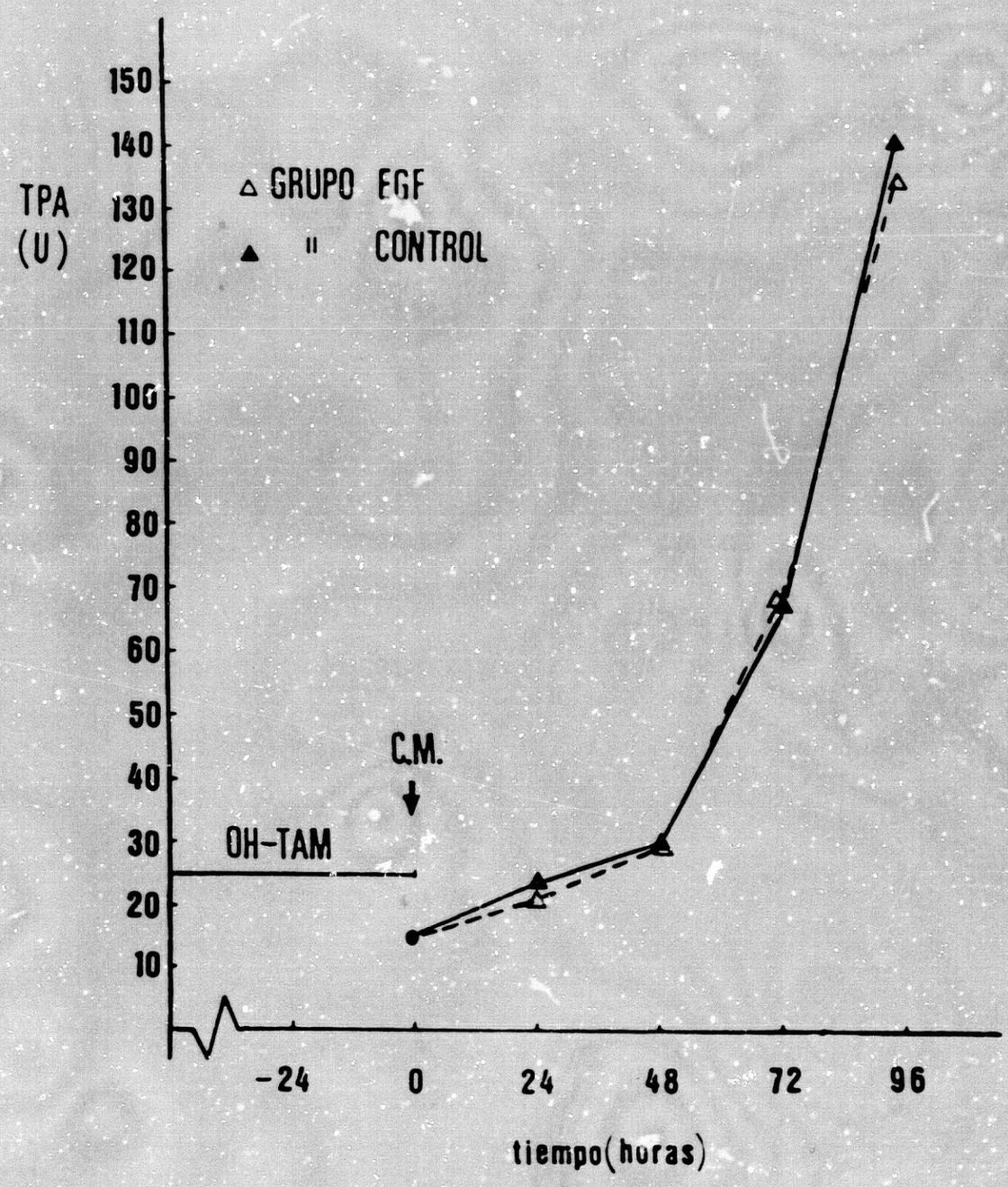


FIGURA. - 4.19

LIBERACION DE TPA. INFLUENCIA DEL EGF. GRUPO $FCS_{(s)}$: SUERO TRATADO CON CARBON-DEXTRANO.

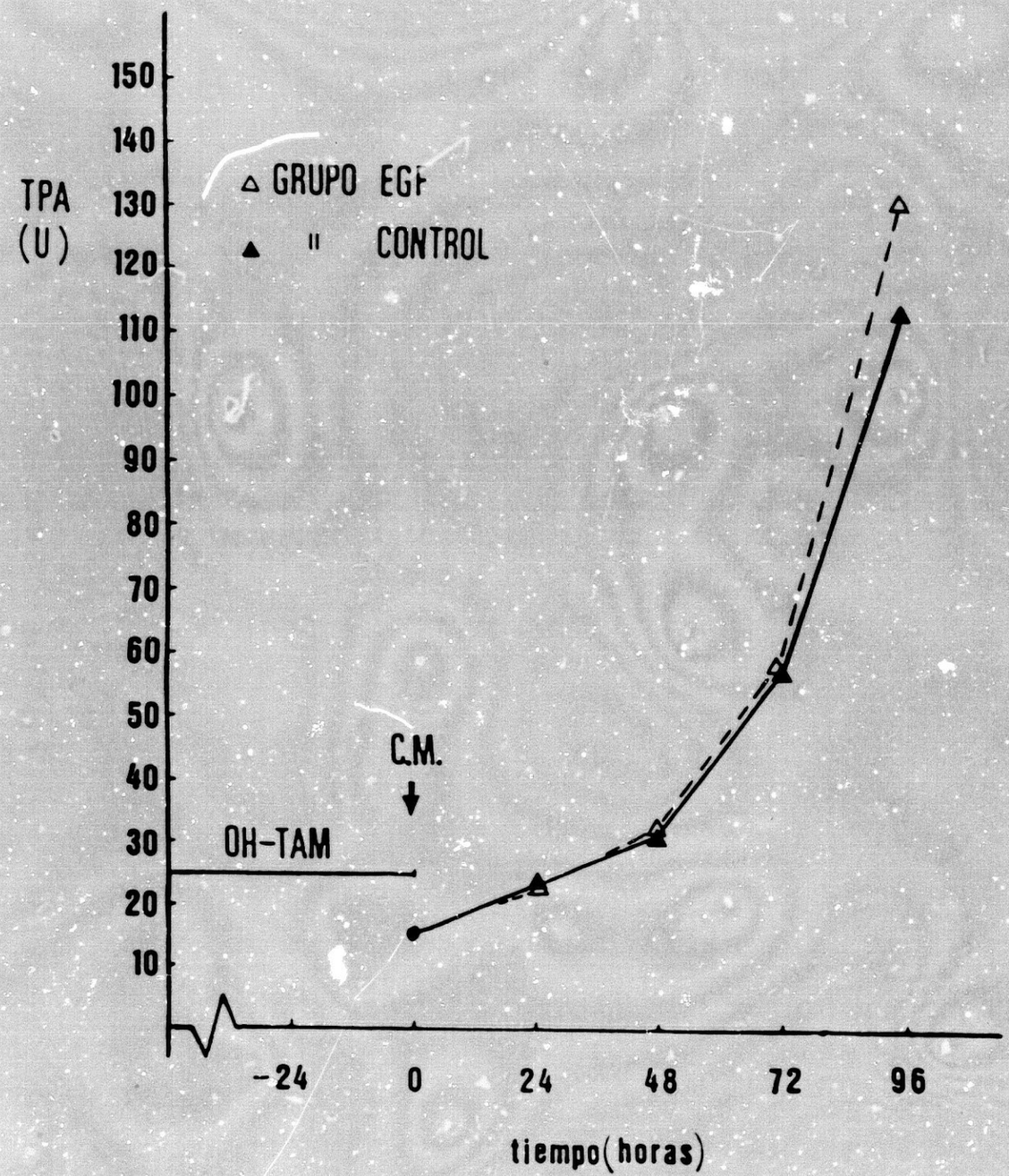


FIGURA. - 4.20

RELACION ENTRE LA LIBERACION DE TPA Y EL CRECIMIENTO CELULAR EN FUNCION DEL TIEMPO. GRUPOS: FCS Y $FCS_{(s)}$.

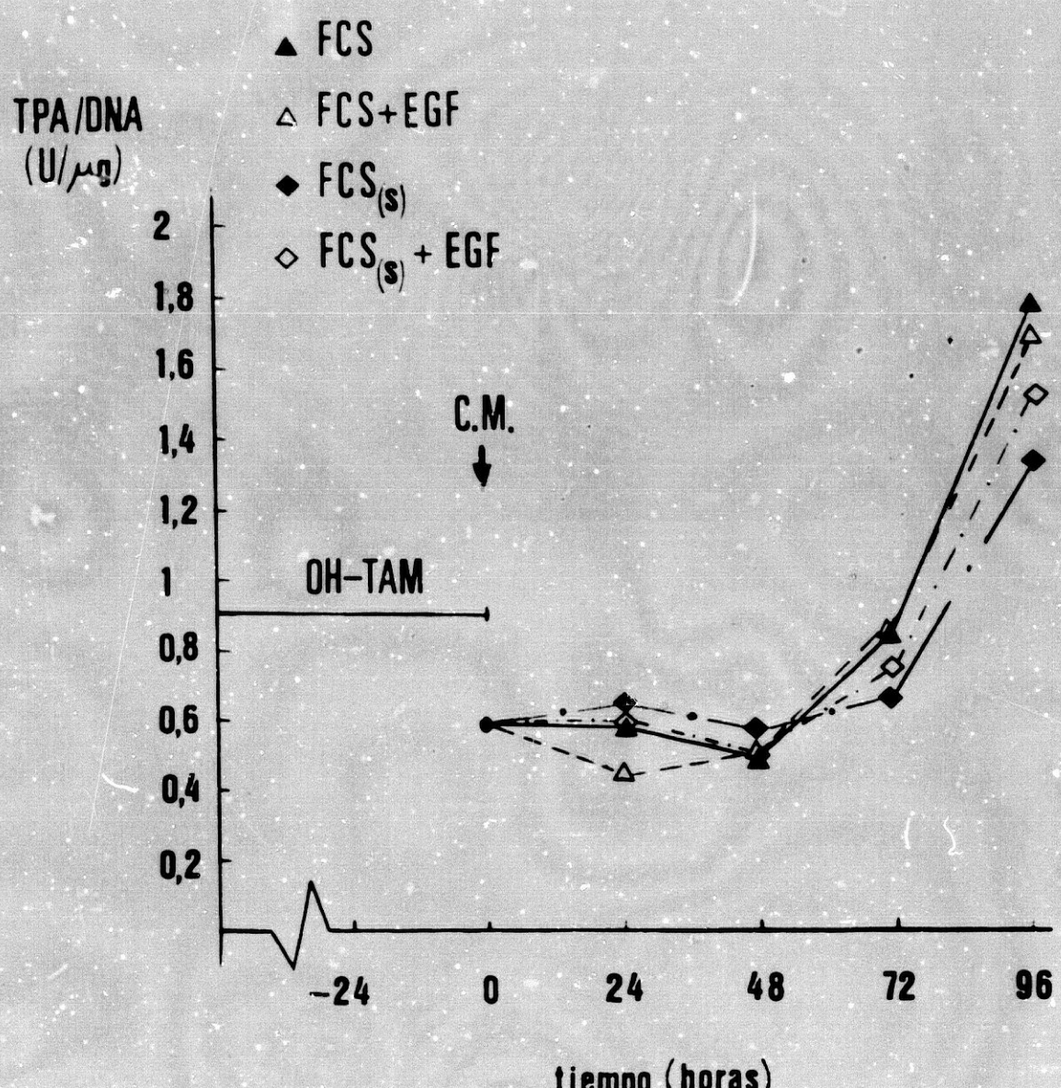


FIGURA - 4.21

masiva de TPA señala, ahora, los acontecimientos de muerte y lisis celular derivados de la escasez de nutrientes y de la elevada concentración de productos metabólicos de desecho que resultan tóxicos para las células

4.7. EFECTO DEL EGF SOBRE LA INCORPORACION DE TIMIDINA TRITIADA A LAS CELULAS MCF-7 SINCRONIZADAS.

Los efectos del EGF sobre la incorporación de ^{3}HTdR a cultivos de células MCF-7 sometidos a sincronización con OH-TAM y rescate con MEM + FCS, se han estudiado en dos grupos experimentales definidos, como en el caso anterior, por la utilización de suero de feto de ternera integro (FCS) o tratado con carbón-dextrano ($FCS_{c.d.}$). Los resultados obtenidos revelan (Figs. 4.22 y 4.23) que tras la eliminación del OH-TAM, por simple cambio de medio, las células progresan sincrónicamente a lo largo del ciclo celular. La fase de síntesis de DNA comienza, en todos los grupos ensayados, hacia las 12 horas del cambio de medio y finaliza a las 24 horas. La incorporación de ^{3}HTdR a los cultivos celulares en todos los grupos experimentales definidos, una vez que han transcurrido 30 horas desde el cambio de medio, ofrece unos valores mínimos que indican que la mayor parte de las células existentes han finalizado la fase de síntesis de DNA y se encuentran, por tanto, en fase G_2/M.

EFECTO DEL EGF SOBRE LA INCORPORACION DE TIMIDINA TRITIADA A MCF-7. GRUPO FCS.

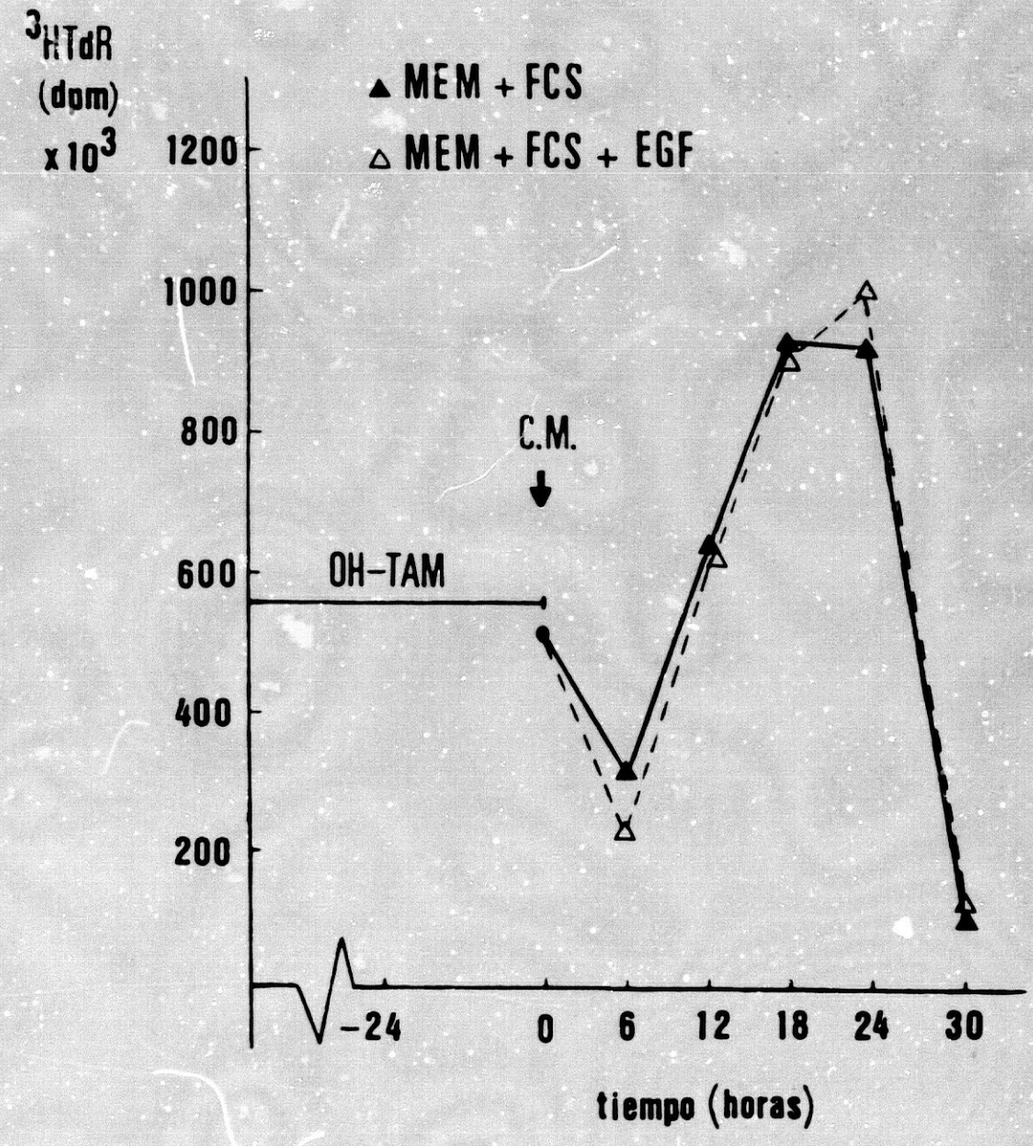


FIGURA - 4.22

EFECTO DEL EGF SOBRE LA INCORPORACION DE TIMIDINA TRITIADA A MCF-7.
GRUPO $FCS_{(s)}$: SUERO TRATADO CON CARBON--DEXTRANO.

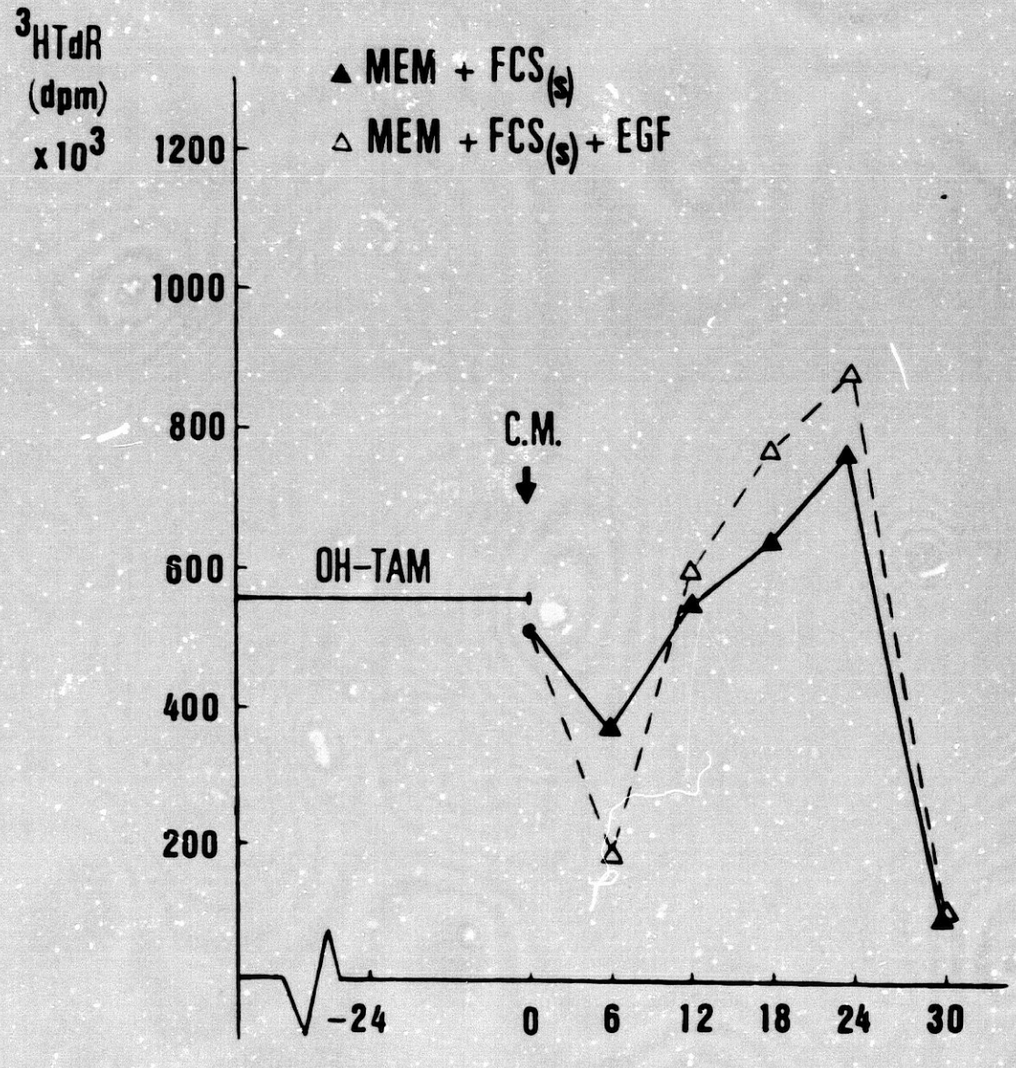


FIGURA - 4.23

Ordenando los grupos experimentales de acuerdo con el dato de incorporación de ^{3}HTdR a las 24 horas del rescate los resultados obtenidos

Grupo (MEM + FCS + EGF) > Grupo (MEM + FCS) >
> Grupo (MEM + $FCS_{(c)}$ + EGF) > Grupo (MEM + $FCS_{(c)}$)

coninciden, como era lógico esperar, con los resultados descritos en el apartado anterior.

Por todo ello, podríamos concluir que el EGF, en las condiciones experimentales ensayadas en nuestro trabajo, estimula la proliferación de MCF-7 cuando existe 17βE_2 en el medio de cultivo. Este resultado concuerda con los obtenidos por Osborne (223) y Fitzpatrick (105) en condiciones de cultivo muy diferentes (utilización de medios nutrientes libres de suero).

4.8. DOSIS - DEPENDENCIA DE LA ACTIVIDAD DEL EGF

Demostrado anteriormente que el efecto mitógeno del EGF sobre células MCF-7 sincronizadas por efecto del OH-TAM sólo es observable cuando en el medio nutriente existe estradiol (suero no tratado con carbón-dextrano), interesa estudiar ahora la acción de esta proteína a diferentes concentraciones sobre cultivos de células MCF-7

sincronizadas por el antiestrógeno OH-TAM y "rescatadas" con MEM + $FCS_{(s)}$ + EGF o con MEM + EGF.

Las representaciones gráficas de los resultados obtenidos en el grupo experimental definido por la presencia de $FCS_{(s)}$ (Figs. 4.24 a 4.27) demuestran que el EGF utilizado en concentraciones de 1 y 10 ng./ml. no produce ningún efecto mensurable sobre el crecimiento de las células MCF-7. Sin embargo, cuando el EGF se incorpora al cultivo en la cantidad necesaria para conseguir una concentración final de 100 ng./ml. las células MCF-7 resultan inhibidas en su crecimiento. En efecto, la comparación estadística de las diferencias entre medias para el grupo control y el grupo tratado con EGF (100 ng./ml) demuestra que entre ambos experimentos existen diferencias que no pueden ser atribuidas al azar (t_{exp} = 3'37, $p < 0'05$). Este resultado confirma los descritos por Imai y col (148) que han demostrado que, utilizado a concentraciones superiores a 10 ng./ml., el EGF inhibe el crecimiento de la mayor parte de las células que contienen receptores para este factor.

Las funciones del EGF sobre el crecimiento celular han sido recientemente revisadas (276) y se explican a través de dos mecanismos fundamentales: a) transmisión de la señal y b) autorregulación. La autorregulación, que podría ser el mecanismo que explicaría la acción inhibitoria de altas concentraciones de EGF, puede ocurrir de tres maneras: i) el enlace de la proteína con el receptor y la actividad de las quinasas puede resultar inhibida por fosforilación de ciertos sitios reguladores del receptor;

DOSIS-DEPENDENCIA DE LA ACTIVIDAD DEL EGF EN EL CRECIMIENTO CELULAR. GRUPO $FCS_{(s)}$: SUERO TRATADO CON CARBON-DEXTRANO.

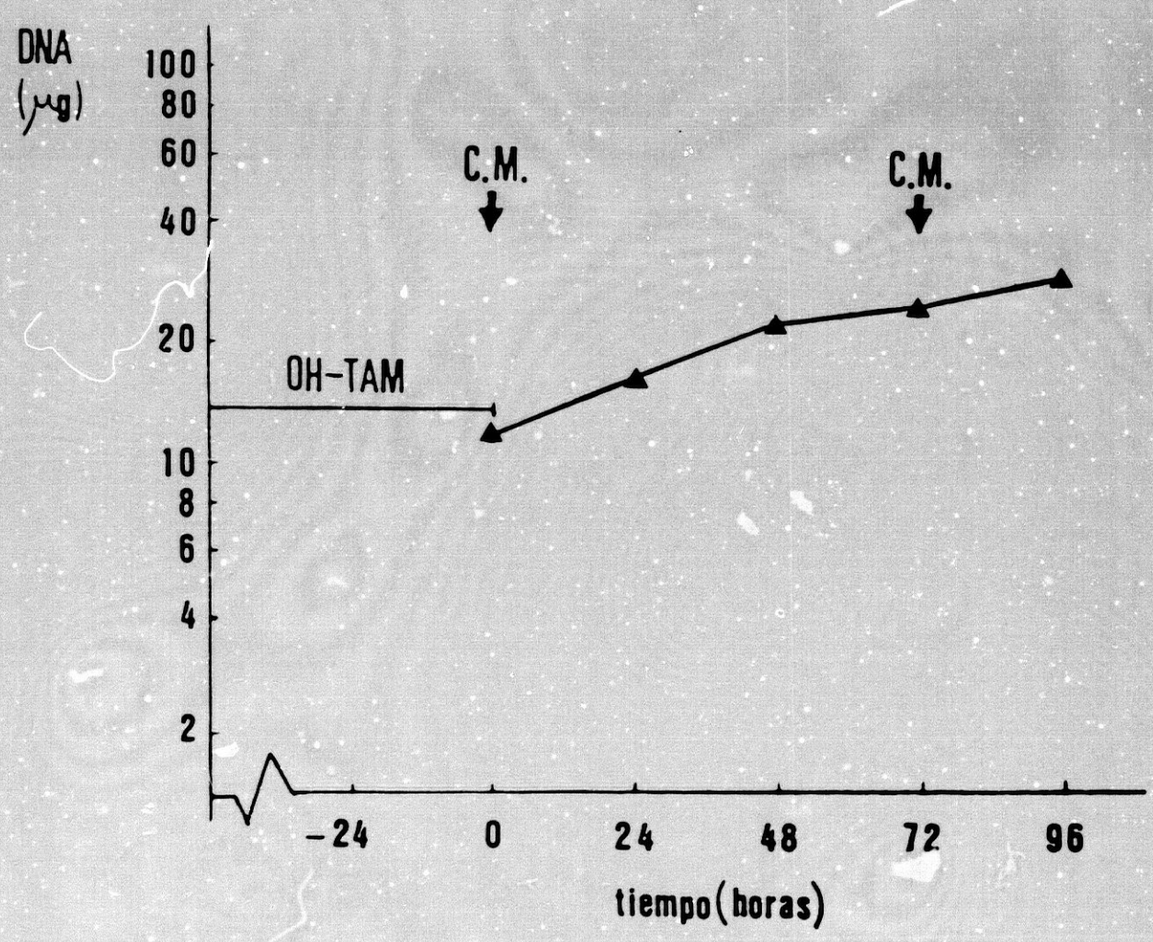


FIGURA. - 4.24

DOSIS-DEPENDENCIA DE LA ACTIVIDAD DEL EGF EN EL CRECIMIENTO CELULAR.
GRUPO : $FCS_{(s)}$ + EGF (1ng/ml).

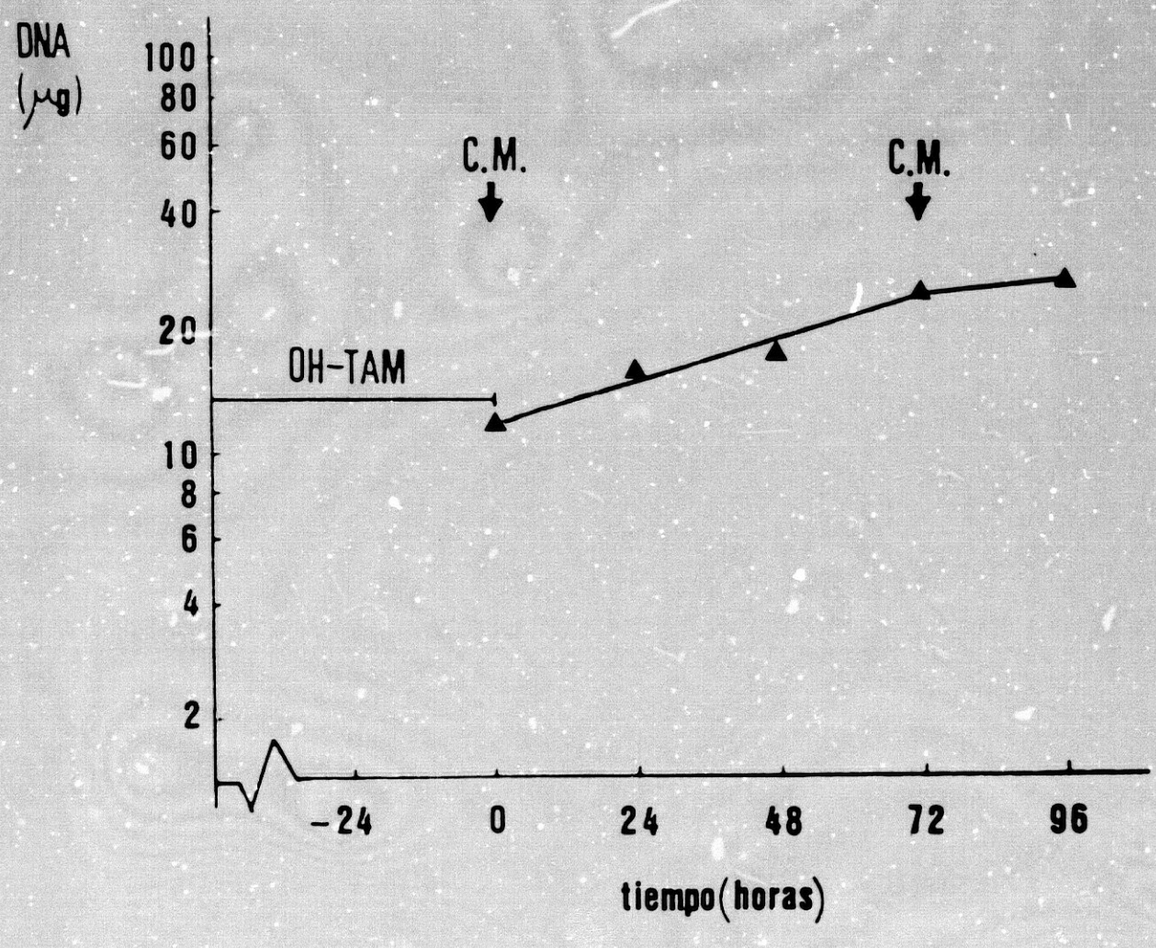


FIGURA.-4.25

DOSIS-DEPENDENCIA DE LA ACTIVIDAD DEL EGF EN EL CRECIMIENTO CELULAR.

GRUPO : $FCS_{(s)}$ + EGF (10 ng/ml).

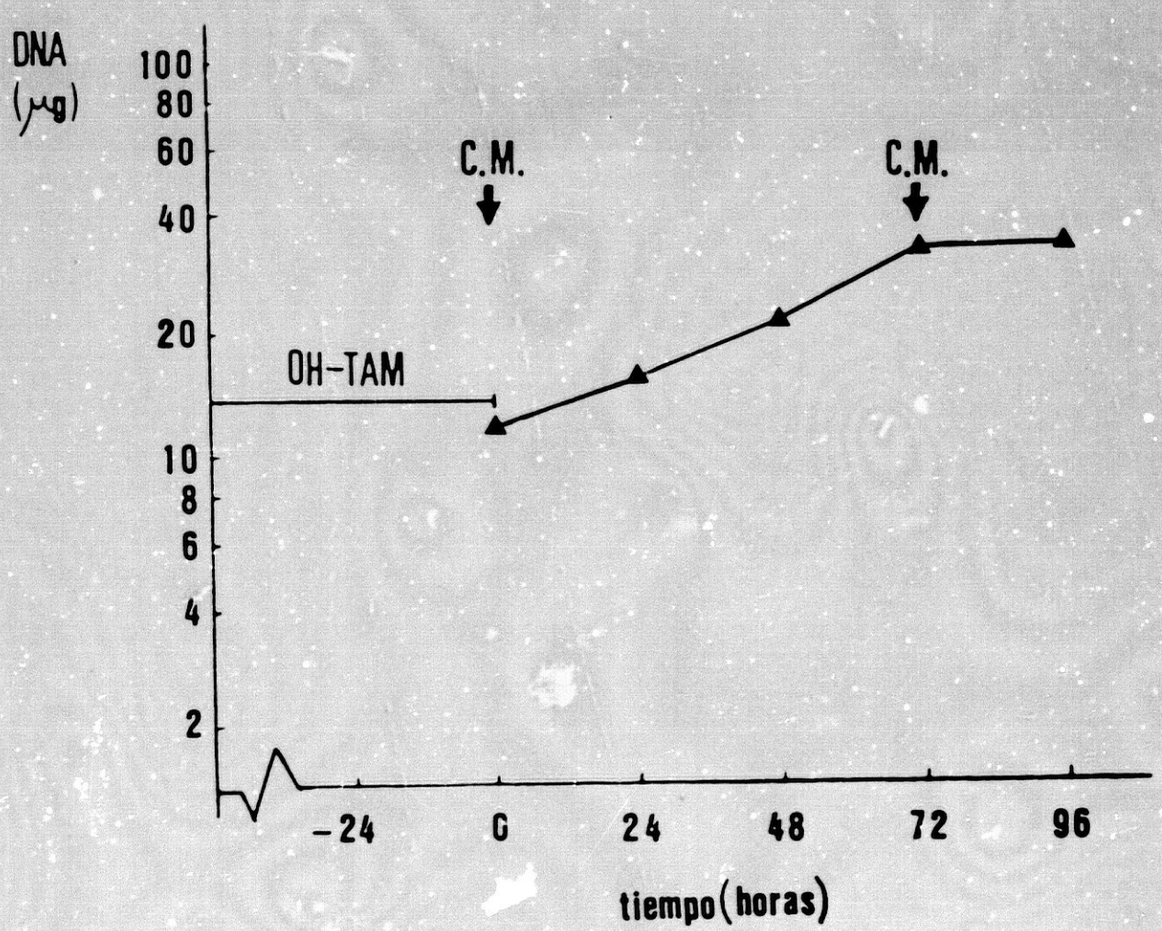


FIGURA.- 4.26

DOSIS-DEPENDENCIA DE LA ACTIVIDAD DEL EGF EN EL CRECIMIENTO CELULAR.

GRUPO : $FCS_{(s)}$ + EGF (100 ng/ml).

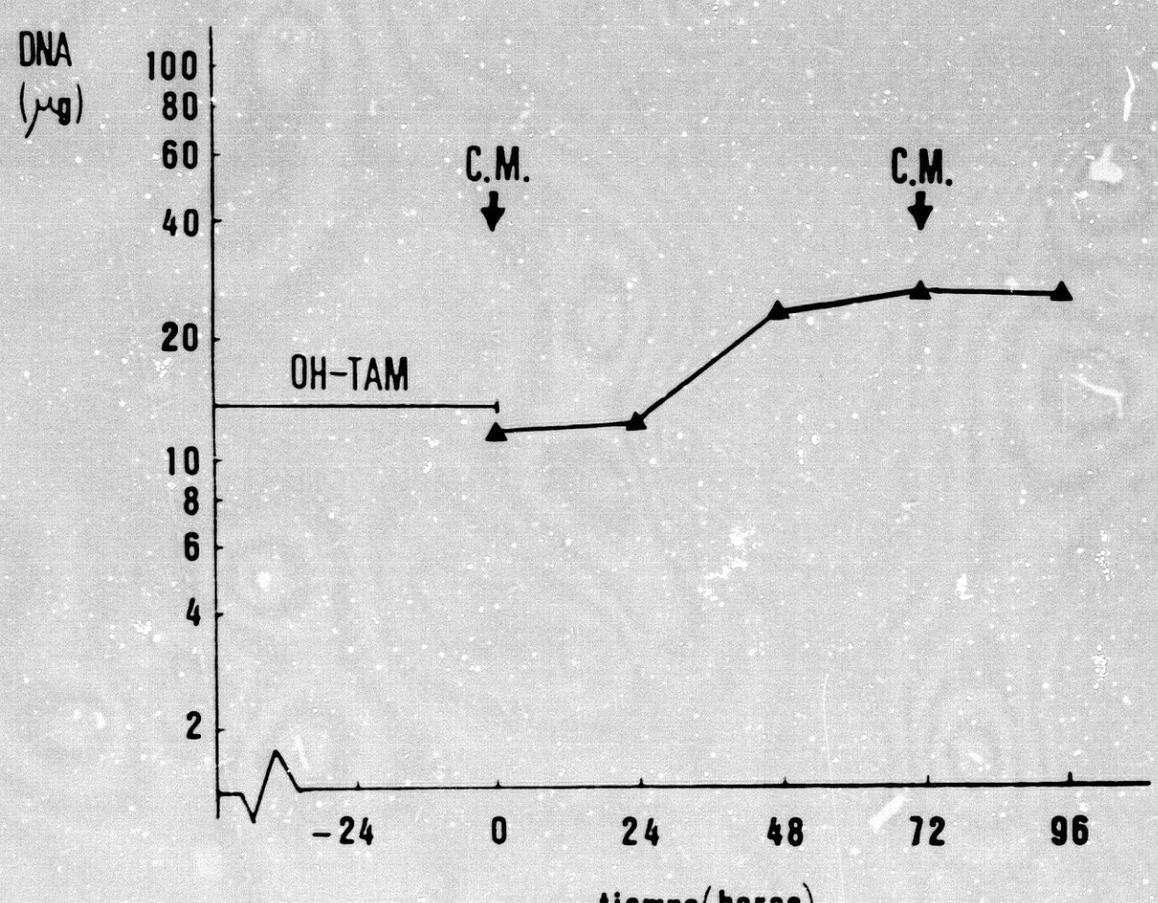


FIGURA - 4.27

ii) la actividad del receptor puede reducirse por la degradación resultante del enlace de éste con el EGF; iii) el secuestro intracelular del receptor para elEGF puede prevenir la activación del pool de receptores de membrana.

Parece, por ello, que las interacciones del receptor del EGF (148) con su ligando, constituyen un mecanismo regulador del crecimiento celular que, en la línea MCF-7, resulta dependiente entre otros factores, de: 1) la presencia de concentraciones mínimas de hormonas esteroideas u otras sustancias de bajo peso molecular (hormonas tiroideas, por ejemplo) que quedan eliminadas tras el tratamiento del suero con carbón-dextrano y 2) del nivel de concentración de EGF en el medio de cultivo.

Por otra parte, la liberación de TPA al medio de cultivo encontrada en cada uno de los grupos experimentales estudiados, se representa en función del tiempo de subcultivo en las Figuras 4.28 a 4.31. El análisis de estas representaciones confirma que cuando el cultivo celular alcanza la confluencia se produce una liberación brusca de TPA. Este fenómeno puede observarse con mayor claridad representando los niveles de TPA en el medio de cultivo en ordenadas frente al valor correspodiente de DNA en abscisas (Fig. 4.32). En efecto, la observación simple de esa representación gráfica revela que la relación lineal entre TPA y DNA se mantiene hasta niveles de DNA situados en torno a los 25 µg. por disco. A partir de aquí, el DNA crece sólo ligeramente mientras que el TPA se incrementa de manera considerable.

DOSIS-DEPENDENCIA DE LA ACTIVIDAD DEL EGF EN LA LIBERACION DE TPA.
GRUPO $FCS_{(s)}$: SUERO TRATADO CON CARBON-DEXTRANO.

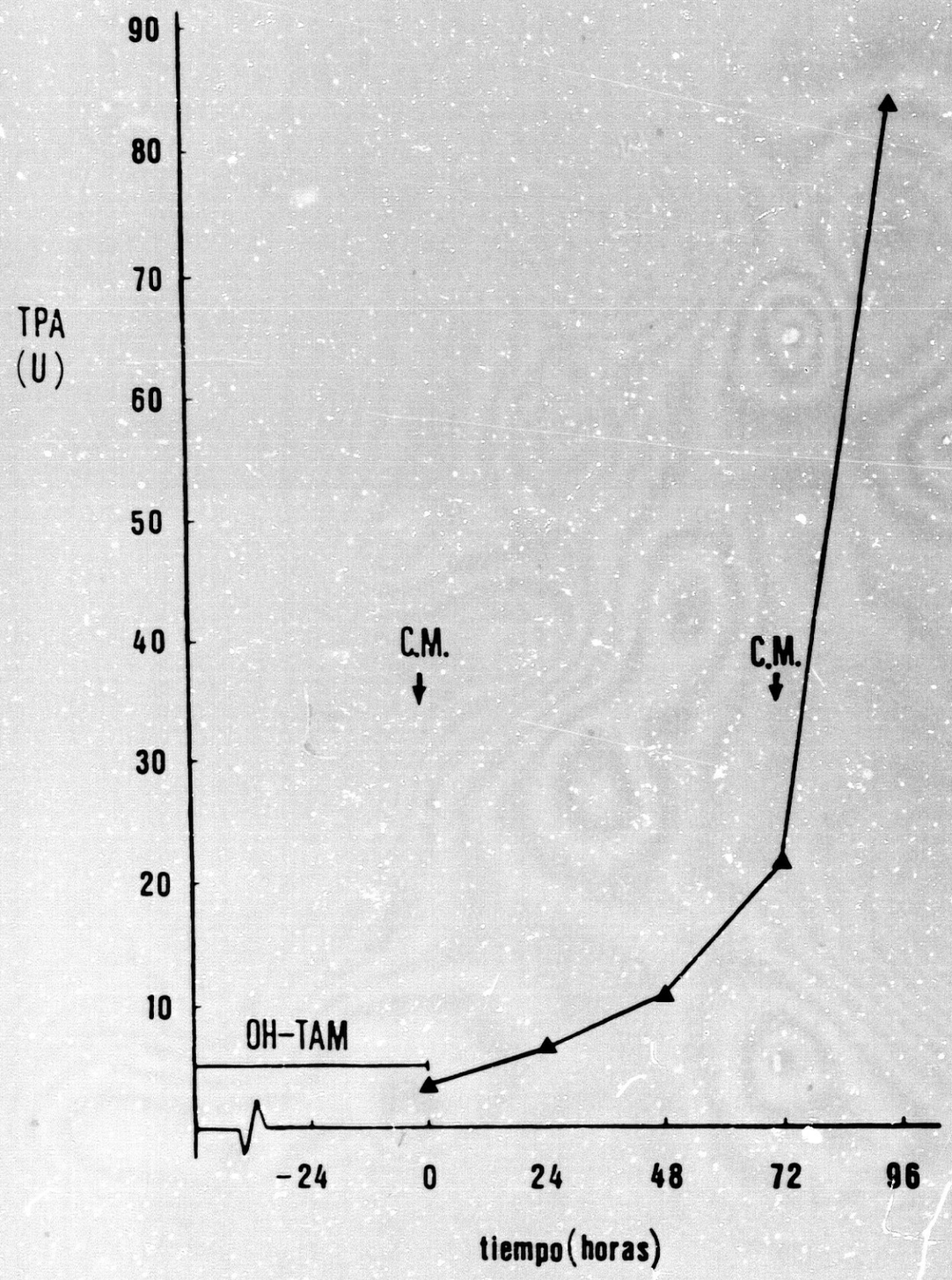


FIGURA. - 4.28

DOSIS-DEPENDENCIA DE LA ACTIVIDAD DEL EGF EN LA LIBERACION DE TPA.
GRUPO $FCS_{(s)}$ + EGF (1 ng/ml).

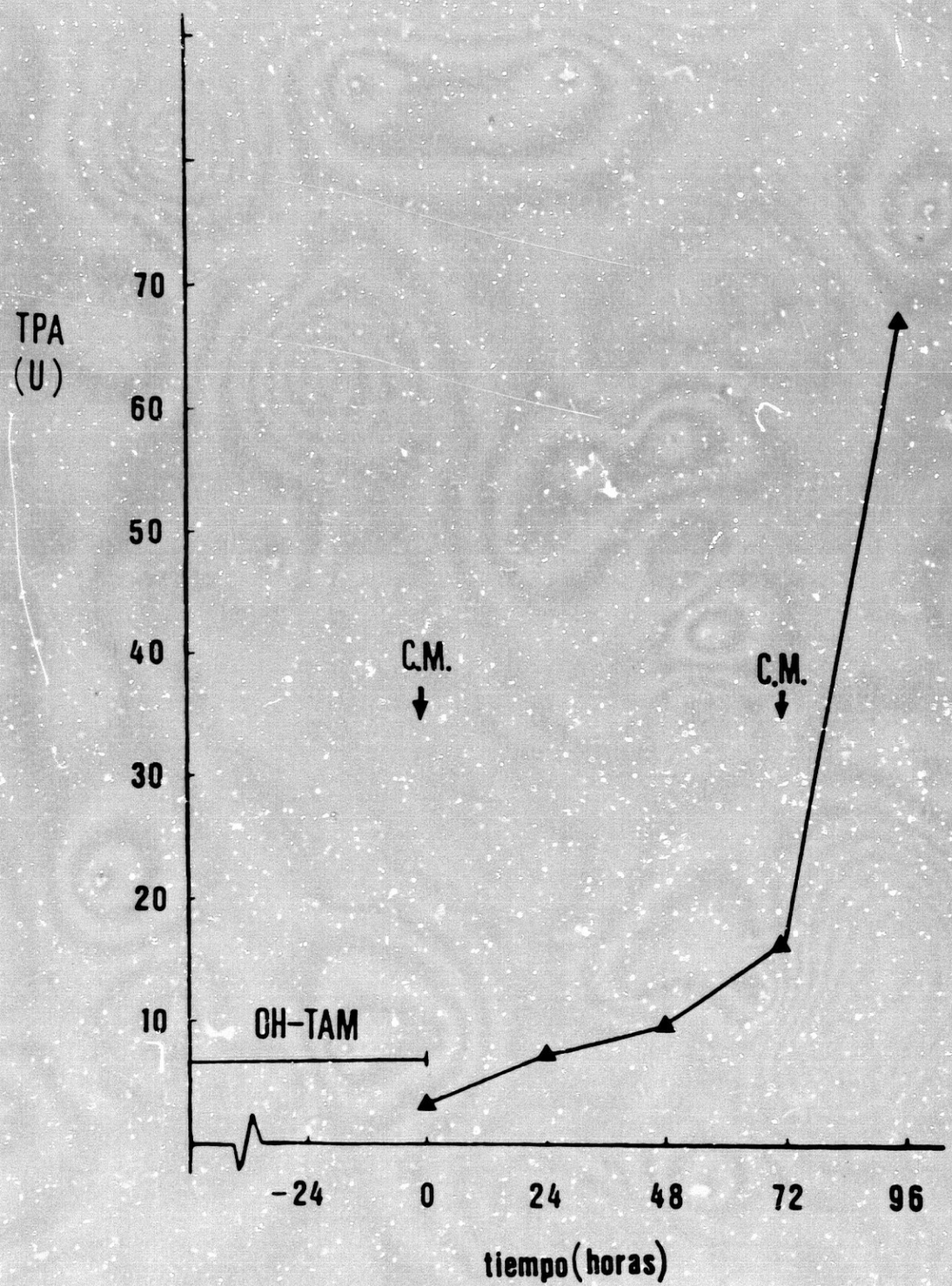


FIGURA. - 4.29

DOSIS-DEPENDENCIA DE LA ACTIVIDAD DEL EGF EN LA LIBERACION DE TPA.
GRUPO $FCS_{(s)}$ + EGF (10 ng/ml).

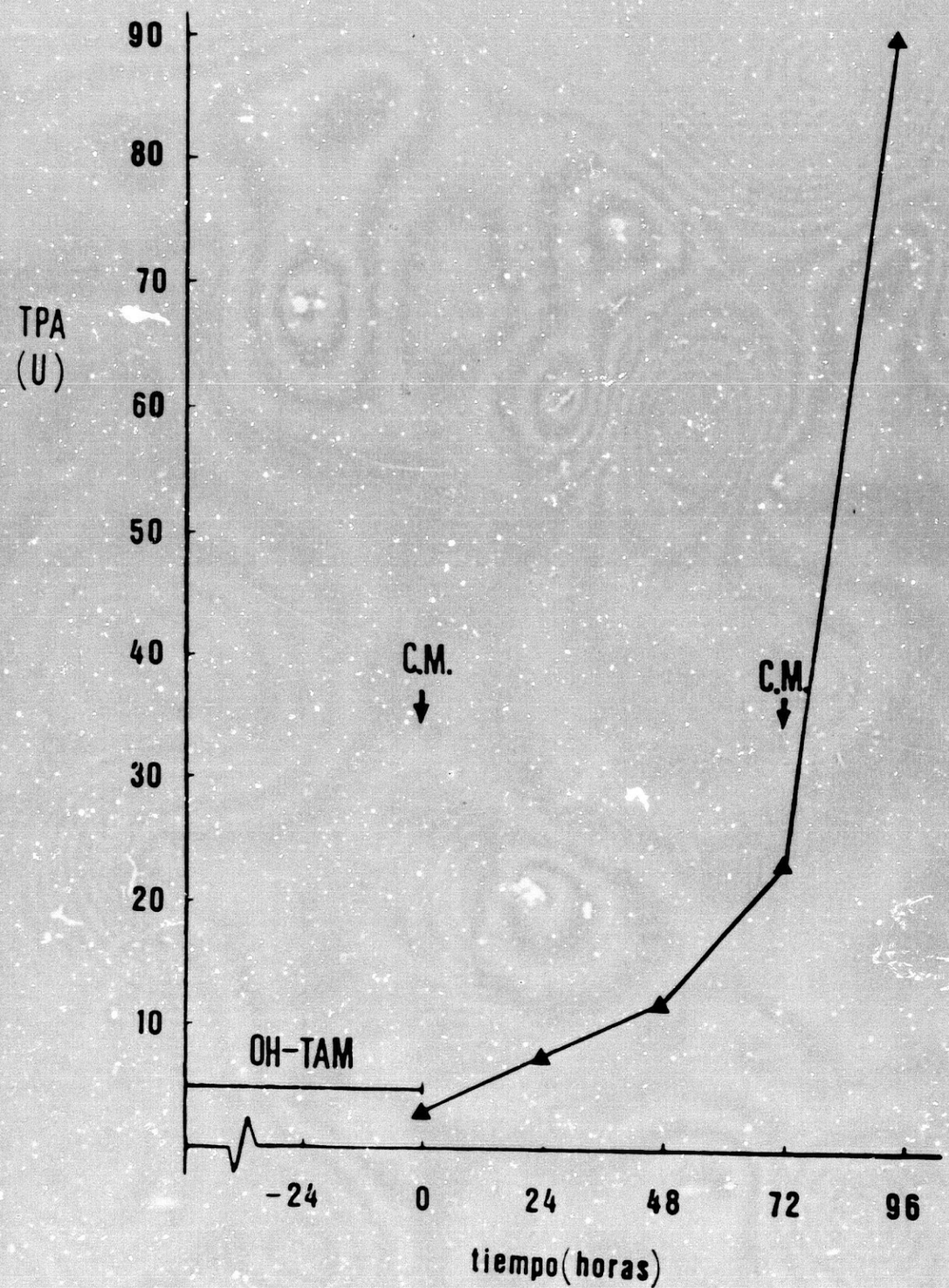


FIGURA. - 4.30

DOSIS-DEPENDENCIA DE LA ACTIVIDAD DEL EGF EN LA LIBERACION DE TPA.
GRUPO $FCS_{(s)}$ + EGF (100 ng/ml).

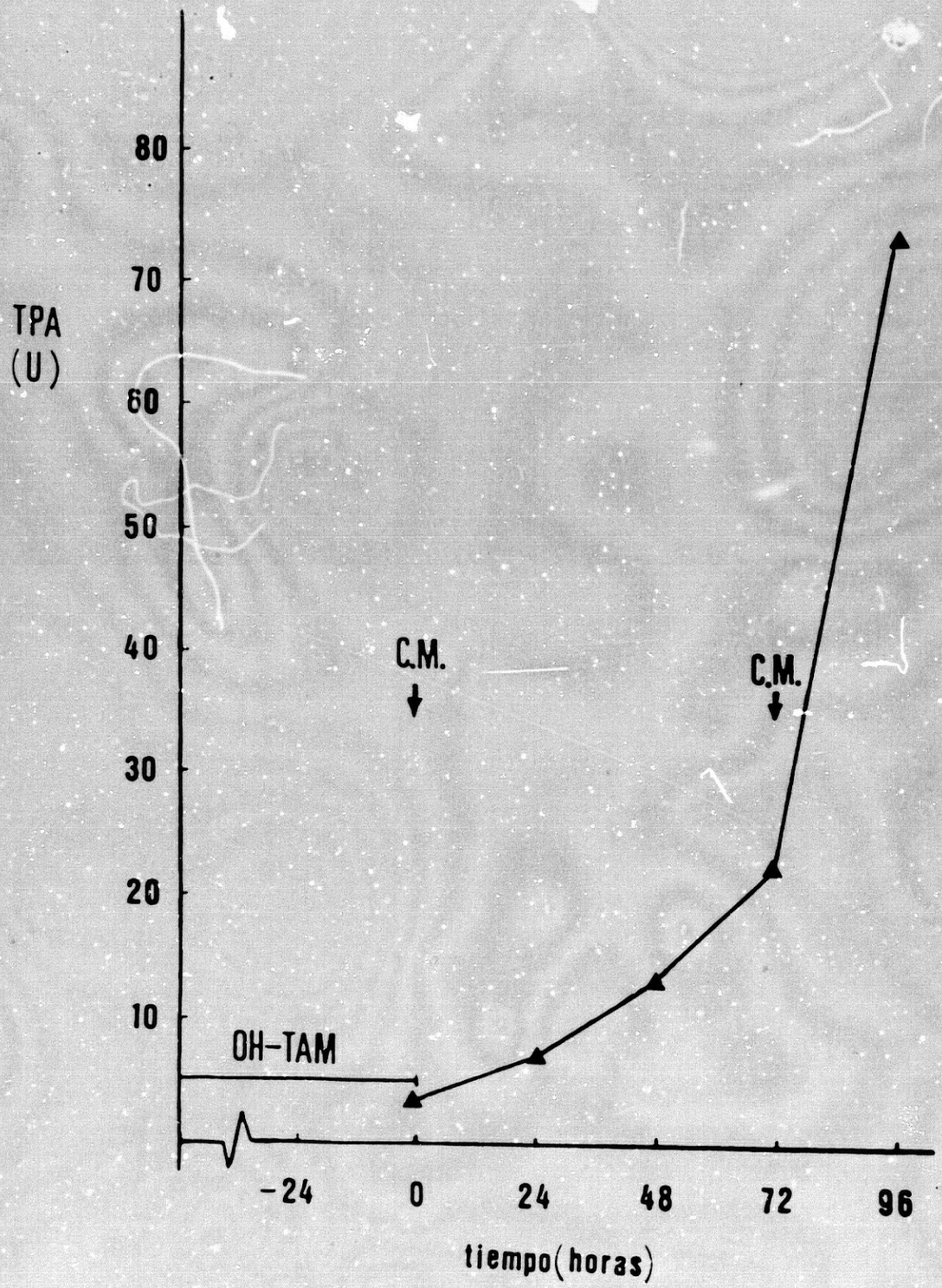


FIGURA.- 4.31

RELACION ENTRE LA LIBERACION DE TPA Y EL CRECIMIENTO CELULAR EN PRESENCIA DE EGF.

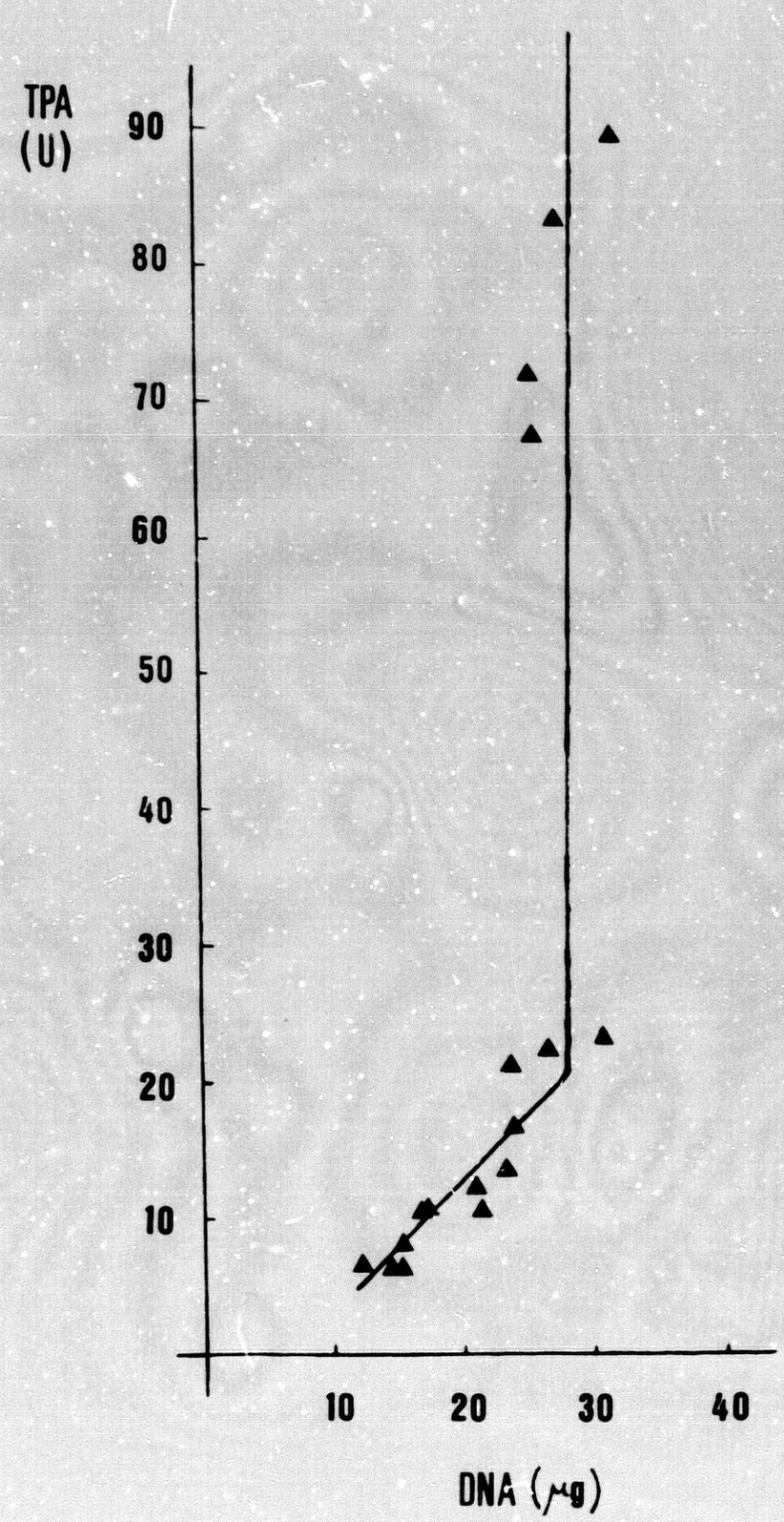
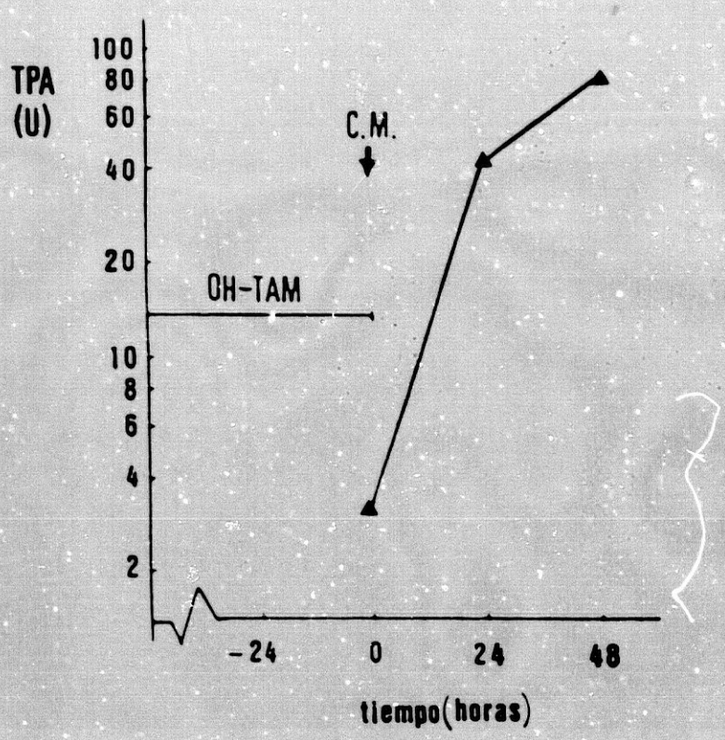


FIGURA. - 4.32

Este fenómeno, descrito anteriormente, parece estar en relación exclusiva con la destrucción celular que acontece en el cultivo confluente. A este mismo resultado se llega cuando se analizan los datos de proliferación celular en el experimento realizado en ausencia de FCS(s) (Figs. 4.33 a 4.35). Las líneas celulares tumorales establecidas requieren ciertos factores de crecimiento que aporta el suplemento de suero con el que se enriquece el medio de cultivo. En ausencia de suero, es posible conseguir el crecimiento del cultivo adicionando determinadas sustancias de acción hormonal y ciertos factores proteicos purificados. Entre ellos, la adición de insulina, transferrina, EGF, prostaglandina $F_{2\alpha}$ y globulinas insolubles a baja temperatura parece esencial para mantener la proliferación celular (15). Este medio "sintético" es ideal, también, para el aislamiento y la identificación de sustancias liberadas o secretadas por las células o para evaluar la acción de ciertas moléculas cuyos efectos puedan resultar enmascarados por los componentes del FCS. Sin embargo, cuando se utiliza EGF como suplemento exclusivo del MEM, las curvas de crecimiento en función del tiempo de cultivo presentan una pendiente negativa, fenómeno que demuestra que el número de células presente en el cultivo va progresivamente disminuyendo, por destrucción de las existentes al inicio del experimento. La destrucción celular, derivada de la ausencia de factores nutrientes indispensables, se acompaña de la liberación de los "detritus" celulares al medio de cultivo. Entre esos detritus están, evidentemente, las citoqueratinas inmunológicamente relacionadas con el antígeno TPA, cuyos niveles de concentración, muy aumentados, guardan con respecto al DNA

DOSIS-DEPENDENCIA DE LA ACTIVIDAD DEL EGF EN AUSENCIA DEL $FCS_{(s)}$. LIBERACION DE TPA. GRUPO EGF (1ng/ml).



DOSIS-DEPENDENCIA DE LA ACTIVIDAD DEL EGF EN AUSENCIA DEL $FCS_{(s)}$. CRECIMIENTO CELULAR. GRUPO EGF (1ng/ml).

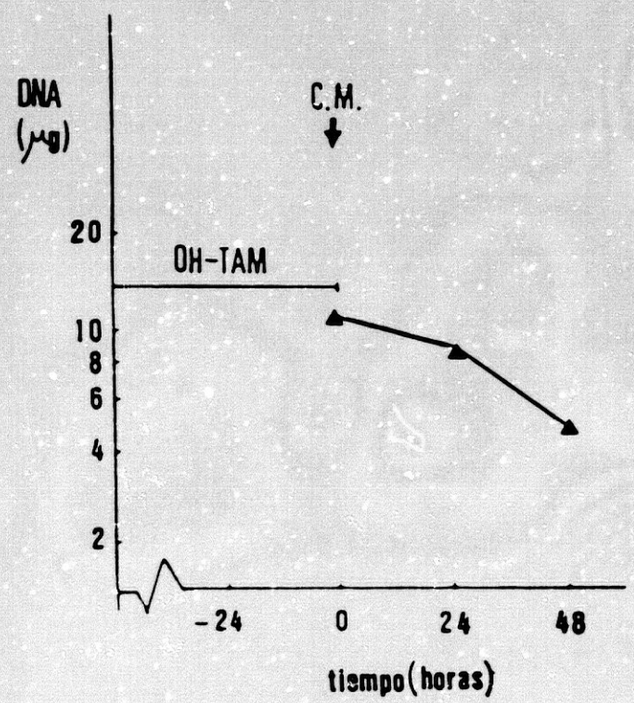
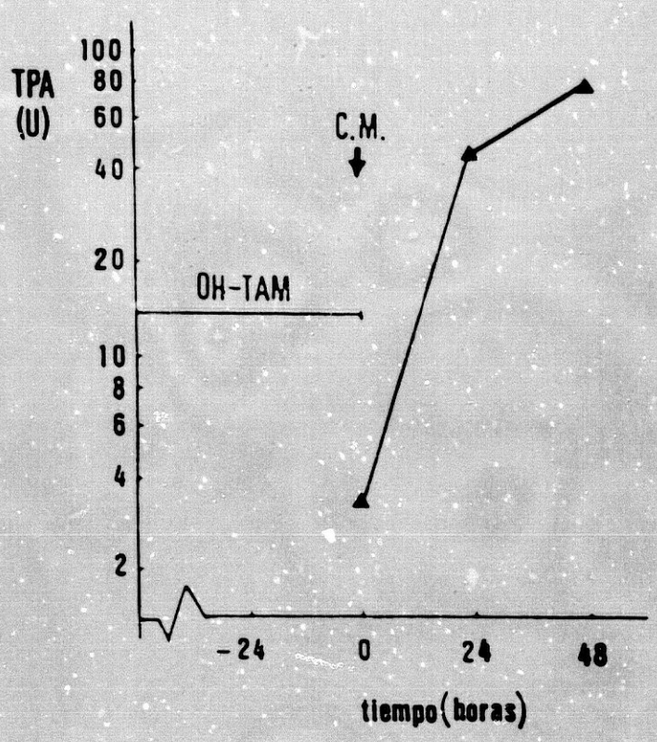


FIGURA.- 4.33

DOSIS-DEPENDENCIA DE LA ACTIVIDAD DEL EGF EN AUSENCIA DEL $FCS_{(s)}$. LIBERACION DE TPA. GRUPO EGF (10 ng/ml).



DOSIS-DEPENDENCIA DE LA ACTIVIDAD DEL EGF EN AUSENCIA DEL $FCS_{(s)}$. CRECIMIENTO CELULAR. GRUPO EGF 10 ng/ml).

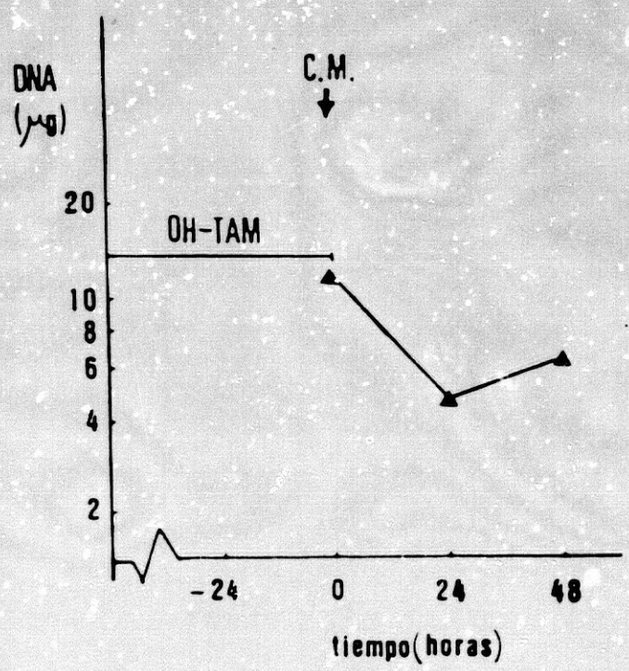
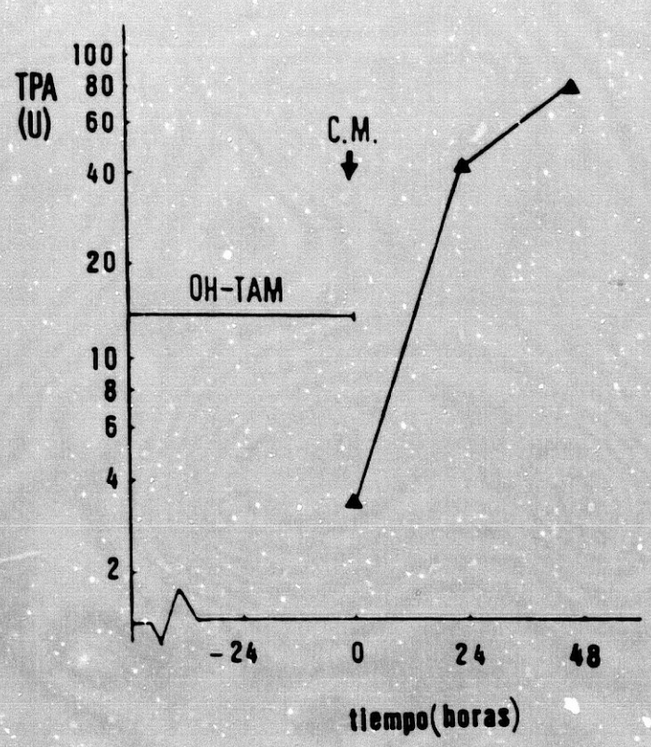


FIGURA. - 4.34

DOSIS-DEPENDENCIA DE LA ACTIVIDAD DEL EGF EN AUSENCIA DEL $FCS_{(s)}$. LIBERACION DE TPA. GRUPO EGF (100 ng/ml).



DOSIS--DEPENDENCIA DE LA ACTIVIDAD DEL EGF EN AUSENCIA DEL $FCS_{(s)}$. CRECIMIENTO CELULAR. GRUPO EGF (100 ng/ml).

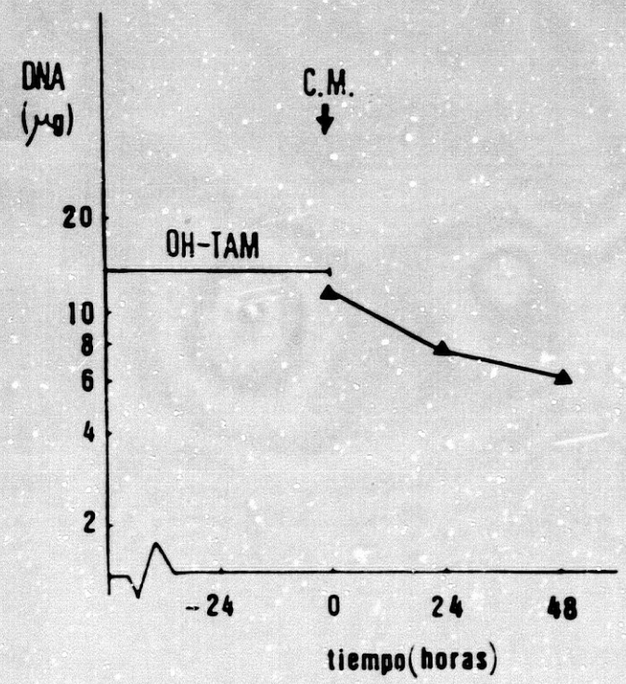


FIGURA. - 4.35

extraido del tapiz celular una relación inversa (Fig. 4.36).

4.9. DESTRUCCION CELULAR QUIMIOINDUCIDA Y LIBERACION DE TPA

La célula cancerosa presenta un blanco, móvil y variable, a la acción de las drogas usadas en quimioterapia. Casi todos los fármacos anticancerosos comparten dos propiedades comunes: actúan sobre el DNA o sobre otras moléculas biológicamente importantes y su acción está condicionada por el tiempo de exposición del blanco a niveles de concentración intracelular de droga eficaces. La "exposición" comprende dos elementos: la concentración del fármaco, [C], y el tiempo (t) durante el cual la droga existe en concentraciones citotóxicas. El producto $C \times t$ ($\mu g.\ ml.^{-1}\ min.$), denominado principio toxicológico de Haber (84) es la unidad fundamental tanto respecto a la toxicidad celular "in vivo" e "in vitro" como en relación con la toxicidad letal en animales y humanos. El producto $C \times t$ alcanza un efecto citotóxico constante para intervalos de C y t cuya variación puede ser amplia o restringida, dependiendo del fármaco y del tipo celular. Para drogas de clase III (ciclo-específicas) la constancia del efecto citotóxico abarca un intervalo mucho más amplio que el que poseen las drogas clase II (fase-específicas). La distinción entre fármacos clase I, clase II y clase III fue efectuada por Bruce y col (43) quienes definieron las drogas clase I o no fase-específicas, como aquellos agentes que son igualmente tóxicos para las poblaciones tumorales, tanto si están en

RELACION ENTRE TPA Y DNA EN AUSENCIA DE FCS.

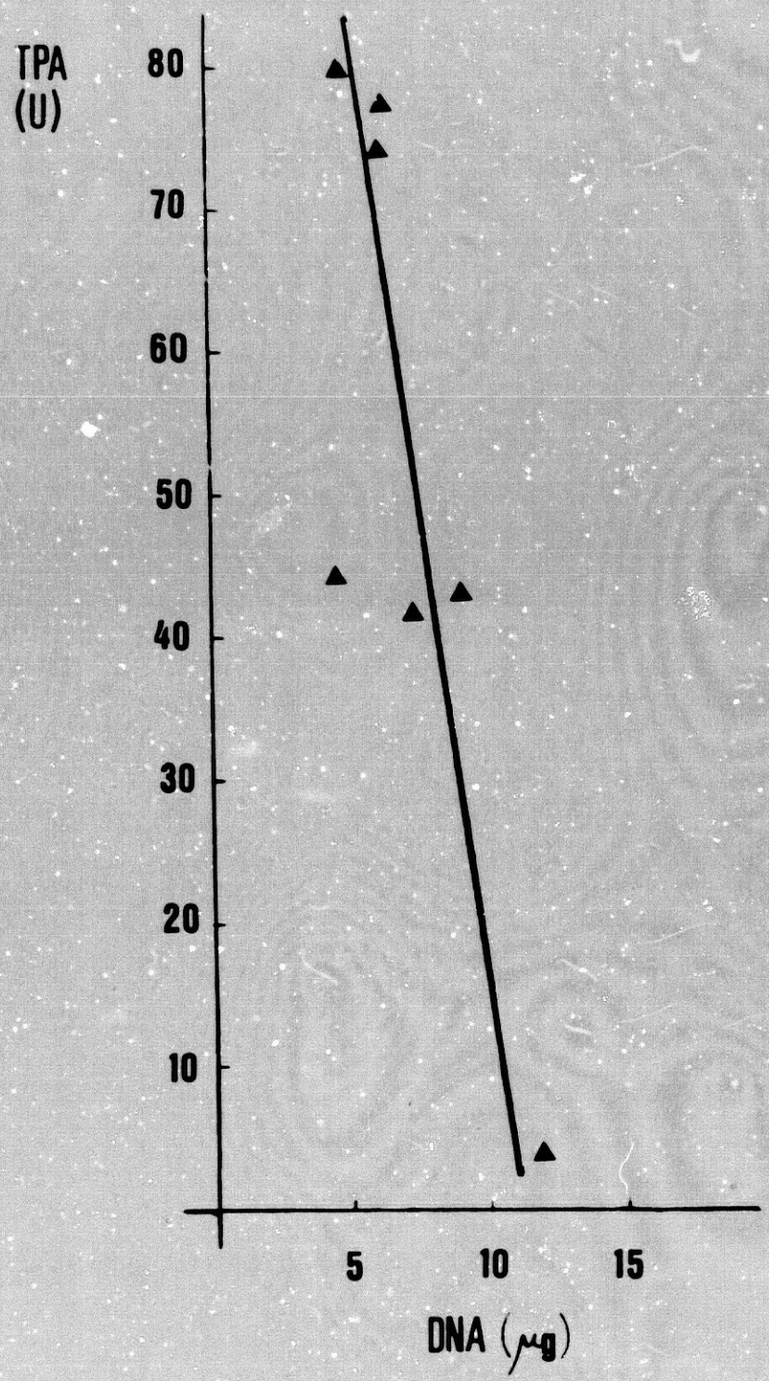


FIGURA. - 4.36

reposo (células G_o o quiescentes) como si se encuentran en proliferación. Ejemplo de este tipo de agentes pueden ser las mostazas nitrogenadas, las nitrosoureas y la radiación gamma. El grupo de drogas clase II, o agentes fase-específicos, está constituido por aquellos fármacos que "matan" a la célula en una fase determinada de su ciclo vital y no afectan a las células en reposo (G_o), si el tiempo de exposición de la droga es corto. En este grupo se incluyen los alcaloides derivados de la vinca y el metotrexate, por ejemplo. Por último, los fármacos del grupo definido por drogas de clase III o agentes ciclo-específicos actúan tanto sobre células proliferativas como quiescentes, aunque su efecto es menor sobre esta última subpoblación celular. Dentro de este apartado se incluyen drogas como la Adriamicina o el 5-Fluorouracilo.

Para investigar los efectos de los fármacos de acción antitumoral sobre la línea celular MCF-7 y estudiar el proceso de liberación de antígeno polipeptídico tisular al medio de cultivo, hemos empleado dos fármacos ciclo-específicos: ADM y 5-FU y otros dos fase-específicos: VCR y MTX. El ensayo de quimiosensibilidad se ha realizado siguiendo el procedimiento descrito en nuestro laboratorio (250) y los resultados obtenidos en la evaluación de la supervivencia celular frente a cada una de las drogas ensayadas y en función de las dosis de fármaco, se recogen gráficamente en las Figuras 4.37 a 4.40. La liberación de antígeno TPA valorada al término del ensayo, para cada uno de los experimentos de quimiosensibilidad, aparece gráficamente representada en las Figuras 4.41 a 4.44.

SUPERVIVENCIA CELULAR EN FUNCION DE LA DOSIS (μg) DE ADRIAMICINA.

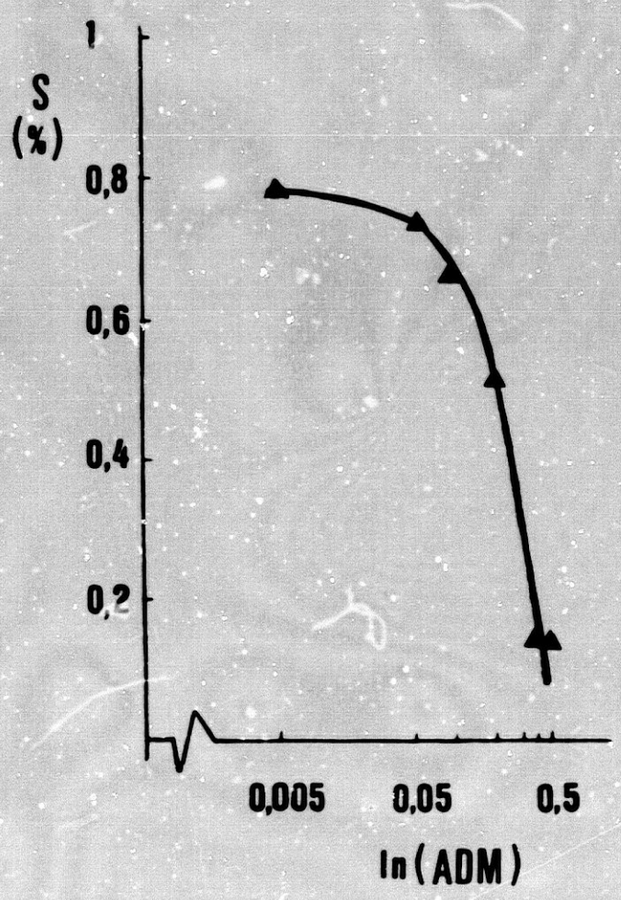


FIGURA. - 4.37

SUPERVIVENCIA CELULAR EN FUNCION DE LA DOSIS (μg) DE 5 - FLUOROURACILO.

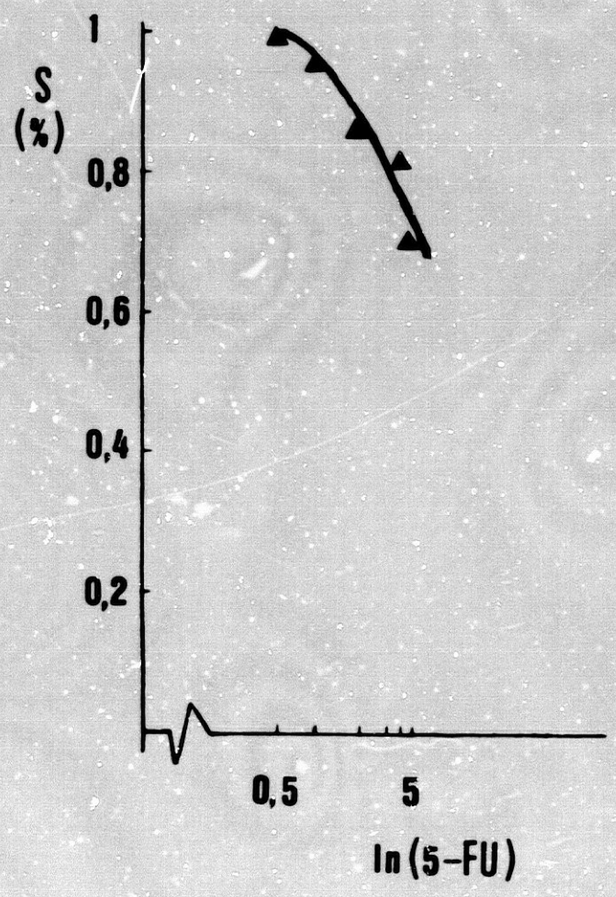


FIGURA. - 4.38

SUPERVIVENCIA CELULAR EN FUNCION DE LA DOSIS (µg) DE VINCRISTINA.

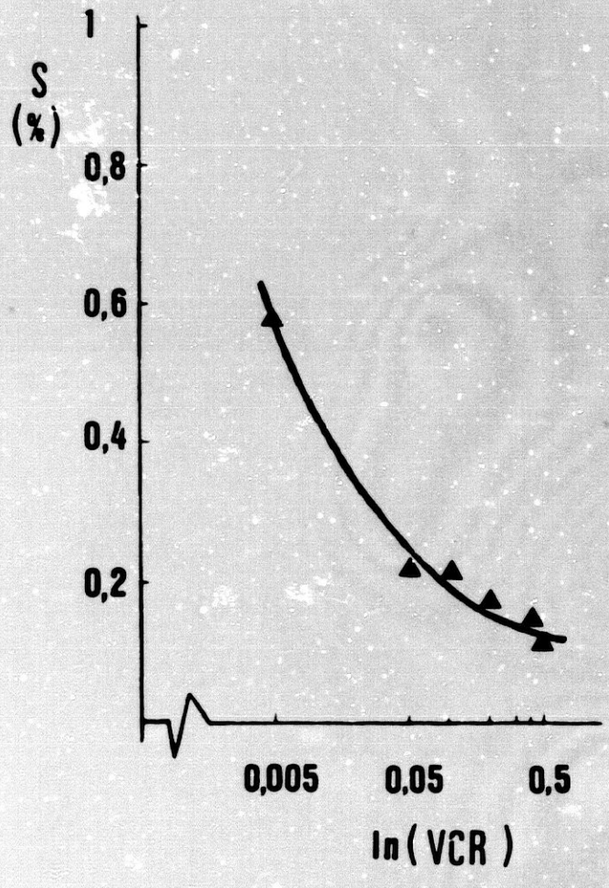


FIGURA. - 4.39

SUPERVIVENCIA CELULAR EN FUNCION DE LA DOSIS (μg) DE METOTREXATE.

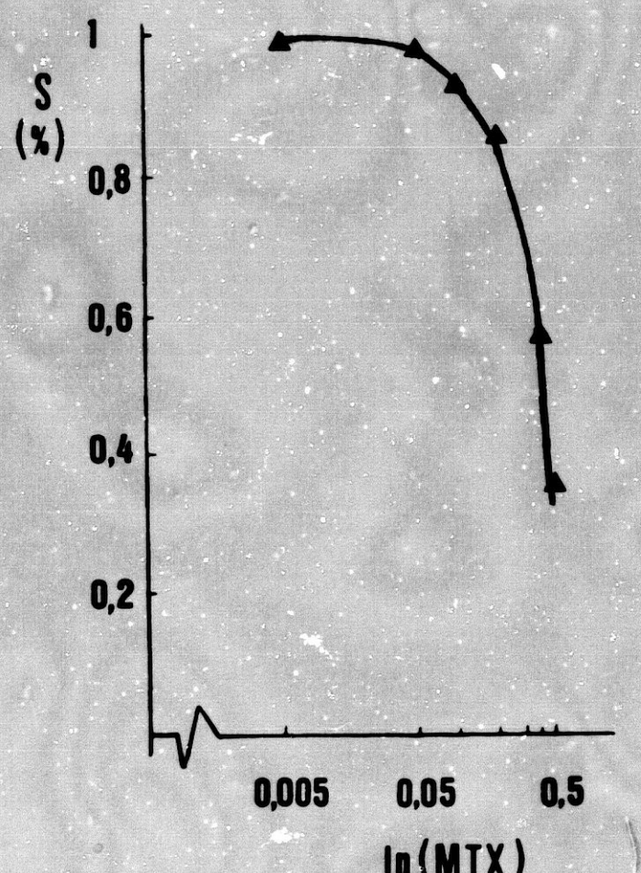


FIGURA. - 4.40

LIBERACION DE TPA EN FUNCION CON LA DOSIS DE ADRIAMICINA.

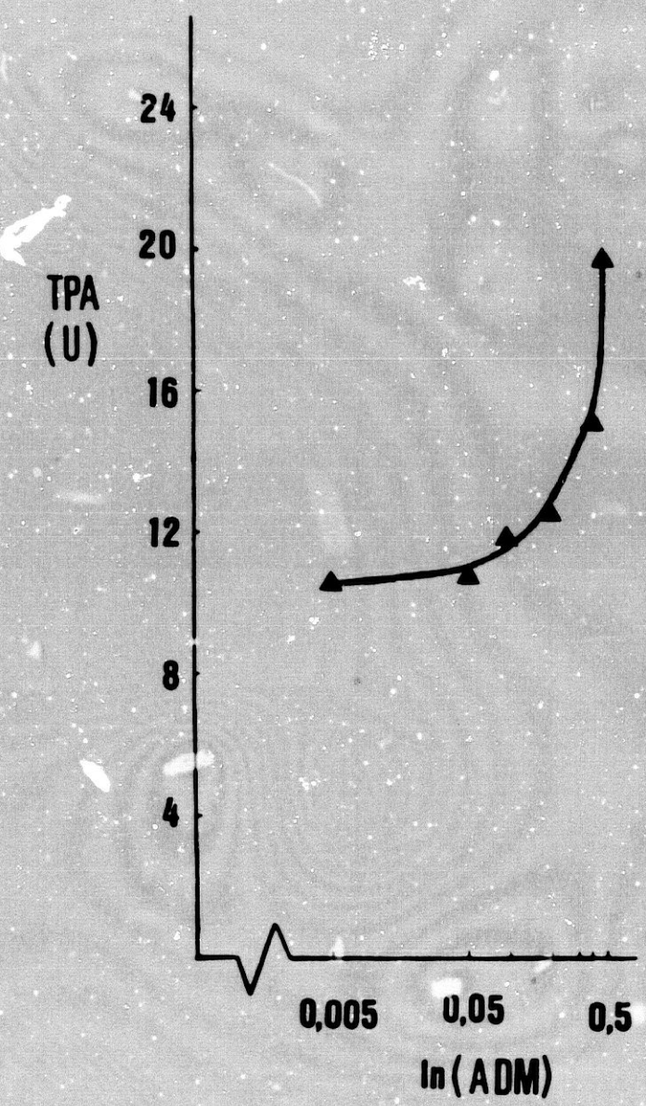


FIGURA. - 4.41

LIBERACION DE TPA EN FUNCION CON LA DOSIS DE 5-FLUOROURACILO.

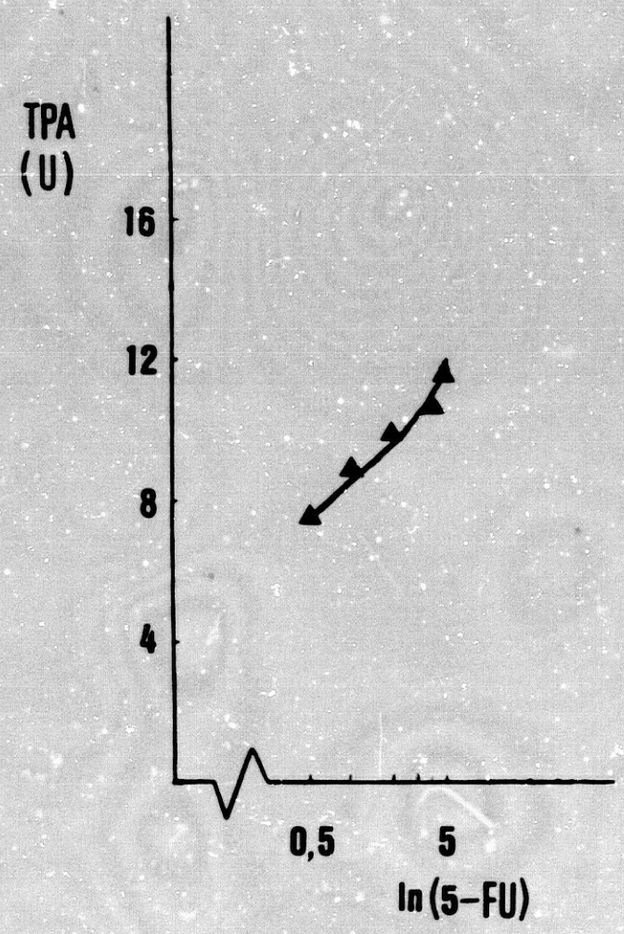


FIGURA.-4.42

LIBERACION DE TPA EN FUNCION CON LA DOSIS DE VINCRISTINA.

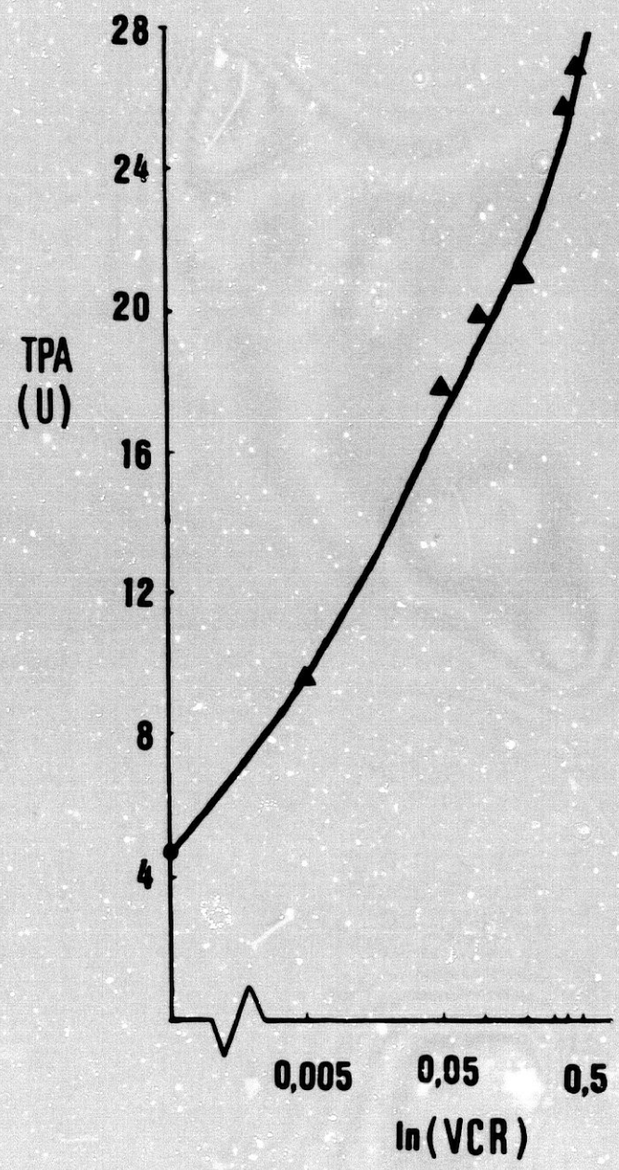


FIGURA. - 4.43

LIBERACION DE TPA EN FUNCION CON LA DOSIS DE METOTREXATE.

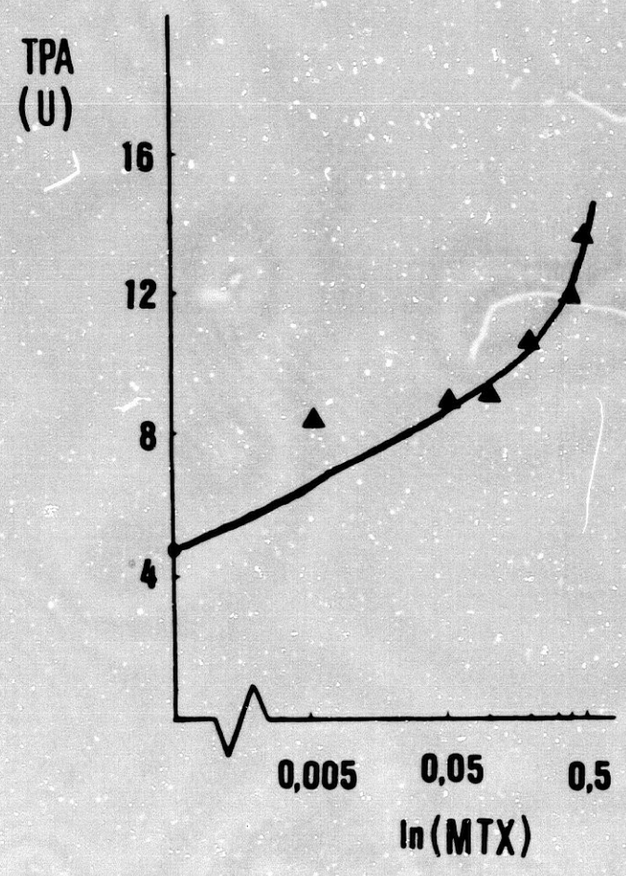


FIGURA - 4 .44

Para analizar de qué manera la liberación de TPA indica los procesos de destrucción celular hemos representado, en coordenadas cartesianas, los pares de valores DNA/TPA que corresponden a cada ensayo. Los resultados obtenidos (Figs. 4.45 a 4.48) indican que entre el número de células que sobreviven a la acción citotóxica del fármaco y la cantidad de TPA liberado al medio de cultivo existe una relación inversa. En efecto, el ajuste por mínimos cuadrados de los puntos experimentales demuestra que ambas variables (y = TPA, x = DNA) definen una línea recta de pendiente negativa. Llama, sin embargo, la atención el hecho de que los valores de la pendiente y de la ordenada en el origen de las rectas de regresión obtenidas son claramente diferentes. Así, el resultado que corresponde a la ordenada en el origen que, en este caso, representa la cantidad máxima de TPA liberado cuando la supervivencia celular se reduce a cero, varía entre 16'4 (U) para el MTX y 26'3 (U) para la VCR. De igual manera, el valor máximo y mínimo de la pendiente correspondiente a esas mismas drogas es claramente diferente (-1'43 para VCR y -0'47 para MTX). Estas diferencias deben, sin duda, asociarse a distintas acciones farmacológicas de las moléculas ensayadas. Para profundizar en tales diferencias llevamos a cabo el experimento cuyos resultados se discuten a continuación.

RELACION DE LA LIBERACION DE TPA Y LA DESTRUCCION CELULAR EN PRESENCIA DE ADRIAMICINA.

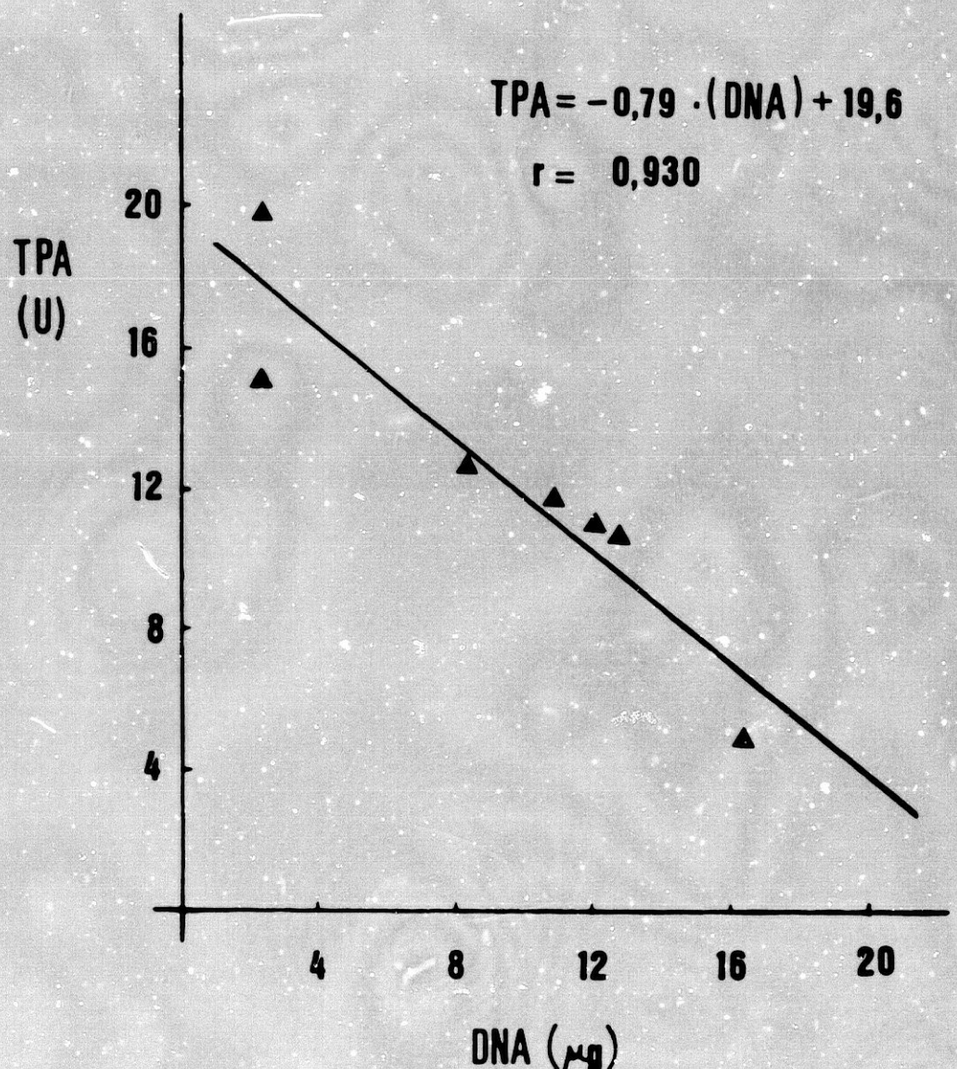


FIGURA. - 4.45

RELACION DE LA LIBERACION DE TPA Y LA DESTRUCCION CELULAR EN PRESENCIA DE 5-FLUOROURACILO.

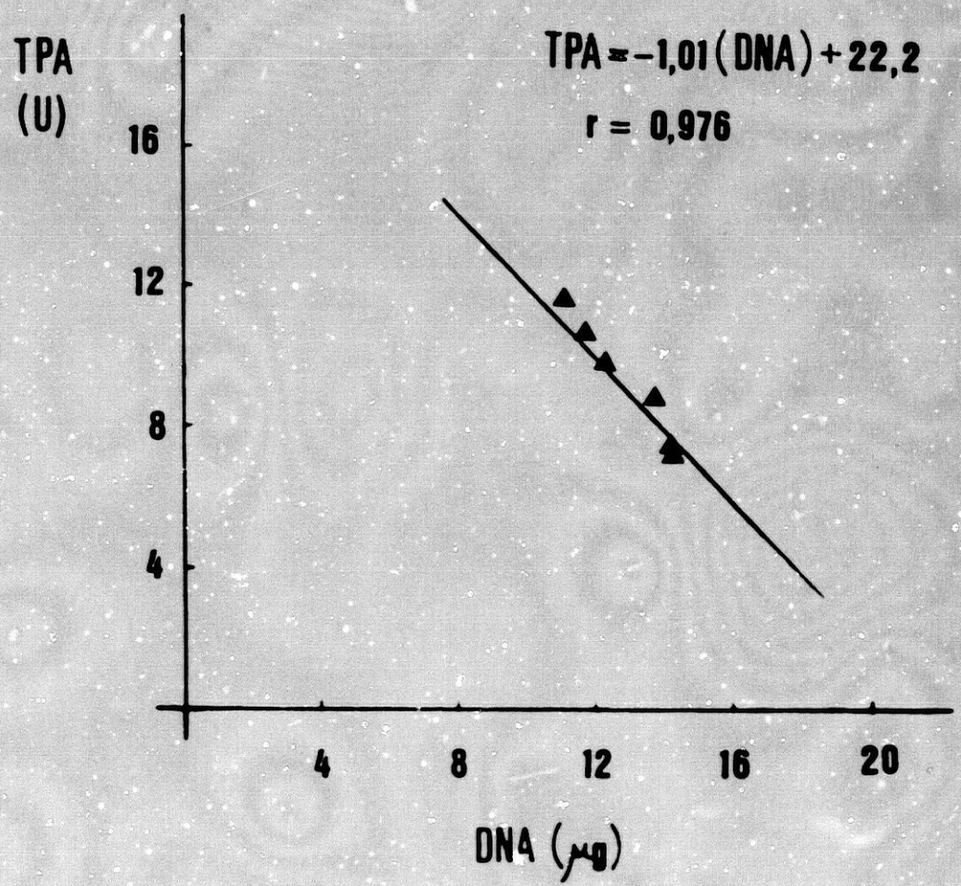


FIGURA.-4.46

RELACION DE LA LIBERACION DE TPA Y LA DESTRUCCION CELULAR EN PRESENCIA DE VINCRISTINA.

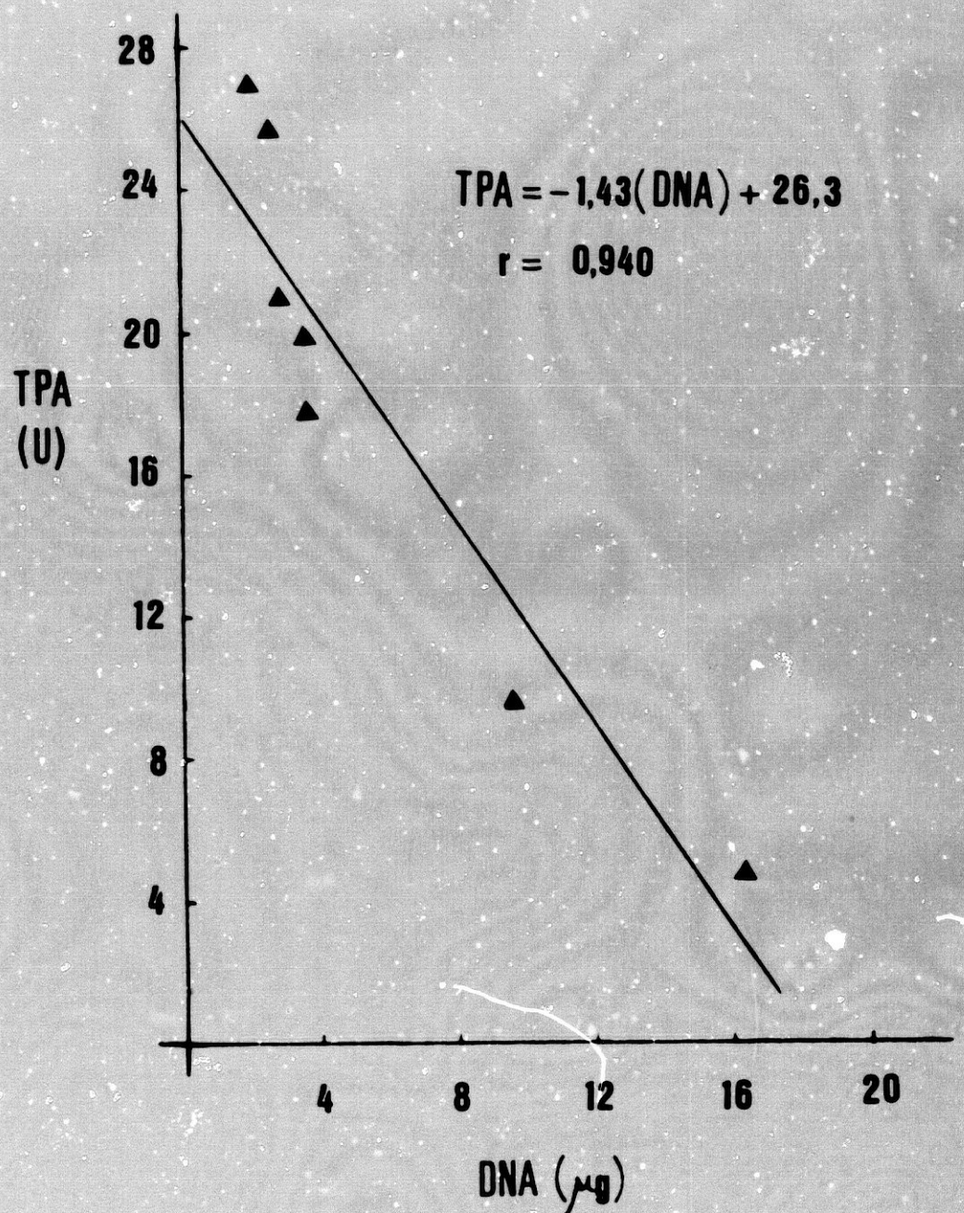


FIGURA. - 4.47

RELACION DE LA LIBERACION DE TPA Y LA DESTRUCCION CELULAR EN PRESENCIA DE METOTREXATE.

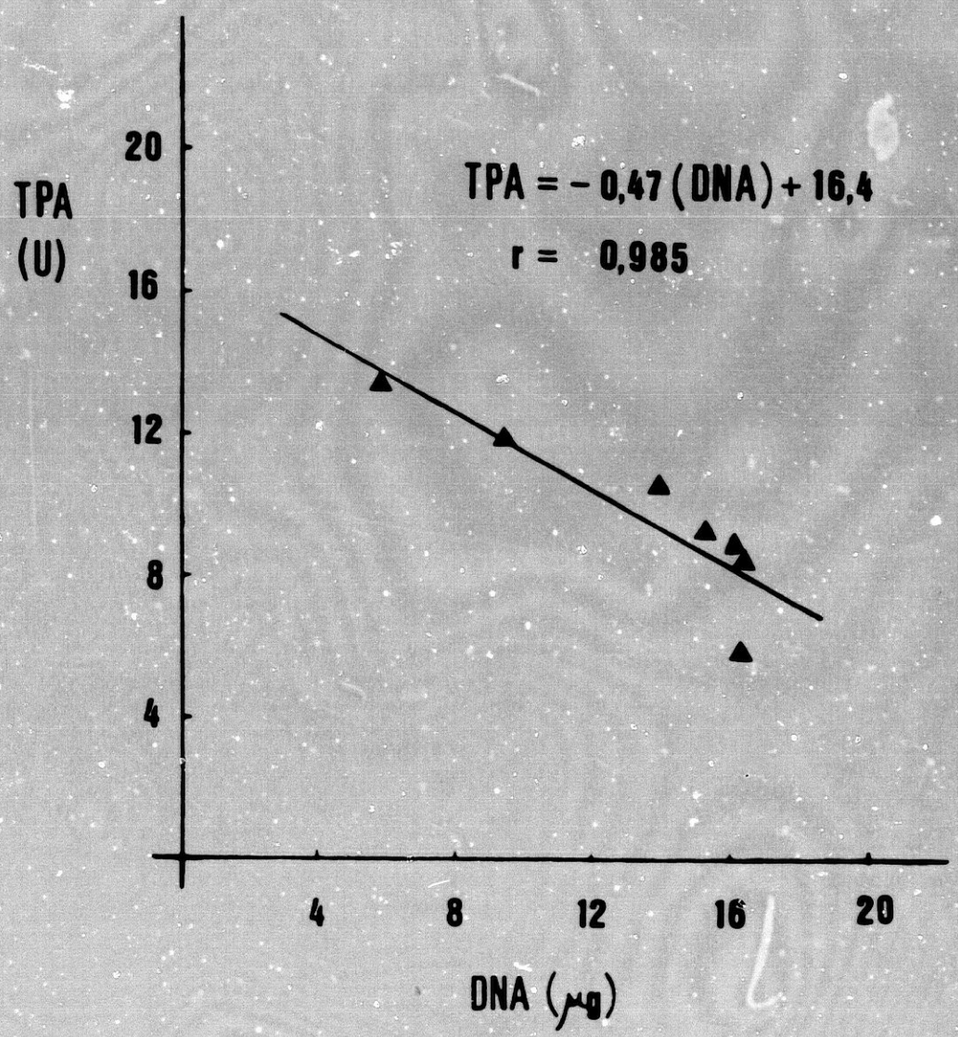


FIGURA. - 4.48

4.10. CINETICA DE LA LIBERACION DE TPA AL MEDIO DE CULTIVO DE CELULAS MCF-7 SINCRONIZADAS TRATADAS CON CITOSTATICOS

El modelo experimental se apoya en los resultados de las técnicas de sincronización y reclutamiento de células MCF-7 (308). Las células, 24 horas después de la siembra, son sometidas a la acción del OH-TAM durante 72 horas, y se tratan a continuación, durante 1 hora, con una dosis única de cada uno de los fármacos ensayados. Se aspira a continuación la disolución de droga y se adiciona medio de cultivo fresco (MEM + FCS). Por último, el crecimiento celular, en términos de DNA y TPA liberado, se cuantifica a distintos tiempos tras el cambio de medio (Figs. 4.49 a 4.52). La supervivencia celular resultante a la acción de cada una de las drogas usadas se evalúa respecto al crecimiento encontrado en los discos control. Los hallazgos obtenidos han resultado ser:

Para [ADM] = 0'1 µg./ml., fS = 0'80

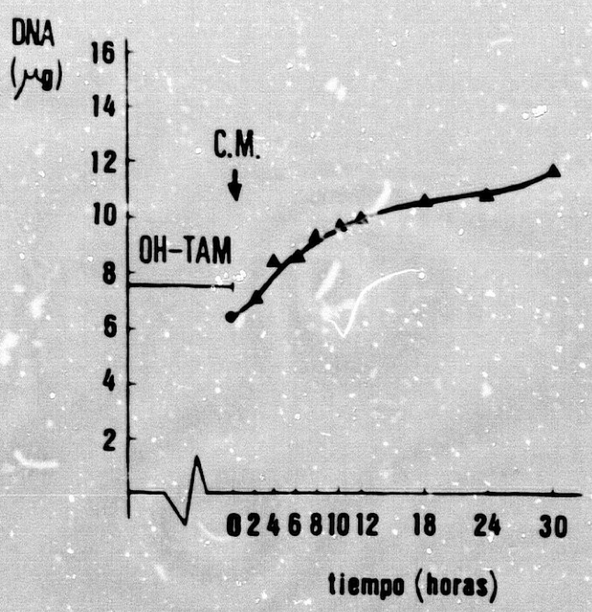
Para [5-FU] = 5 µg./ml., fS = 0'81

Para [VCR] = 0'01 µg./ml., fS = 0'85

Para [MTX] = 0'5 µg./ml., fS = 0'70

El retraso en el crecimiento de los discos tratados con QT respecto a los discos control deriva de la muerte celular quimioinducida. Los resultados de la cinética de

EVOLUCION DEL CRECIMIENTO Y DE LA LIBERACION DE TPA EN CELULAS TRATADAS CON ADM.



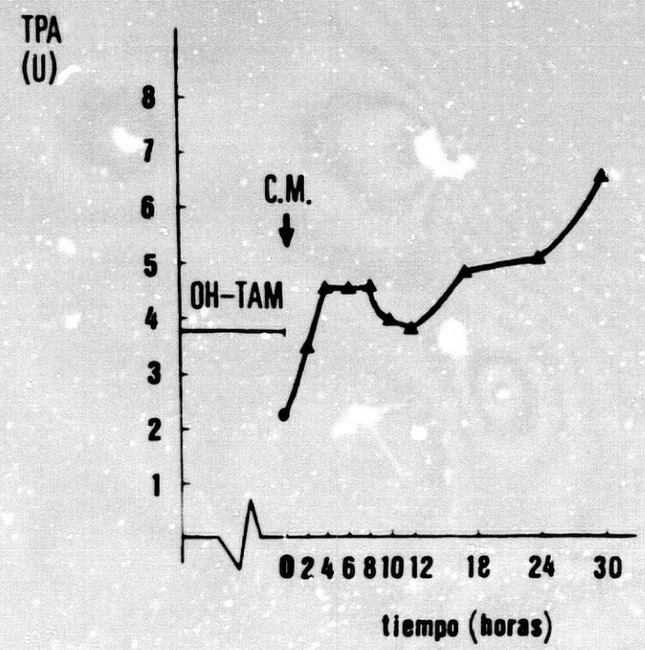
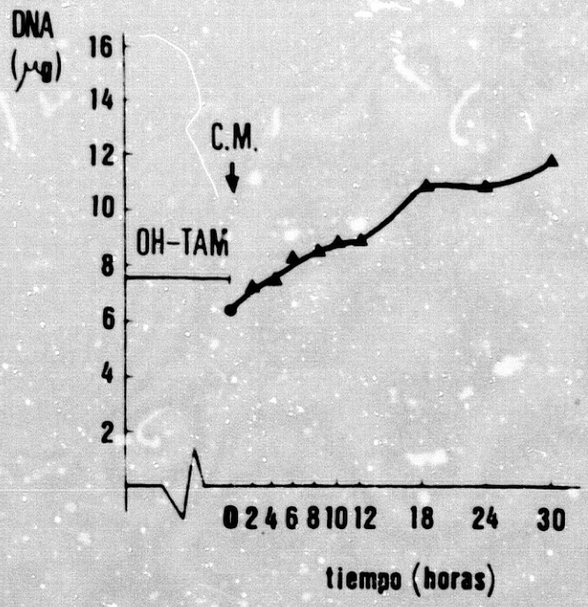


FIGURA. - 4.49

EVOLUCION DEL CRECIMIENTO Y DE LA LIBERACION DE TPA EN CELULAS TRATADAS CON 5-FU.



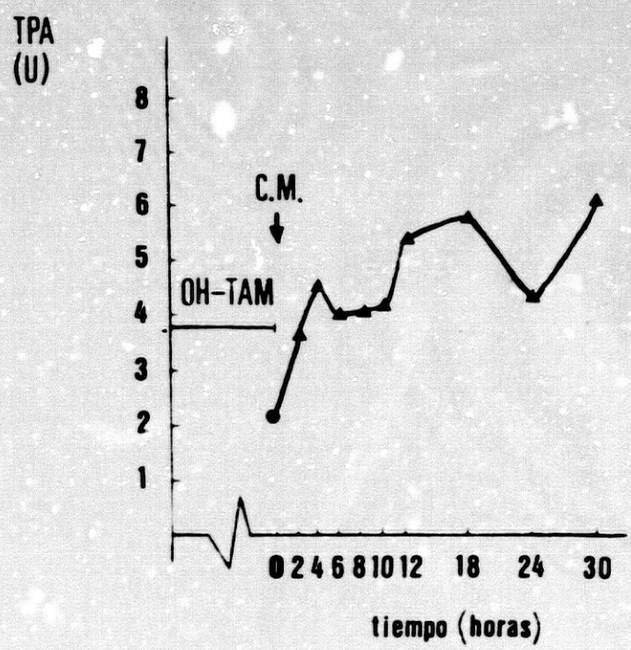
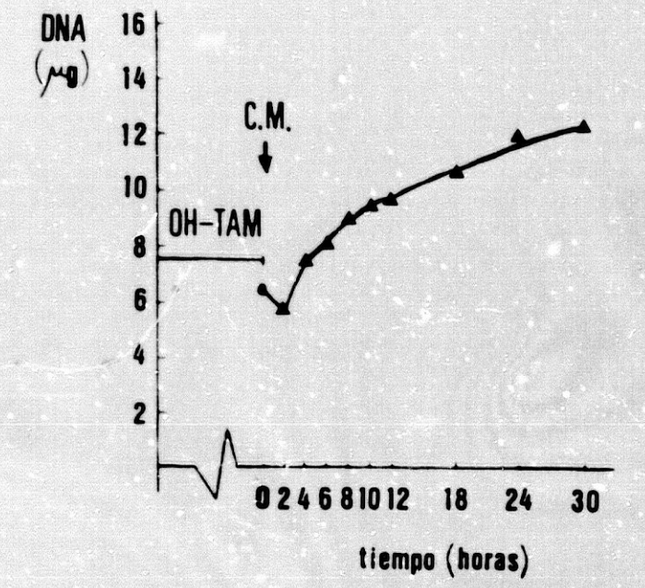


FIGURA. - 4.50

EVOLUCION DEL CRECIMIENTO Y DE LA LIBERACION DE TPA EN CELULAS TRATADAS CON VCR.



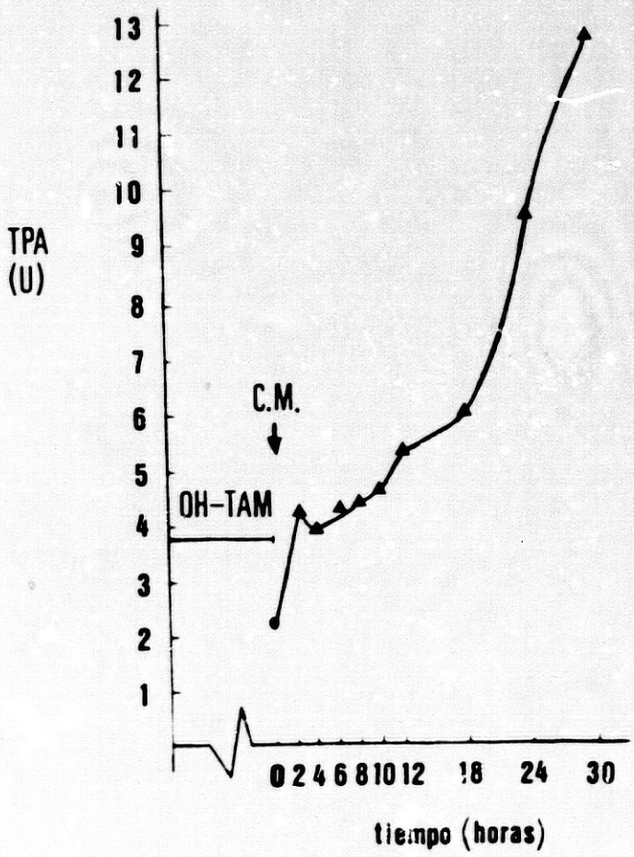
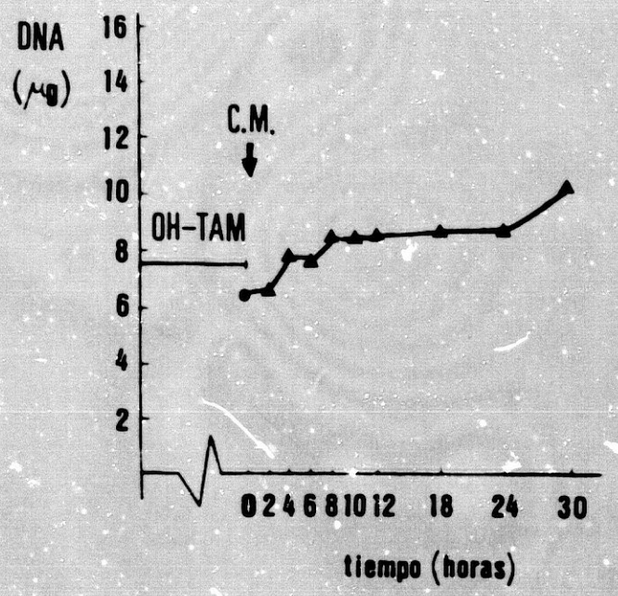


FIGURA. - 4 .51

EVOLUCION DEL CRECIMIENTO Y DE LA LIBERACION DE TPA EN CELULAS TRATADAS CON MTX.



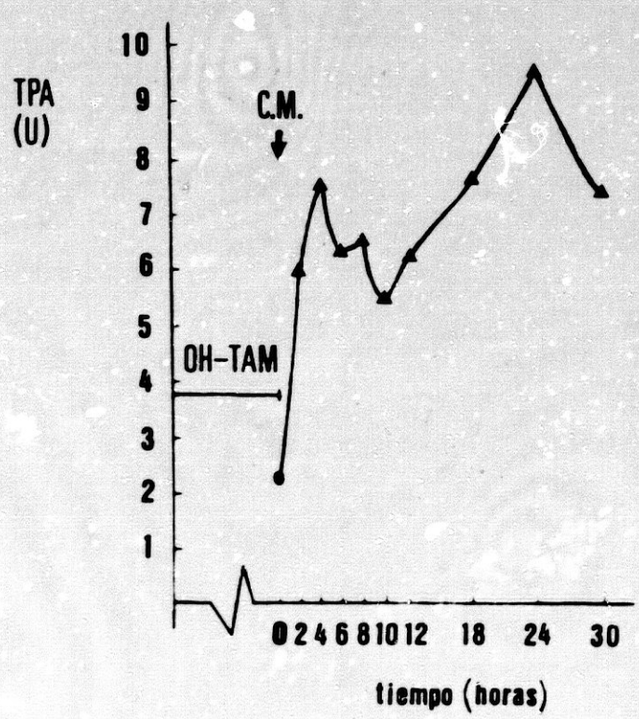


FIGURA. - 4.52

liberación de TPA al medio "marcan" estos acontecimientos y de su análisis (Figs. 4.49 a 4.52) resulta fácil deducir que entre el TPA liberado y el tiempo transcurrido tras la exposición de las células al agente citotóxico, no parece existir una relación lineal. Si suponemos, como parece lógico, que los procesos de citolisis se acompañan de la brusca liberación de restos celulares al medio de cultivo, podemos entender que la destrucción celular ocurra en instantes determinados tiempos cuya variabilidad depende del agente quimioterápico utilizado.

Resulta más fácil analizar este problema cuando se acude a la representación del cociente TPA/DNA frente al tiempo. En efecto, en las gráficas de las Figuras 4.53 a 4.56, aparecen con claridad las diferencias existentes en la relación TPA/DNA = f(t) para el experimento control (línea punteada en las figuras mencionadas anteriormente) y los valores que corresponden a los ensayos de quimiosensibilidad. El estudio individual de cada figura nos permite afirmar que para la ADM la destrucción celular ocurre en una primera fase que ocupa las primeras 8 horas tras el cambio de medio. Existe después un período en el que la destrucción celular es mínima (para t = 12 horas) al que sigue un ascenso progresivo de la relación TPA/DNA que dura hasta que se alcanza el fin del experimento (t = 30 horas). Durante ese tiempo las células, inicialmente situadas en la fase G_0-G_1, progresan a lo largo del ciclo celular, encontrándose aproximadamente a las 12 horas en fase S inicial, a las 24 horas en fase S final y a las 30 horas en fase G_2-M. La ADM es un agente intercalante que se enlaza entre las hélices del DNA alterando funciones vitales, como son la duplicación del material genético y

RELACION TPA/DNA FRENTE AL TIEMPO
(CELULAS TRATADAS CON ADM).

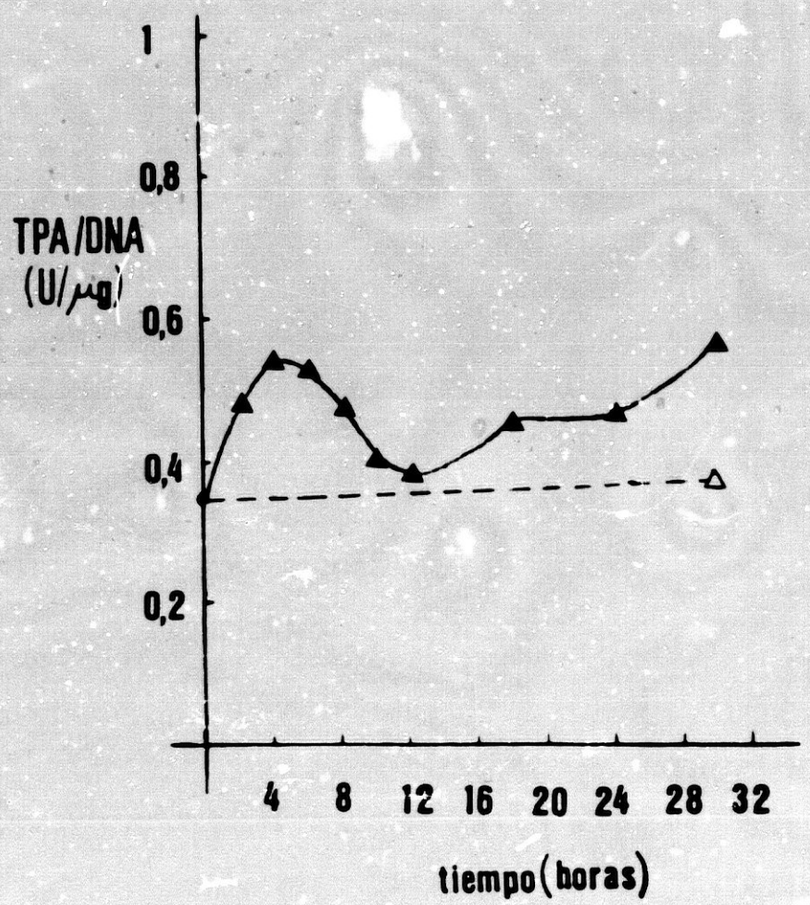


FIGURA.- 4.53

RELACION TPA/DNA FRENTE AL TIEMPO
(CELULAS TRATADAS CON 5-FU).

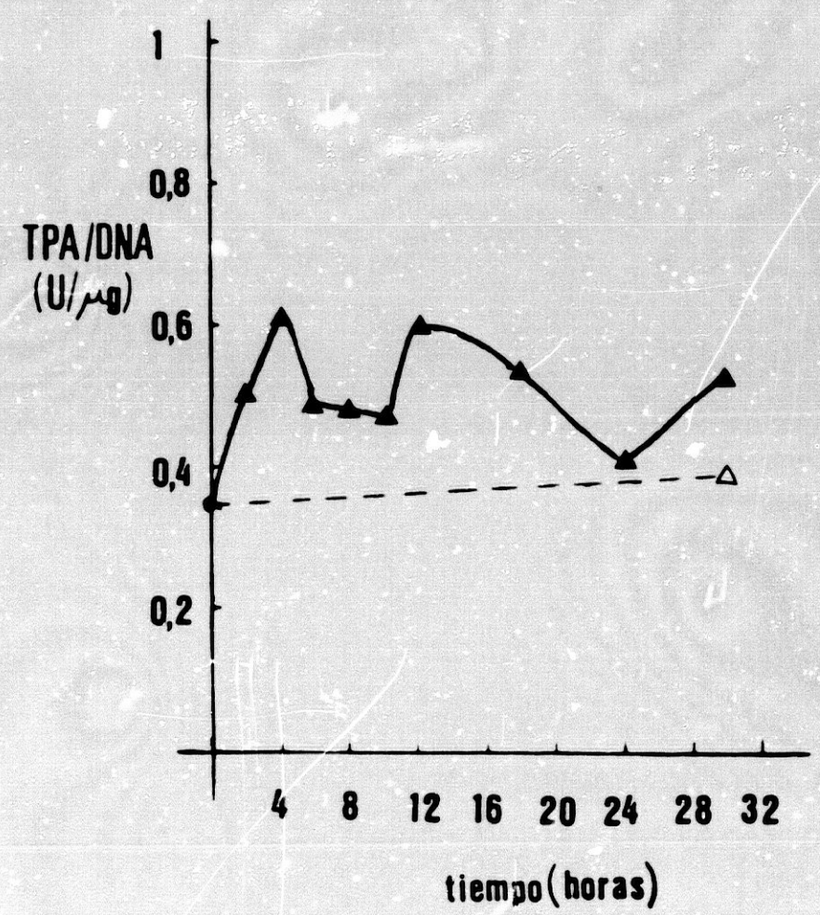


FIGURA.- 4.54

RELACION TPA/DNA FRENTE AL TIEMPO
(CELULAS TRATADAS CON VCR).

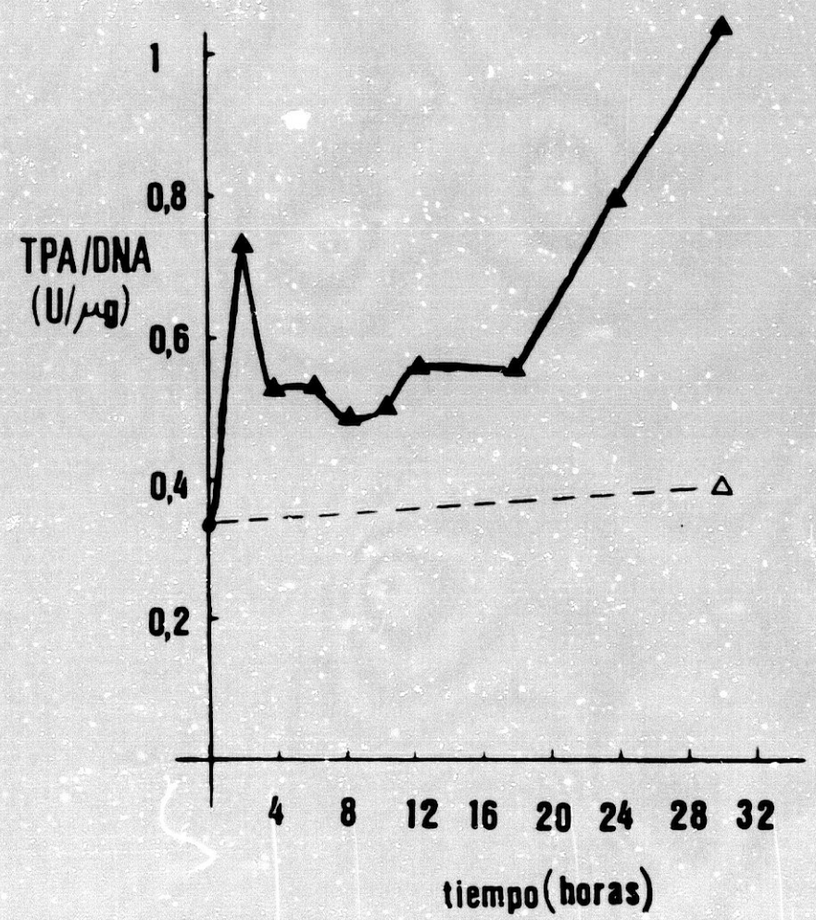


FIGURA.-4.55

RELACION TPA/DNA FRENTE AL TIEMPO
(CELULAS TRATADAS CON MTX).

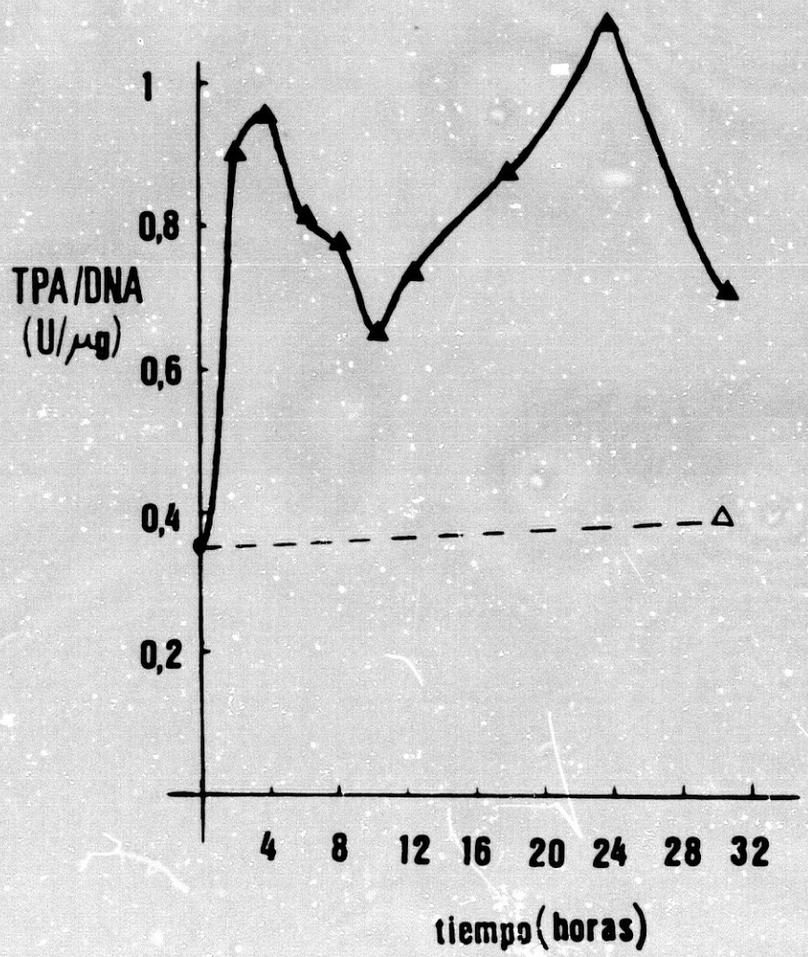


FIGURA.- 4.56

la síntesis posterior del RNA. La ruptura de las cadenas de DNA deriva de la formación de radicales semiquinonas originados enzimáticamente sobre la ADM. Estos radicales liberan peróxido de hidrógeno e hidróxido en forma de radical activo (OH^*), sustancias que resultan enormemente tóxicas para la célula. Se producen también reacciones de transferencia de electrones que, a su vez, inducen la aparición de otros radicales libres (49). Los fenómenos de toxicidad resultan máximos en fase S. Sin embargo, en presencia de bajas concentraciones de droga, las células pasan por la fase S y mueren en G_2-M (49). Estos hechos se confirman en nuestro trabajo experimental en el que se demuestra, además, que la "muerte" de las células MCF-7 tratadas con ADM es mínima en el período final de G_1. Los descensos en los niveles de antígeno TPA, que se producen a lo largo del experimento, pueden derivar de la reutilización de este material por las células del cultivo que conservan capacidad clonogénica.

Las modificaciones del ritmo de liberación de TPA para el grupo celular tratado con 5-FU demuestran que los procesos de lisis se producen mayoritariamente al inicio de G_1, de S y en G_2-M. Los mínimos se asocian con final de G_1 y final de S. Se ha demostrado, por otra parte, que el 5-FU se incorpora al RNA de las células de mamífero (57) y se desconoce de qué manera la utilización de esta molécula en la síntesis de ácidos ribonucleicos produce la inhibición del crecimiento celular (137).

Los datos correspondientes a la acción de los QT fase-específicos, VCR y MTX, muestran, si cabe, una más

acusada relación entre los procesos de muerte y lisis celular y el tiempo transcurrido tras la aplicación del fármaco. En efecto, los datos referentes a la acción de la VCR sobre células MCF-7 sincrónicas (Fig. 4.55) ponen de relieve un pico claramente definido que se situa en fase G_1 precoz. Este máximo está separado de otro por una amplia zona en la que las variaciones de la relación TPA/DNA respecto al tiempo son mínimas. La elevación brusca final ocurre para valores de tiempo que corresponden con el final de S y, sobre todo, con la fase G_2-M.

La acción de la VCR sobre células de mamífero es máxima en fase S (154). La VCR actúa también en fase M y G_1 (38). Parece probable que casi todas las acciones biológicas de esta sustancia, puedan explicarse a través de su capacidad de unión específica con la tubulina (49). La ruptura de los microtúbulos detiene la división celular en metafase. Como, por otra parte, los microtúbulos se asocian a otras muchas funciones celulares, resulta comprensible que la VCR sea activa frente a células situadas en otra fase distinta de la de síntesis.

Por último, cuando se analizan los resultados obtenidos con MTX (Fig. 4.55) es inmediata la observación de la existencia de dos máximos, bien definidos, separados por dos mínimos profundos. El primer pico corresponde al instante de tiempo en el que las células deben estar iniciando la fase presintética (G_1) y el segundo coincide con el tiempo en el que la máxima incorporación de ^{3}HTdR "marca" el periodo final de síntesis de DNA. La

destrucción celular es mínima en la fase final de G_1 y en G_2-M. Se sabe que, aunque el efecto del MTX es mayor durante la fase de síntesis (49), su acción no es exclusiva de este período puesto que es capaz también de inhibir la síntesis de RNA y de proteínas, con lo que hace más lenta la progresión celular a través de G_1 (265).

Todo lo anterior justifica, a nuestro juicio, las diferencias observadas entre las ecuaciones que ligan la supervivencia y muerte celular tras quimioterapia con la liberación del antígeno polipeptídico tisular. En particular, la acción de la VCR sobre el citoesqueleto explica que la reducción a cero de la supervivencia se acompañe de la máxima liberación de TPA, mientras que la acción inhibitoria de los fenómenos de síntesis proteica ejercidos por el MTX hace comprensible que el ensayo de Quimiosensibilidad de células MCF-7, para esta sustancia, ofrezca un valor mínimo para la extrapolación a cero del contenido celular de DNA, indicativo de la función inversa que relaciona el TPA liberado al medio de cultivo con la cantidad de células viables residuales a la quimioterapia.

CONCLUSIONES

V. CONCLUSIONES

El análisis de los resultados obtenidos en el presente trabajo y su comparación con otros datos procedentes de la literatura hacen posible, a nuestro juicio, la formulación de las siguientes conclusiones:

1. La presencia de Antígeno Polipeptídico Tisular en el medio de cultivo de dos líneas celulares experimentales de cáncer de mama (MCF-7 y EVSA-T), en niveles de concentración dependientes de la densidad celular del cultivo, demuestra que el TPA "marca" de alguna manera el proceso de proliferación celular de ambas poblaciones. En efecto, la relación observada entre las concentraciones de TPA y DNA presentes en el medio de cultivo ha resultado ser lineal, si bien la pendiente de la línea de correlación (más acusada para la población MCF-7) detecta la existencia de grados cuantitativos o niveles de relación distintos dentro de tal dependencia.

2. La cinética del proceso de liberación del TPA por los elementos celulares del cultivo es un fenómeno que guarda estrecha relación, por otra parte, con la actividad o el ritmo proliferativo de la población, hasta el punto de que los tiempos de duplicación observados en las poblaciones MCF-7 y EVSA-T (40'7 horas y 31'8 horas, respectivamente) resultan equiparables con los períodos de tiempo necesarios

para multiplicar por dos la concentración de TPA en el medio de cultivo de ambas poblaciones (39'1 y 31'8 horas, respectivamente).

3. En la población MCF-7 tanto la proliferación celular, como la secreción de TPA al medio de cultivo, han resultado estar claramente influidas por sustancias de acción hormonal diversa (Estrógenos y Antiestrógenos, fundamentalmente). La acción de los Antiestrógenos (OH-TAM 10^{-7}M) reduce de manera significativa uno y otro fenómeno. El efecto de los estrógenos resulta, en cambio, oscurecido por el estradiol endógeno presente en el medio de cultivo utilizado. El hecho de que concentraciones mínimas de 17βE$_2$ endógeno (10^{-10}M) "oculten" el posible efecto estimulante que sobre la proliferación celular de la población MCF-7 pueden ejercer mayores concentraciones de Estradiol exógeno (10^{-7}M) parece indicar la existencia de un mecanismo "total o nada" o, al menos, un fenomeno de saturación para la acción de este último.

4. La disminución de la actividad proliferativa de la población celular MCF-7 producida por los Antiestrógenos deriva de la inducción de un fenómeno de bloqueo o acumulación celular en G_1 resultante de la alteración -en favor de tiempos G_1 más largos- del equilibrio que rige, en condiciones normales, la distribución de los tiempos de ciclo de la población considerada. La consecuencia final de este proceso es la sincronización, total o parcial, de los elementos celulares de la población en G_1.

5. El bloqueo y/o la sincronización en G_1 de los elementos celulares de la población MCF-7 determinan un cambio profundo en la cinética de crecimiento de las células, cambio que -respecto de la población celular no sincronizada en idénticas condiciones de cultivo- se traduce por un incremento significativo de la Fracción de Crecimiento (81% "vs" 45%) y una disminución acusada del Tiempo de Duplicación (24'8 horas "vs" 40'7 horas) cuando la población, libre de la influencia del OH-TAM, queda expuesta a la acción del $17\beta E_2$. Una posible explicación para este fenómeno sería el reclutamiento de células quiescentes de la población (G_0) que irían a engrosar el compartimento G_1 y siguientes, una vez eliminado el antiestrógeno del cultivo. De acuerdo con el estado actual de los conocimientos relativos al tema, este efecto cabe atribuirlo al $17\beta E_2$ endógeno presente en los medios de cultivo utilizados.

6. En la población MCF-7 sincronizada por acción del OH-TAM el $17\beta E_2$ exógeno adicionado al cultivo induce, además, un acortamiento suplementario del Tiempo de Duplicación (22'2 "vs" 24'8 horas) y un incremento discreto pero real de la Fracción de Crecimiento (94% "vs" 81%) respecto de los observados en la población celular liberada de la influencia del OH-TAM, pero no sometida a la acción del estradiol exógeno. El incremento de la fracción de crecimiento responde a la potenciación del mecanismo de reclutamiento $G_0 \longrightarrow G_1$ antes descrito. La disminución del tiempo de duplicación celular observado resulta ser simple consecuencia del incremento y progresión sincronizada

de las células integrantes de la fracción de crecimiento de la población.

7. La acción del 17βE$_2$ sobre los elementos, total o parcialmente sincronizados, de la población celular MCF-7 se traduce, así mismo, por un incremento en los niveles de concentración de TPA en el medio de cultivo, incremento que, de acuerdo con las experiencias realizadas en el presente estudio, es particularmente importante en el periodo de tiempo correspondiente a las fases G_2/M y G_1 del ciclo celular de las células cultivadas. El máximo de secreción se produce, concretamente, durante la fase M.

8. Un efecto similar al descrito para el 17βE$_2$ a bajas concentraciones y aditivo con el de éste ha podido demostrarse para el Epidermal Growth Factor (EGF) en cultivos de células MCF-7. En cualquier caso, la acción estimuladora ejercida por el EGF sobre la proliferación celular es especialmente importante cuando en el medio de cultivo existe estradiol, cuyo efecto puede concluirse en consecuencia, que potencia.

9. La acción del EGF parece, por otra parte, independiente de la dosis, cuando se utilizan bajas concentraciones del mismo, e inhibitoria del crecimiento celular, cuando se utiliza a altas concentraciones. Los mecanismos que rigen uno y otro tipo de efecto no son, hoy día, bien conocidos.

10. En cultivos en fase de confluencia celular la linealidad de la relación [DNA]/[TPA] se pierde abruptamente como consecuencia de un incremento considerable del nivel de concentración de TPA en el medio de cultivo no sometido, por otra parte, a factores de orden exógeno. Responsable de este fenómeno parece ser el proceso de lisis o destrucción celular que se inicia, por razones de insuficiencia de nutrientes, en la citada fase.

11. Que la presencia de concentraciones elevadas de TPA en el medio de cultivo es consecuencia de un acusado proceso de destrucción celular que libera al medio de cultivo importantes cantidades de citoqueratinas (proteínas inmunológicamente relacionadas con el TPA), se reafirma, concluyentemente, por el hecho de que idéntico fenómeno se pone de manifiesto tras la exposición de la población celular sincronizada MCF-7 a diferentes citostáticos y la demostración de la existencia de una relación inversa entre nivel de supervivencia celular y concentración de TPA.

12. Finalmente y en la que a la cinética de liberación del TPA al medio de cultivo MCF-7, tras exposición a diferentes tipos de drogas se refiere, parece existir igualmente un cierto tipo de relación entre la naturaleza del agente citotóxico utilizado (ciclo o fase específico) y el período del ciclo celular en el que resulta máxima la secreción de TPA. El hallazgo precedente facilita, por ello, una aproximación al

conocimiento del mecanismo de muerte celular quimio-inducida.

BIBLIOGRAFIA

VI. BIBLIOGRAFIA

1. AARONSON, S.A.; TODARO, G.I. and FREEMAN, A.E. (1970).:

Huma. sarcoma cells in culture, identification by colony - forming ability on monolayers of normal cells. Exp. Cell. Res, 61: 1-5.

2. ABRAMS, H.D.; ROHRSCHNEIDER, L.R. and EISEN, R.N. (1982).:

Nuclear lacation of the putative transforming protein of avain myelocytomatosis virus. Cell, 29: 417-439.

3. ACKER, H.; CARLSSON, J.; DURAND, R. et al. (1984).:

Spheroids in Cancer Research. Methods and Perspectives. Asker, H; Carlsson, J.; Durand, R. and Sutherland, R.M. eds Springer - Verlag Ed. New York.

4. ADAM, J.M.; DOUGLAS, E.J. and KEMP, J.M. (1979).:

The metabolism of tamoxifen in humans. Biochem. Pharmacol., 28 : 145-147.

5. ALITALO, K.; RAMSAY, G.; BISHOP, J.M. et al. (1983).:

Identification of nuclear proteins encoded by viral and cellular myc oncogenes.
Nature (Lond.), 306: 274-277.

6. ALLEGRA, J.C.; KORAT, O.; D.O., H.M.T. et al. (1981).:

The regulation of progesterone receptor by 17β-Estradiol and Tamoxifen in the ZR-75-1 Human Breast cancer cell line in defined medium.
J. Recep. Res., 2: 17-27.

7. ALLISON, A.C. (1973).:

The role of microfilaments and microtubules in cell movement endocytosis and exocytosis.
CIBA Found. Symp., 14: 109-148.

8. AMERICAN CANCER SOCIETY. (1980).:

Cancer Facts and Figures.
American Cancer Society.

9. ANDREN - SANBERG, A. and ISACCSON, S. (1977).:

Tissue polypeptide antigen in colorectal carcinoma.
Proceedings of symposium of the clinical application of carcinoembrionic Antigen Assay.
Excepta Medica Int. Congress, N., 439 : 139-143.

10. ANZANO, M.A.; ROBERTS, A.B. et al. (1982).:

Synergistic interaction of two classes of transformig growth factors from murine sarcoma cells.
Cancer Res., 42: 4776-4778.

11. ARNOLD, H. and PETTE, D. (1968).:

Binding of glycolytic enzymes to structure proteins of the muscle.
Eur. J. Biochem., 6 : 163-171.

12. ASCH, B.B.; MEDINA, D. and BRINKLEY, B.R. (1979).:

Cytoskeletal changes associated with neoplastic progression in mouse mammary epithelial cells.
Cancer Res., 39: 893-907.

13. ASCH, J.F.; LOUVARD, D. and SINGER, S.J. (1977).:

Antibody - induced linkages of plasma membrane proteins to intracellular actomyosin-containing filaments in cultured fibroblasts.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 74: 5584-5588.

14 BADGER, A.M.; BUEHLER, R.J. and COOPERBANDS. (1978):

Immunosuppressive Activit and Tissue Polipeptide Antigen Content of Human Ascitis Fluids.
Cancer Res., 38: 3365-3370.

15. BARNES, D. and SATO, G. (1979).:

Growth of a human mammary tumour cell line in a serum-free medium.
Nature, 281: 388-389.

16. BARRACK, E.R. (1983).:

The nuclear matrix of the prostate contains acceptor sites for androgen receptors.
Endocrinology, 113: 430-432.

17. BARRACK, E.R. and COFFEY, D.S. (1980).:

The specific binding of estrogens and androgens to the nuclear matrix of sex hormone responsive tissues.
J. Biol. Chem., 225: 7265-7275.

18. BERRIDGE, M.J. and IRVINE, R.F. (1984).:

Inositol triphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction.
Nature (Lond), 312: 315-321.

19. BIEDLER, J.L. (1976).:

Chromosome abnormalities in human tumours cells in culture.
In Fogh J. (ed.): "Human Tumour cells in vitro". Academic Press New York.

20. BJÖRKLUND, B. (1956).:

Antigenicity of Malignant and Normal Human Tissues by gel Diffusion Technique.
Int. Arch. Allergy, 8: 179-192.

21. BJÖRKLUND, B. (1971).:

Systematic Antigenic change in Human carcinoma.
Tissue By Hemagglutination Techniques.
Int. Arch. Allergy, 36: 191-203.

22. BJöRKLUND, B. (1979).:

Tissue Polypeptide Antigen. En: Laboratory testing of cancer. Hautkam H, Högman, A. (ed) Folksam. Stockholm., pp. 5-11.

23. BJöRKLUND, B. (1980).:

On the nature and clinical use for Tissue. Polypeptide Antigen (TPA). Tumor Diagnostik, 1: 9-20.

24. BJöRKLUND, B. (1981).:

Tissue polypeptide antigen. Review and recent progress. En: Critical evaluation of tumor markers; Kleist S, Brener H. (eds). Busel: Karger, pp. 73-80.

25. BJöRKLUND, B. (1983).:

Overview on TPA: Specificity, Immunochemistry and Biological Basis. In: H. Peeters (ed.) Protides Biol. Fluids Proc. Colloq. 31 (1983), Pergamon Press, Oxford, pp. 425-430.

26. BJöRKLUND, B. and BJöRKLUND, V. (1957).:

Antigenicity of Pooled Human Malignant and Normal Tissues by Cytoimmunological Technique.Presence of an Insoluble. Heat Labile Tumor Antigen.
Int. Arch. Allergy, 10: 153-184.

27. BJöRKLUND, B. and BJöRKLUND, V. (1983).:

Specifity and Basis of the Tissue Polipeptide Antigen En: Human Tumors Marker Nieburgs M.E., Birkmayer G.D., Klavins J.V. (ed), Alan R. Liss Inc. New York, pp. 41-50.

28. BJöRKLUND, B. BJöRKLUND, V.; LUNDSTRöN, R. et al. (1976).:

Tissue Polipeptide Antigen (TPA) in Human cancer. Defense Response. En: The Reticulo-endothelial System in Health and Disease. Friedman H, Escobar M.R. (ed). Plenum. New York, pp. 357-370.

29. BJöRKLUND, B.; BJöRKLUND, V.; WIKLUND, B. et al. (1973).:

A Human Tissue Polypeptide Related to cancer and placenta. Immunological Techniques for Detection of cancer. Björklund B, Bonniers (ed.) Stockholm, pp. 133-187.

30. BJÖRKLUND, B., LUNDBLAD, G. and BJÖRKLUND, V. (1958).:

Antigenicity of Pooled Human Malignant and Normal. Tissues by Cytoimmunological Technique II. Nature of Tumor Antigen.
Int. Arch. Allergy, 12: 241-261.

31. BJÖRKLUND, B. and PAULSSON, J.E. (1962).:

Studies of Hemagglutination as a Means for Assay of Malignant and Normal Human Tissue Antigens.
J. Immunol., 89: 759-766.

32. BJÖRKLUND, B.; WIKLUND, B.; LUNING, B et al. (1980).:

Radioimmunoassay of TPA. A laboratory test in cancer Tumor diagnostik, 2: 78-84.

33. BJÖRKLUND, V. and BJÖRKLUND, B. (1979).:

Localization of syntesis of TPA in normal and malignant human tissues by immunohistological techniques. En: Protide of the biological fluids. Peeters, H. (ed.) Pergamon Press Oxford, pp. 229-232.

34. BJÖRKLUND, V. and BJÖRKLUND, B. (1979).:

Protides of the Biological Fluids. En: H. Peeters(ed.) Pergamon Press, Oxford, vol. 27, pp. 229.

35. BONADONA, G. and VALAGUSSA, P. (1984).:

Contribution of p.ognostic factors to adju'ant chemotherapy in breast cancer. En: Recent results in cancer research. H.J. Senn (ed). Springer-Verlag, Berlin pp. 431-437.

36. BONNEY, R.C.; REED, M.J. and JAMES, V.H. (1985).:

Kinetic studies of es+radiol 17β-hidroxysteroid dehydrogenase in MCF-7 mammary cancer cells.
J. Steroid. Biochem., 23: 1079-1081.

37. BORTHWICK. N.M. and SMELLIE, R.M.S. (1975).:

The effects of oestradiol-17β on the ribonucleic acid polymerases of immature rabitt uterus.
Biochem. J., 147: 91-101.

38. BRADE, W.P. (1980).:

Critical review of pharmacology, toxicology, pharmaco - Kinetics of vincristine, vindesine, vinblastine. En: Proceedings of the Internacional Vinca Alkaloid Symposium. Brade, W.P.; Homburg, B.; Nagel, G.A.; Seeber, S. eds. Karger Ed. New York, pp. 95-193.

39. BRINKLEY, B.R.; BEALL, P.T.; WIBLE, L.J. et al. (1980).:

Variations in cells from and cytoskeleton in human breast carcinoma cells in vitro.
Cancer Res., 40: 3118-3129.

40. BRINKLEY, B.R.; FULLER, G.M. and HIGHFIELD D.P. (1975).:

Cytoplasmic microtubules in normal and transformed cells in culture: analysis by tubulin antibody immunofluorescence.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 73: 4981-4985.

41. BROOKS, S.C.; HANSEN, E.R.; SAUNDERS, D.E. et al. (1984).:

Effect of growth on the estrogen receptor levels in MCF-7 cells.
Cancer Res., 44: 3274-3729.

42. BROOCKS, S.C.; LOCKE, E.R. and SOULE, H.D. (1973).:

Estrogens receptor in a human cell line (MCF-7) from breast carcinoma.
J. Biol. Chem., 248: 6521-6523.

43. BRUCE, W.R.; MEEKER, B.E. and VALERIOTE, 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.

44. BULBROOK, R.D.; GRENWOOD, F.C. and HAYWARD, J.L. (1960).:

Selection of breast cancer patients for adrenalectomy or hipophysectomy by determination of urinary 17 - Hidroxi - corticosteroids and ethiochclanolone.
Lancet., 1: 1154-1161.

45. BULLER, R.E.; SCHARADER, W. and O'MALLEY, B.W.(1975).:

Progesterone binding components of chick oviduct.
IX The Kinetic of nuclear binding.
J. Biol. Chem., 250: 809-818.

46. BURN, P.; ROTMAN, A.; MEYER, R.K. et al. (1985).:

Diacylglycerol in large α - actinin / actin complexes and in the cytoskeleton of activated platelets.
Nature (Lond.), 314: 469-472.

47. BURTON, K. (1956).:

A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid.
Biochem. J., 62: 315-323.

48. BUTLER, W.B.; KELSEY, W.H. and GORAN, N. (1981).:

Effects of serum and insulin on the sensitivity of the human breast cancer cell line MCF-7 to estrogen and antiestrogens.
Cancer Res., 41: 82-88.

49. CALABRESI, P. and PAKS, R.E. (1986).:

Agentes citostáticos y drogas usadas para la inmunosupresión. En: Las bases farmacológicas de la terapéutica. Gilman, A.G.; Goodman, L.G.; Rall, T.W.; Murad, F. eds. Panamerican Ed. Madrid, pp. 1187-1240.

50. CAPONY, F.; GARCIA, M.; VEITH, F. et al. (1982).:

Antibodies to the estrogen induced 52k protein released by human breast cancer cells.
Biochem Bioph. Reseach Comunication, 108 : 8-15.

51. CARPERTER, G. and COHEN, S. (1975).:

Human epidermal growth factor and the proliferation of human fibroblasts.
J. Cell. Physiol., 88: 227-238.

52. CARPENTER, G.; LEMBACH, K.J., MORRISON, M.M. et al. (1975).:

Characterization of the binding of ^{125}I-labeled epidermal growth factor to human fibroblasts.
J. Biol. Chem., 259: 4297-4304.

53. CATO, A.C.B.; GEISSE, S.; WENZ, M. et al. (1984).:

The nucleotide sequences recognized by the glucocorticoid receptor in the rabbit uteroglobin gene region are located for upstream from the initiation of transcription.
EMBO J., 3: 2771-2778.

54. CHALBOS, D.; VIGNON, F. KEYDAR, I. et al. (1982).:

Estrogens stimulate cell proliferation and induce secretory proteins in a human breast cancer cell line (T47D).
J. Clin. Endocrinol. Metab., 55: 276-287.

55. CHAMBON, P.; BENOIST, C.; BREATHNACH, R. et al. (1979).:

Structural organization and expression of ovalbumin and related chicken genes. In from gene to protein: Information transfer in normal and abnormal cells. (ed. by T.R. Russell et al.) Academic Pres, pp. 55-83.

56. CHAN, L.; MEANS, A.S.; O'MALLEY, B.W. et al. (1973).:

Rates of induction of specific translatable messenger RNA's for ovalbumin and avidin by steroid hormones. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 70: 1870-1874.

57. CHAUDHURI, N.K.; MONTAG, B.J. and HEIDELBERGER, C. (1958).:

Studies on fluorinated pyrimidines III. The metabolism of 5-fluorouracil-2-C^{14} and 5 fluoroorotic acid 2-C^{14} in vivo. Cancer Res., 18: 318-320.

58. CHEN, T.L. and FELDMAN, D. (1981).:

Regulation of 1,25-dihydroxy-vitamin-D receptor in cultured mouse bone cells: correlation of receptor concentration with the rate of cell division. J. Biol. Chem., 256: 5561-5566.

59. CHILDS, C.B.; PROPER, J.A.; TUCKER, R.F. et al. (1982).:

Serum contains a platelet-derived transforming growth factor.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 79: 5312-5316.

60. CHINKERS, M.J.; McKANNA, J.A. and COHEN, S. (1979).:

Rapid induction of morphological changes in human carcinoma cell line A - 431 by epidermal growth factor.
J. Cell. Biol., 83: 260-265.

61. CHU, T.M.; HOLYOKE, E.D.; MERRIN, C. et al. (1975).:

Urinary TPA in cancer patiens.
Folksam Symposium on TPA, Folksan, Stolckholm.

62. CHURCH, R.B. and McCARTHY, B.J. (1970).:

Unestable nuclear synthesis following estrogen stimulation.
Biochim. Biophys. Acta, 199: 103-114.

63. CIOCCA, D.; ADAMS, D.; EDWARDS, D. et al. (1983).:

Distribution of a estrogen-induced protein with a molecular weight of 24,000 in normal and malignant human tissues and cells.
Cancer Res., 43: 1204-1210.

64. CLARK, J.H.; HARDIN, J.W.; UPCHURCH, S et al. (1978).:

Heterogeneity of estrogen binding sites in the cytosol of the rat uterus.
J. Biol. Chem., 253: 7630-7634.

65 CLARKE, F. and MASTERS, C. (1975).:

On the association of glycolytic enzymes with structural proteins of skeletal muscle.
Biochim. Biophys. Acta, 381: 37-46.

66. COCHRAN, B.H.; REFFEL, A.C. and STILES, C.D. (1983).:

Molecular cloning of gene sequences regulated by platelet - derived growth factor.
Cell, 33: 939-947.

67. COHEN, M.E. and HAMILTON, T.H. (1975).:

Effect of estradiol - 17B on the synthesis of specific uterine non histone chromosomal proteins.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 72: 4346-4350.

68. COHEN, S. (1962).:

Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new - born animal.
J. Biol. Chem., 237: 1555-1562.

69. COHEN, S.; USHIRO, H.; STOSCHECK, C. et al. (1982).:

A native 170.000 epidermal growth factor receptor - Kinase complex from shed membrane vesicles.
J. Biol. Chem., 257: 1523-1531.

70. COMPTON, J.G.; SCHRADER, W.T. and O'MALLEY, B.W. (1983).:

DNA sequence preferences of the progesterone receptor.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 80: 16-20.

71. COOPER, J.A. and HUNTER, T. (1981).:

Changes in protein phosphorylation in Rous sarcoma virus - transformed chicken embryo cells.
Mol. Cell. Biol., 1: 165-170.

72. COOPER, J.A.; REISS, N.A.; SCHWARTZ, R.J. et al. (1983).:

Three glycolytic enzymes are phosphorylated at tyrosine in cells transformed by Rous sarcoma virus.
Nature (lond.), 302: 218-223.

73. COX, R.F.; HAINES, M.E. and CAREY, N.H. (1973).:

Modification of the template capacity of chick oviduct chromatin form-B RNA polymerase by estradiol.
Eur. J. Biochem., 32: 513-524.

74. DAILEY, G.E.; KRAUSE, J.W. and ORTH, D.N (1978).:

Homologous radioimmunoassay for human epidermal growth factors (urogastrone).
J. Clin. Endocrinol. Metab., 48: 929-936.

75. DANIEL, C.P.; GASKELL, S.J.; BISHOP, H. et al. (1981).:

Determination of tamoxifen and biologically active metabolites in human breast tumours and plasma.
Eur. J. Cancer, 17: 1183-1189.

76. DARBRE, P.; YATES, J.; CURTIS, S. et al. (1983).:

Effect of estradiol on human breast cancer cells in culture.
Cancer Res., 43: 349-354.

77. DAVID, J.F.; MARQUES, B. and ROUCOLLE, J. (1980).:

Cellules endometriales humaines normales in culture: absence d'action directe des oestrogénes sur la multiplication cellulaire.
Bull. Ass. Anat. (Nancy), 64: 367.

78. De ANGELO, A.B. and GORSKI, J. (1970).:

Role of RNA synthesis in the estrogen induction of a specific uterine protein.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 66: 693-700.

79. DeLARCO, J.E. and TODARO, G.J. (1978).:

Growth factors from murine sarcoma virus-transformed cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 75: 4001-4005.

80. DeLARCO, J.E. and TODARO, G.J. (1980)..

Sarcoma growth factor (SGF): specific binding to epidermal growth factor (EGF) membrane receptors.
J. Cell. Physiol., 102: 267-277.

81. DERYNCK, R.; JARRET, J.A.; CHEN, E.Y. et al. (1985).:

Human transforming growth factor - β cDNA sequence and expression in tumor cell lines.
Nature (Lond.), 316: 701-705.

82. DeSOMBRE, E.; GREENE, G.L.; KING, W.J. et al. (1984).:

Estrogen receptors, antibodies and hormone dependent cancer
En "Hormones and Cancer". GURPIDE - CALANDRA - LEVY - SOTO eds. Liss New York, vol. 142, pp. 1-24.

83. DeSOMBRE, E. and LYTTLE, C. (1980).:

Specific uterine protein synthesis as a guide to understanding the biological significance of the estrogen-receptor interaction. In Perspectives in Steroid Research (Edited by F. Bresciani). Raven Press New York, pp. 167-182.

84. DE VITA, V.T. (1982).:

Principles of chemoterapy. En: Cancer. Principles and Practice of Oncology. De Vita, V.T.; Hellman, S. and Rosenberg, F. eds. Lippincott Company Ed. Philadelphia, pp. 132-135.

85. DEVLEESCHOUWER, N. (1983).:

Evaluation de l'activité antitumorale de molecules se liant au recepteur d'oestrogene dans les tumeurs mammaries. These du Grade de Docteur. Université libre de Bruxelles. Bruxelles.

86. DEVLEESCHOUWER, N.; LECLERCQ, G. and HEUSON, J.C. (1984).:

Influence of seric factors on the growth stimulating efect of estradiol- 17β in the MCF-7 breast cancer cell line. (Laboratoire de Cancérologie Mammaire-Institut Julet Bordet-1000 Brussels-Belgium).

87. DEVLEESCHOUWER, N.; OLEA, N. and LECLERCQ , G. (1984).:

Influence of serum nature on the estrogen sensitivity of the MCF-7 breast cancer cell line. Proceding of International Congress of Endocrinology of the breast. Torino Italy.

88. DOUGLAS, W.H.J. and DELL-ORCO, R.T. (1979).:

Physical aspects of a tissue culture laboratory. En: Cell Culture. Methods in Enzymology vol. LVIII. Jakoly, W.B. and Pastan, I.H. eds. Academic Press Ed. New York, pp. 3-17.

89. DOWNWARD, J.; YARDEN, J.; MAYES, E. et al. (1984).:

Close similarity of epidermal growth factor receptor and U-erb-B oncogenic protein secuences.
Nature, 307: 521-527.

90. EAGLE, H.; FOLEY, G.E., KOPROWSKI, H. et al. (1970).:

Growth characteristics of a virus-transformed cells
J. Exp. Med., 131: 863-879.

91. ECKERT, B.; KOONS, S.; SCHANTZ, A. et al. (1980).:

Association of creatin phosphokinase with the cytoskeleton of cultured mammalian cells.
J. Cell Biol., 86: 1-5.

92. ECKERT, R.; MULLICK, A.; RORKE, E. et al. (1984).:

Estrogen receptor synthesis and turnover in MCF-7 breast cancer cells measured by a density shift technique.
Endocrinology, 114: 629-637.

93. EDWARDS, D.; ADAMS, S. and McGUIRE, W. (1981).:

Specific protein synthesis regulated by estrogen in human breast cancer.
J. Steroid Biochem., 15: 247-259.

94. EDWARDS, D.; ADAMS, D.; SAVAGE, N. et al. (1980).:

Estrogen induced synthesis of specific proteins in human breast cancer cells.
Biochem. Biophys. Res. Commun, 93: 304.

95. EDWARDS, D.; MURPHY, S. and McGUIRE, W. (1980).:

Effects of estrogen and antiestrogen on DNA polymerase in human breast cancer.
Cancer Res., 40: 1722-1726.

96. ELDER, P.K.; SCHMIDT, L.J.; ONO, T. et al. (1984).:

Specific stimulation of actin gene trascription by epidermal growth factor and cycloheximide.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81: 7476-7480.

97. ENGEL, L.W. and YOUNG, N.A. (1978).:

Human breast carcinoma cells in continuous culture: a review.
Cancer Res., 38: 4327-4339.

98. ENGEL, L.W.; YOUNG, N.A.; TRALKA, T.S. et al. (1978).:

Human Breast carcinoma cells in continuous culture. Establishement and characteristics of three new lines. Cancer Res., 38: 3352-3359.

99. ERICKSON, E. and ERIKSON R.L. (1980).:

Identification of a cellular protein substrate phosphorylated by the avian sarcoma virus - transforming gene product.
Cell., 21: 829-836.

100. ERIKSON, J.; Ar-RUSHDI, A.; DRWINGA, H.L. et al. (1983).:

Transcriptional activation of the translocated c-myc oncogene in Burkitt lymphoma.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 80: 820-824.

101. EVERSON, T.C. and COLE, V.H. (1966):.

Spontaneus Regresion of cancer.
Ed. Saunders. Philadelphia.

102. EXPOSITO, J.; OLEA, N.; RUIZ DE ALMODOVAR, J.M. et al. (1984).:

Estudio de las formas moleculares del receptor de estrógeno. Aplicaciones clínicas.
Rev. Esp. Med. Nuclear, 3: 233-246.

103. FAVA, R.A. and COHEN, S. (1984).:

Isolation of a calcium - dependent 35 - Kilodalton substrate for the epidermal growth factor receptor / Kinase from A-431 cells.
J. Biol. Chem., 259: 2636-2645.

104. FISHER, P.B.; BOERSIG, M.R.; GRAHAM, G.M. et al. (1983).:

Production of growth factors by type 5 adenovirus transformed rat embryo cells.
J. Cell. Physiol., 114: 365-370.

105. FITZPATRICK, S.; LaCHANCE, M. and SCHULTZ, G. (1984).:

Characterization of epidermal growth factor receptor and action on human breast cancer cell in culture.
Cancer Res., 44: 3442-3447.

106. FREIFELD, M.L.; FEIL, P.D. and BARDIN, C.W. (1974).:

The in vivo regulation of the progesterone "receptor" in Guinea pig uterus: Dependence on estrogen and progesterone.
Steroids, 23: 93-103.

107. FRESHNEY, R.I. (1983).:

Introduction. En: Culture of animal cells: A manual of basic technique. Liss, A.R. Ed. New York, pp. 2.

108. FRESHNEY, R.I. (1983).:

The culture environment: II Media and supplements. En: Culture of animal cells: A manual of basic technique. Liss, A.R. Ed. New York, pp. 67-77.

109. FRESHNEY, R.I. (1983).:

In vitro transforming and its relationships to malignancy in vivo. In "culture of animal cells", Alan R. liss Inc. New York, pp. 173-180.

110. FRESHNEY, R.I.; SHERRY, A.; HASSANZADAH, M et al. (1980).:

Control of cell proliferation in human glioma by glucorticoids. Br. J. Cancer, 41: 857-866.

111. FROMSON, J.M.; PEARSON, S. and BRAMAH, S. (1973).:

The metabolism of tamoxifen. (I.C.I. 46.474). Pat. I: in laboratory animals.
Xenobiótica, 3: 639-709.

112. FROMSON, J.M.; PEARSON, S. and BRAMAH, S. (1973).:

The metabolism of tamoxifen. (I.C.I. 46.474). Pat. II: in female patients.
Xenobiótica, 3: 711-714.

113. GALAN, P.; FLANDROY, L. and MAIRESSE, N. (1978).:

Relationship between the estrogen-induced protein IP and other parameters of estrogenic-stimulation. A hypothesis.
Life Sci., 22: 217-238.

114. GELEHRTER, T.D. (1973).:

Mechanisms of hormonal induction of enzymes.
Metabolism, 22: 85-100.

115. GLASSER, S.R.; CHYTIL, F. and SPELSBERG, T.C. (1972).:

Early effects of oestradiol-17β on the cromatin and activity of the deoxyribonucleic acid-dependent ribonucleic acid polymerases (I and II) of the rat uterus.
Biochem. J., 130: 947-957.

116. GOLANDER, Y. and STERNSON, L.A. (1980).:

Paired-ion chromatographic analysis of tamoxifen and two major metabolites in plasma.
J. Chromatogr., 181: 41-49.

117. GOLD, P. and FREEDMAN, S.O. (1965).:

Demostration of tumor-specific antigens in human colon carcinoma by immunological tolerance and absorption technique.
J. Exp. Med., 122: 467-481.

118. GOLMAN, R.D. and FOLLET, E.A.C. (1969).:

The structure of the major cell processes of isolated BHK-21 fibroblasts.
Exp. Cell. Res., 57: 263-276.

119. GOLMAN, R.D. and FOLLET, E.A.C. (1970).:

Birefringent filamentous organelle in BHK-21 cells and its possible role in cell spreading and motility.
Science (Wash. D.C.), 169: 286-288.

120. GORGOJO, L. (1986).:

Ensayos de quimiosensibilidad en lineas celulares experimentales de cáncer de mama, principios, métodos, resultados y posibles aplicaciones clinicas.
Tesis Doctoral. Facultad de Medicina. Universidad de Granada.

121. GORSKI, J. (1964).:

Early estrogen effects on the activity of uterine ribonucleic acid polymerasa.
J. Biol. Chem., 239: 889-892.

122. GORSKI, J.; TOFT, D.; SHYAMALA, G. et al. (1968).:

Hormone receptors. Studies on the interaction of estrogen with the uterus.
Recent Prog. Horm. Res., 24: 45-80.

123. GOUSTIN, A.S.; BETSHOLTZ, C.; PFEIFER-OHLSSON, S et al. (1985).:

Coexpression of the sis and myc proto - oncogenes in developing human placenta suggests autocrine control of trophoblast growth.
Cell., 41: 301-312.

124. GOUSTIN, A.S.; LEOF, E.B.; SHIPLEY, G.D. et al. (1986).:

Growth factors and cancer.
Cancer Res., 46: 1015-1029.

125. GREEN, M.; WHYBOURNE, A. and TAYLOR, I. (1981).:

Effects of antioestrogens on the growth and cell cycle kinetics of cultured human mammary carcinoma cells. In: SUTHERLAND, R. and JORDAN, V. Eds. Non-steroidal Antioestrogens. Sydney, Academic, Press, 319-412.

126. GREENBERG, M.E. and EDELMAN, G.M. (1983).:

Comparison of the 34.000-dalton pp60src substrate and a 38.000-dalton phosphoprotein indetified by monoclonal antibodies.
J. Biol. Chem., 258: 8497-8502.

127. GREENBERG, M.E. and ZIFF, E.B. (1984).:

Stimulation of 3T3 cells induces transcription of the c-fos proto-oncogene.
Nature (Lond.), 311: 433-438.

128. GREENE, G.L. and PRESS, M.F. (1986).:

Steroid receptor structure (including monoclonal antibodies and new methods of determination). Structure and dynamics of the estrogen receptor.
J. Steroid. Biochem., 24: 1-7.

129. GREENSTEIN, J.P. (1954).:

Biochemistry of cancer 2nd ed.
Academic Press. New York.

130. HALL, P. (1984).:

The role of the cytoskeleton in hormone actin.
Can. J. Biochem. Cell. Biol., 6a: 653-665.

131. HALPER, J. and MOSES, H.L. (1983).:

Ephitelial tisue-derived growth factor-like polipeptides.
Cancer Res., 43: 1972-1979.

132. HAM, R.G. and McKEEHAN, W.L. (1979).:

Media and growth requirements. En: Cell Culture. Methods in Enzymology LVIII. Jakoly, W.B. and Pastan, I.H. eds. Academic Press. Ed. New York, pp. 44-93.

133. HAMBURGER, A.N. and SALMON, S.E. (1977).:

Primary bioassay of human tumor stem cell.
Science, 197: 461-463.

134. HANDLEY,.W.S. (1909).:

The Natural cure of cancer.
Br. Med. J., 1: 582.

135. HARRIS, G.S. (1971).:

Nature of oestrogen specific binding sites in the nuclei of mouse uteri.
Nature (New Biol), 231: 246-248.

136. HEBERMAN, R.B., McINTIRE, K.R. (1969):

Inmunodiagnosis of cancer.
Marcel Dekker ed. New York.

137. HEIDELBERGER, C. (1982).:

Pyrimidine and pyrimidine nucleoside antimetabolites. En:
Cancer Medicine Holland. J.F. and Frei, E. eds. Lea and Febiger
Ed. Philadelphia, pp. 801-824.

138. HELLMAN, S. and DE VITA, V. (1982):

Principles of Cancer Biology Kinetics of cellular proliferation. En: Cancer Principles and Practica of Oncology.
De Vita, V.; Hellman, S.; and Rosenberg, H. eds. Lippincott
Company Ed. Philadelphia, pp. 73-79.

139. HOLLENBERG, M.D. and CUATRECASAS, P. (1973).:

Epidermal growth factor: receptor in human fibroblasts
and modulation of action by cholera toxin.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 70: 2964-2968.

140. HORWITZ, K.B.; COSTLOW, M. and McGUIRE, W.L. (1975).:

A human breast cancer cell line with estrogen, androgen,
progesterone, and glucocorticoid receptors.
Steroids, 26: 785-795.

141. HORWITZ, K.B. and McGUIRE, W.L. (1975).:

Specific progesterone "receptor" in human breast cancer.
Steroids, 25: 497-505.

142. HORWITZ, K.B. and McGUIRE, W.L. (1977).:

Estrogen control of progesterone receptor in human breast cancer.
J. Biol. Chem., 253: 2223-2228.

143. HORWITZ, K.B. and McGUIRE, W.L. (1978).:

Estrogen control of progesterone receptor in human breast cancer.
J. Biol. Chem., 253: 2223-2228.

144. HORWITZ, K.B. and McGUIRE, W.L. (1978).:

Nuclear mechanisms of estrogen action: effects of estradiol and antiestrogens on estrogens receptors and nuclear receptor processing.
J. Biol. Chem., 253: 8185-8191..

145. HORWITZ, K.B.; McGUIRE, W.L.; PEARSON, O.H. et al. (1975).:

Predicting response to endocrine therapy in human breast cancer: A hypotesis.
Science, 189: 726-729.

146. HORWITZ, K.B.; ZAVA, D.T.; THILAGAR, A.K. et al. (1978).:

Steroid receptor analyses of nine human breast cancer cell lines.
Cancer Res., 38: 2434-2437.

147. HOWARD, A. and PELC, S.C. (1951).:

Nuclear incorporacion of ^{32}P as demostrasted by autoradiographs.
Exp. Cell Res., 2: 178-187.

148. IMAI. Y.; LEUNG, C.; FRIESEN, H. et al. (1982).:

Epidermal growth factor receptor and effect of epidermal growth factor on growth of human breast cancer cell in long - term tissue culture.
Cancer Res., 42: 4394-4398.

149. ISACSON, S. and ANDREN-SANDBERG, A. (1977).:

Tissue Polypeptide Antigen (TPA) and citology in cancer of urinary bladder En: Clinical Application of Carcinoembryonic Antigen Assay, Krebs BP, Lalanne CM Scheneider Y. (eds).
Excepta Medica, Amsterdan-Oxford, pp. 374-377.

150. JAKESZ, R.; SMITH, C.A.; AITKEN, S. et al. (1984).:

Influence of cell proliferation and cell cycle phase on expression of estrogen receptor MCF-7 breast cancer cells.
Cancer Res., 44: 619-625.

151. JENSEN, E.V.; BLOCK, G.E.; SMITH, S. et al. (1971).:

Estrogen receptors and breast cancer response to adrenalectomy.
Natl. Cancer Inst. Monogr., 34: 55-70.

152. JENSEN, E.V. and DeSOMBRE, E.R. (1972).:

Mechanism of action of the female sex hormone.
Annu. Rev. Biochem., 41: 203-230.

153. JENSEN, E.V.; SUZUKI, T.; KAWASHIMA, T. et al. (1968).:

A two-step mechanism for the interaction of estradiol with rat uterus.
Biochem., 59: 632-638.

154. JOHSON, I.S. (1982).:

Plant alkaloids. En: Cancer Medicine. Holland, J.F. and Frei, E. eds. Lea and Febiger Ed. Philadelphia, pp. 910-920.

155. JOST, J.P.; GEISER, M. and SELDRAN, M. (1985).:

Specific modulation of the transcription of cloned avian vitellogenin II gene by estradiol receptor complex in vitro.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82: 988-991.

156. JOZAN, S.; GAY, G.; MARQUES, B. et al. (1985).:

Oestradiol is effective in stimulating ^{3}H-thymidine incorporation but not on proliferation of breast cancer cultured cells.
Cell Tissue Kinet, 18: 457-464.

157. JOZAN, S.; MOURE, C.; GILLOIS, M. et al. (1979).:

Effects of estrone on cell proliferation of human breast cancer (MCF-7) in long term tissue culture.
J. Steroid Biochem., 10: 341-342.

158. KAPLAN, P.L.; ANDERSON, M. and OZANNE, B. (1982).:

Simian virus SV40 induces the production of polypeptide transforming growth factors.
Virology, 108: 484-490.

159. KAPLAN, P.L. and OZANNE, B. (1982).:

Polyoma virus transformed cells produce transforming growth factor (s) and grow in serum free medium.
Virology, 123: 372-380.

160. KAPLAN, P.L.; TOPP, W.C. and OZANNE, B. (1981).:

Transforming growth factor(s) production enables cells to grow in the absence of serum: an autocrine system.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 79: 485-489.

161. KATZENELLENBOGEN, B.S. (1980).:

Dynamics of steroid hormone receptor action.
Ann. Rev. Physiol., 42: 17-24.

162. KATZENELLENBOGEN, B.S. and GORSKI, J. (1972).:

Estrogen action in vitro; induction of the synthesis of a specific uterine protein.
J. Biol. Chem., 247: 1299-1305.

163. KATZENELLENBOGEN, B.S.; NORMAN, M.; ECKERT, R. et al. (1983).:

Bioactivities, estrogen receptor interactions, and plasminogen activator-inducing activities of tamoxifen and hydroxy - tamoxifen isomers in MCF-7 human breast cancer cells.
Cancer Res., 44: 112-119.

164. KELLY, K.; COCHRAN, B.H.; STILES, C.D. et al. (1983).:

Cell-specific regulation of the c-myc gene by lymphocyte mitogens and platelet-derived growth factor.
Cell., 35: 603-610.

165. KING, R.B.J.; SOMJEN, D.; KAYE, A.M. et al. (1974).:

Stimulation by oestradiol 17-ß of specific cytoplasmic and chromosomal protein synthesis in immature rat uterus.
Mol. Cell. Endocrinol., 1: 21-36.

166. KING, W. and GREENE, G.L. (1984).:

Monoclonal antibodies localize estrogen receptor in the nuclei of target-cells.
Nature, 307: 745-747.

167. KJELLGREN, K. (1979).:

The prognostic significance of consecutive determinations of serum tissue polypeptide antigen (TPA) in human breast cancer.
En: carcinoembryonic Proteins, vol. II F.G. Lehmanned Biomedical. Press North-Holland, pp. 607-610

168. KNOWLER, J.T. and SMELLIE, R.M.E. (1971).:

The synthesis of ribonucleic acid in inmature rat uterus responding to oestradiol-17β.
Biochem. J., 125: 605-614.

169. KNOWLER, J.T. and SMELLIE, R.M.E. (1973).:

The oestrogen-stimulated syntesis of heterogeneous nuclear ribonncleic acid in the uterus of immature rats.
Biochem. J., 131: 689-697.

170. KOPELOVIC, L.; CONLON, S. and POLLACK, R. (1977):

Defective organization of actin in cultured skin fibroblasts from patients with inherited adenocarcinoma.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 74: 3019-3022.

171. KUMAR, S.; COSTELLO, C.B.; GLASMAN, R.W. et al. (1981).:

The clinical significance of Tissue Polypeptide Antigen (TPA) in the urine of bladder cancer patients.
British Journal of Urology, 53: 578-581.

172. KURPEY, J.; GOLD, P. and FREEDMAN, S.O. (1967).:

Purification and caracterization of carcinoembryonic antigens of the human digestive system.
Nature, 215: 67-68.

173. LARSON, S.M. (1986).:

Los anticuerpos monoclonales y las técnicas de imagen en el cáncer. En: De Vita, V.T. Hellman, S. Rosenberg S.A. eds. Avances en Oncologia 1986. ESPAX, Barcelona, pp. 275-293.

174. LASSING, I. and LINDBERG, U. (1985).:

Specific interaction between phosphatidylinositol 4,5 - bisphosphate and profilactin.
Nature (Lond.), 314: 472-474.

175. LEOF, E.B.; PROPER, J.A.; GETZ, M J. et al. (1986).:

Transforming growth factor type-β regulation of actin mRNA.
J. Cell. Physiol., in press., pp. 19-24.

176. LEUNG, B.; QURESHI, S. and LEUNG, J. (1982).:

Response to estrogen by the human mammary carcinoma cell line CAMA-1.
Cancer Res., 42: 5060-5066.

177. LING, T. and LIAO, S. (1.974).:

Association of the uterine 17βestradiol-receptor complex with ribonucleoprotein in vitro and in vivo.
J. Biol. Chem., 249: 4671-4678.

178. LIPPMAN, M.; BOLAN, G. and HUFF, K.. (1976).:

The effects of estrogens and antiestrogens on hormone - responsive human breast cancer in long-term tissue culture.
Cancer Res., 36: 4595-4601.

179. LIPPMAN, M.; BOLAN, G. and HUFF, K.. (1976).:

The effects of glucocorticoids and progesterone on hormone - responsive human breast cancer in long-term tissue culture.
Cancer Res., 36: 4602-4609.

180. LIPPMAN, M.; BOLAN, G. and HUFF, K. (1976).:

The effects of androgen and antiestrogens on hormone-responsive human breast cancer in long-term tissue culture.
Cancer Res., 36: 4610-4618.

181. LIPPMAN, M.; DICKSON, R.; BATES, S. et al. (1986).:

Autocrine and paracrine growth regulation of human breast cancer.
Breast Cancer Reseach and Treatment. 7: 59-70.

182. LIPPMAN, M.; DICKSON, R.; KASID, A. et al. (1986).:

Autocrine and paracrine growth regulation of human breast cancer.
J. Steroid Biochem., 24: 147-154.

183. LIPPMAN, M.; MONACO, M. and BOLAN, G. (1977).:

Effects of estrone, estradiol, and estriol on hormone-responsive human breast cancer in long-term tissue culture. Cancer Res., 37: 1901-1905.

184. LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L. et al. (1951).:

Protein measurement with the folin-phenol reagen. J. Biol. Chem., 193: 265-275.

185. LUCK, D.N. and HAMILTON, T.H. (1972).:

Early estrogen action: stimulation of the metabolism of high molecular weigth and ribosomal RNAs. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 69: 157-161.

186. LUNDSTRON, R.; BJORKLUND, B. and EKLUND, G. (1973).:

A Tissue-Derived Polypeptide Antigen: Its Relation to Cancer and Its Temporary Ocurrence in Certain Infections Disease. En: Immunological Techniques for detection of cancer. Bjorklund B. (ed.) Bonniers, Stockholm, pp. 243-247.

187. LUNING, B.; WIKLUND, B.; REDELIUS, P. et al. (1980).:

Biochemical properties of tissue polypeptide antigen. Biochem. Biophys. Acta., 624 : 90-101.

188. LÜTHGENS, M. and SCHLEGEL, G. (1980).:

CEA + TPA in clinical tumor diagnostics with special reference to breast cancer.
Tumor Diagnostik, 1: 63-77.

189. LÜTHGNES, M. and SCHLEGEL , G. (1981).:

Verlanfs Kontrolle mit Tissue Polypeptide Antigen und Carcinoembryonalen, Antigen in der Radioonkologischen Nachsorge und Therapie.
Tumor Diagnostik, 4(5): 179-188.

190. LÜTHGENS, M. and SCHLEGEL, G. (1982).:

Tissue Polypeptide Antigen und Carcinoembryonales Antigen in der Verlangs-Kontrolle van Tumor-patienten Zytostatische Chemoterapie.
Tumor Diagnostik, 3: 120-126.

191. LÜTHGENS, M. and VON JÜRGENSON, H. (1979).:

TPA-RIA in clinical cancer diagnostic. In protides of the Biological Fluids, Peeters H.(ed), Pergamon Press, Oxford, pp. 263-266.

192. LYKESFELDT, A.; LARSEN, J.; CHRISTENSEN, I. et al. (1984).:

Effects of the antioestrogen tamoxifen on the cell cycle kinetics of the human breast cancer cell line, MCF-7.
Br. J. Cancer, 49: 717-722.

193. LYTTLE, C.R. and DeSOMBRE, E.R. (1977).:

Generality of oestrogen stimulation of peroxidase activity in growth responsive tissues.
Nature, 268: 337-339.

194. MAIRESSE, N.; DEVLEESCHOUWER, N.; LECLERCQ, G. et al. (1981).:

Estrogen-induced synthesis and secretion of proteins in the human breast cancer cell line MCF-7.
J. Steroid. Biochem., 15: 375-381.

195. MAIRESSE, N. and GALAND, P. (1982).:

Estrogen-induced proteins in luminal ephitelium, endometrial stroma and mymetrium of the rat uterus.
Mol. Cell Endocr., 28: 671-679.

196. MAIRESSE, N. and GALAND, P. (1986).:

Estrogen-induced protein in the rat uterus: Association with actin.
J. Steroid. Biochem., 24: 287-288.

197. MAIRESSE, N.; HEUSON, J.C.; GALAND, P. et al. (1977).:

Oestrogen-induced protein in rat mammary tumour and uterus.
J. Endocr., 75: 331-332.

198. MARQUARDT, H.; HUNKAPILLER, M.W.; HOOD, L.E. et al. (1984).:

Rat transforming growth factor type 1: structure and relation to epidermal growth factor.
Science (Wash. D C), 223: 1079-1082.

199. McGUIRE, W.L. (1980).:

Steroid hormone receptors in breast cancer: treatment strategy.
Recent Prog. Hormone Res., 36: 135-156.

200. McGUIRE, W.L.; CARBONE, P.P. and VOLLMER, E.P.. (1975).:

Estrogen receptors in human breast cancer, pp. 1-284.
Raven Press, New York.

201. McKNIGHT, S. and PALMITER, R. (1979).:

Transcriptional regulation of the ovalbumin and conalbumin genes by steroid hormones in the chick oviduct.
J. Biol. Chem., 254: 9050-9058.

202. MEANS, A.R. and HAMILTON, T.H. (1966).:

Early estrogen action: concomitant stimulations within two minutes of nuclear RNA synthesis and uptake of RNA precursor by the uterus.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 56: 1594-1598.

203. MELLSTRöM, K.; HöGLUND, A.S.; NISTER, M. et al. (1983).:

The effect of platelet-derived growth factor on morphology and motility of human glial cells.
J. Muscle Res. Cell. Motil, 4: 589-609.

204. MENDELSHOHN, M.L. (1962).:

Autoradiographic analysis of cell proliferation in spontaneous breast cancer of C3H mouse III. The growth fraction.
J. Natl. Cancer. Inst., 28: 1015-1019.

205. MENENDEZ-BOTET, C.J.; BETTGEN, H.F.; PINSKY, C.M. et al. (1978).:

A preliminary evaluation of Tissue Polypeptide Antigen in serum or urine (or both) of patients with cancer or bening neoplasm.
Clin. Chem., 24: 868-872.

206. MILLER, M.A. and 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: 3094.

207. MOSES, H.L.; TUCKER, R.F.; LEOF, E.B. et al. (1985).:

Type β transforming growth factor is a growth stimulator and a growth inhibitor. In: J. Feramisco, B. Ozanne and C. Stiles (eds.), Growth Factor and Transformation. Cancer Cells 3 pp. 65-71. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Press.

208. MOURIDSEN, H.; PALSHOF, T.; PATTERSON, J. et al. (1978).:

Tamoxifen in advanced breast cancer.
Cancer Treat. Rev., 5: 131-141.

209. MROSS, K.; MROSS, B.; WOLFRUM, D.I. et al. (1983).:

Determinations of TPA levels in breast cancer and control
Klin Wochenschr, 61: 461-468.

210. MULLER, R.; BRAVO, R.; BURCKHARDT, J. et al. (1984).:

Induction of c-fos gene and protein by growth factors precedes activation of c-myc.
Nature (Lond.), 312: 716-720.

211. MUSLINER, T.A. and CHADER, G.J. (1971).:

Estradiol-receptor complex in a cell-free system.
Biochem. Bioplys. Rev. Commun, 45: 998-1003.

212. NATOLI, C.; SICA, G.; NATOLI, V. et al. (1983).:

Two new estrogen - supersensitive variants on the MCF-7 human breast cancer cell line.
Breast Cancer Res. Treat., 3: 23-32.

213. NEMOTO, T.; CONSTANTINE, R. and CHU, T.M. (1979).:

Human tissue polypeptide antigen in breast cancer.
J. Natl. Cancer. Inst., 63: 1347-1350.

214. NICHOLSON, G.L. (1976).:

Transmembrane control of the receptors on normal and tumor cells. I. Cytoplasmic influence over cell surface components.
Biochem. Biophys. Acta, 457: 57-108.

215. NICKELL, K.A.; HALPER, J. and MOSES, H.L. (1983).:

Transforming growth factors in solid human malignant neoplasms.
Cancer Res., 43: 1966-1971.

216. NOGUCHI, S.; KITAMURA, Y.; UCHIDA, N. et al. (1984).:

Growth stimulative effect of estrogen and androgen dependent shionogi carcinoma 115.
Cancer Res., 44: 5644-5649.

217. NORGAARD-PEDERSEN, B. and GAEDE, P. (1975).:

Immunoelectrophoretic quantitation of maternal serum human placental lactogen hormone and alpha-fetoprotein in same electrophoretic rum.
Scand. J. Immunol., 4 : 19-24.

218. NOTIDES, A. and GORSKI, J. (1966).:

Estrogen-induced synthesis of a specific uterine protein.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 56: 230-235.

219. OKA, J. and ORTH, D.N. (1983).:

Human plasma epidermal growth factor/s urogastrone is associated with blood platelets.
J. Clin. Invest., 72: 249-259.

220. OLASHAW, N.E. and PLEDGER, W.J. (1983).:

Association of platelet-derived growth factor-induced protein with nuclear material.
Nature (Lond.), 306: 272-274.

221. OLEA, N.; VILLALOBOS, M. THOMAS, J. et al. (1987).:

Cinética de proliferación en cultivos celulares MCF-7. II. Sincronización y reclutamiento celular hormonalmente - inducidos.
Rev. Esp. Fisiol., 43: 18-68.

222. OSBORNE, C.; HAMILTON, B. and NOVER, M. (1982).:

Receptor binding and processing of epidermal growth factor by human breast cancer cells.
J. Clin. Endocrinol. Metabol., 55: 86-93.

223. OSBORNE, C.; HAMILTON, B.; TITUS, G. et al. (1980).:

Epidermal growth factor stimulation of human breast cancer cells in culture.
Cancer Res., 40: 2361.

224. OSBORNE, C.; YOCHMOWITZ, M.; KNIGHT, W. et al. (1980).:

The value of estrogen and progesterone receptor in the traetment of breast cancer.
Cancer Res., 46: 2884-2888.

225. PAGE, M.; FIELD, J.; EVERETT, N. et al. (1983).:

Serum regulation of the estrogen responsiveness of the human breast cancer cell line MCF-7.
Cancer Res., 43: 1244-1250.

226. PARDEE, A.B. (1982):

Principles of cancer biology: Cell biology and biochemistry of cancer. En: Cancer. Principles and Practice of Oncology. De Vita, V.T.; Hellman, S. and Rosenberg F. eds. Lippincott Company Ed. Philadelphia, pp. 59-72.

227. PASTAN, I. (1979).:

Cell transformation. In Jakoby W.B., Pastan IH (eds) "Methods in Enzymology vol. LVII, cell culture" New York, Academic Press pp. 368-370.

228. PAYVAR, F.; DeFRANCO, D.; FIRESTONE, G.L. et al. (1983).:

Sequence specific binding of glucocorticoid receptor to MTV DNA at sites within and upstream of the transcribed region
Cell., 35: 381-392.

229. PERDUE, J.F. (1973)..

The distribution, ultrastructure and chemistry of microfilaments in cultured chick embryo fibroblasts.
J. Cell. Biol., 58: 265-283.

230. PITOT, H.C. and YATUIN, M.B. (1973).:

Interrelatioships of mammalian hormones and enzyme levels in vivo.
Physiol. Rev., 53: 228-325.

231. POLLACK, R. and RIFKIN, D. (1975 :

Actin-containing cables within anchorage-dependent rat embryo cells are dissociated by plasmin and trypsin.
Cell, 6: 495-506.

232. POSADA, A.; TORRES, M.; RUIZ DE ALMODOVAR, M. et al. (1983).:

Marcadores tumorales en Oncología. Screening y evolución de pacientes neoplásicos. Ponencia IX Congreso Nacional de Medicina Nuclear. Tenerife, pp. 93-100.

233. PRESCOTT, D.M. (1976).:

Reproduction of eukaryotic cells. Prescott D.M. (Eds) Academic Press, Inc. New York.

234. PRESS, M.F. and GREENE, G.L. (1984).:

An immunocytochemical method for demonstrating estrogen receptor in human uterus using monoclonal antibodies to human estrophilin.
Lab. Invest., 50: 480-486.

235. PRESS, M.F.; NOU EK-GOEBL, N.A. and GREENE, G.L. (1985).:

Inmunoelectron microscopic localization of estrogen receptor with monoclonal estrophilin antibodies.
J. Histochem. Cytochem., 33: 915-924.

236. PUCA, G.A., SICA, V. and NOLA, E. (1974).:

Identification of high affinity nuclear acceptor site for estrogen receptor of calf uterus.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 71: 979-983.

237. RADKE, K. and MARTIN, G.S. (1979).:

Transformation by Rous sarcoma virus: effects of src gene expression on the synthesis and phosphorylation of cellular polypeptides.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 76: 5212-5216.

238. RAO, G.S. (1980).:

Mode of entry of steroid and thyroid hormones into cells.
Mol. Cell. Endocrinol., 21: 97-108.

239. REDDEL, R.; MURPHY, L. and SUTHERLAND, R. (1983).:

Effects of biologically active metabolites of tamoxifen on the proliferation kinetics of MCF-7 human breast cancer cells in vitro.
Cancer Res., 43: 4618-4624.

240. REDELIUS, P.; LUNING, B. and BJÖRKLUND, B. (1980).:

Chemical studies of Tissue Polypeptide Antigen(TPA) II. Partial Amino Acid Secuences of Cyanogen Bromide Fragments of TPA. subunit.
Acta Chem. Scand. B., 34: 265-273.

241. REISS, N. and KAYE, A. (1981).:

Identification of the major component of the estrogen-induced protein of the rat uterus as the BB-isozyme of creatin kinase
J. Biol. Chem., 256: 5741-5749.

242. ROBERTS, A.B.; ANZANO, M.A.; LAMB. L.C. et al. (1981).:

New class of transforming growth factors potentiated by epidermal growth factor: isolation from non-neoplastic tissues.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 78: 5339-5343.

243. ROBERTS, A.B.; ANZANO, M.A.; LAMB, L.C. et al. (1982).:

Isolation from murine sarcoma cells of novel transforming growth factors potentiated by EGF.
Nature (Lond.), 295: 417-419.

244. ROBERTS, A.B.; ANZANO, M.A.; WAKEFIELD, L.M. et al. (1985).:

Type β transforming growth factor: a biffunctional regulator of cellular growth.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82: 119-123.

245. ROHDENBURG; G.L. (1918).:

Fluctuations in the growth energy of Malignan Tumours in man, with especial reference to spontaneus recesion.
J. Cancer Res., 3: 193-225.

246. ROLF,S.; HOWELE, A.; MINAWA, A. et al. (1982).:

The clinical value of immunohistochemically demostrable CEA in breast cancer: a possible method of selecting patients for adjuvant chamoterapy.
Brit. J. Cancer, 46: 757-764.

247. ROSE, C.; THORPE, S.M.; LOBER, J. et al. (1980).:

Therapeutic effect of tamoxifen related to estrogen receptor level. In: Recent results in Cancer Research, (Eds. Henningsen et al.), Berlin: Springer - Verlag, vol. 71, pp. 134.

248. ROSE, S.P.; PRUSS, R.M. and HERSCHMAN, H.R. (1975).:

Iniciation of 3T3 fibroblast cell divisicn by epidermal growth factor.
J. Cell. Physiol., 86: 593-598.

249. RUIBAL, A. (1984).:

Avances en marcadores tumorales. Procedings
X Congreso Nacional de Medicina Nuclear.
Granada, pág. 3-21.

250. RUIZ DE ALMODOVAR, J.M.; GORGOJO, L.; OLEA, N. et al. (1987).:

Ensayos de quimiosensibilidad tumoral sobre cultivos celulares en monocapa.
Pendiente de publicación.

251. SAEZ, S.; MARTIN, P.M. and CHOUVET, C.D. (1978).:

Estradiol and progesterone receptors levels in human breast adenocarcinoma in relation to plasma estrogen and progesterone levels.
Cancer Res., 38: 3468-3473.

252. SALOMON, D.; ZWIEBEL, J.; BANO, M. et al. (1984).:

Presencé of transforming growth factors in human breast cancer cell.
Cancer Res., 44: 4069-4077.

253. SATO, B.; NISHIZAWA, Y.; NOMA, K. et al. (1979).:

Estrogen - independent nuclear binding of receptor protein of rat uterine citosol by removal of low molecular weigth inhibitor.
Endocrinology, 104: 1474-1479.

254. SCHELEGEL, G.; LÜTHGENS, M.; EKLUND, G. et al. (1981).:

Correlation between activity in breast cancer and CEA, TPA and eighteen common laboratory procedures and the improvement by the combined use of CEA and TPA.
Tumor Diagnostik, 1: 6-11.

255. SCHIMKE, P.; McLNIGHT, S.; SHAPIRO, D. et al. (1975).:

Hormonal regulation of ovalbumin synthesis in the chick oviduct.
Recent Prog. Horm. Res., 31: 175-211.

256. SCHOLL, S. and LIPPMAN, M.E. (1984).:

The estrogen receptor in MCF-7 cells: Evidence from dense aminoacide labelling for rapid turnover and dimeric model of activated nuclear receptor.
Endocrinology, 115: 1295-1390.

257. SEFTON, B.M., HUNTER, T.; BALL, E.H. et al. (1981).:

Vinculin: a cytoskeletal target of the transforming protein of Rous sarcome virus.
Cell., 24: 165-174.

258. SHAFIE, S. and BROOKS, S.C. (1977).:

Effect of prolactin on growth and the estrogen receptor level of human breast cancer cells. (MCF-7).
Cancer Res., 37: 792-799.

259. SHERIDAN, P.J ; ANSELMO, V.C.; BUCHANAN, J.M. et al. (1979).:

Equilibrium: the intracelular distribution of steroid receptors.
Nature, 281: 579-582.

260. SHERWIN, S.A.; TWARDZIK, D.R.; BOHN, W.H. et al. (1983).:

High-molecular-weigh transforming growth factor activity in the urine of patients with disseminated cancer.
Cancer Res., 43: 403-407.

261. SHIPLEY, G.D.; CHILDS, C.B.; VOLKENANT, M.E. et al. (1984).:

Differential effects of epidermal growth factor , transforming growth factor, and insulin on DNA and protein synthesis and morphology in serum-free cultures of AKR-2B cells.
Cancer Res., 44: 710-716.

262. SIMON, W.; ALBRECT, M.; TRAMS. G. et al. (1984).:

In vitro growth promotion of human mammary carcinoma cells by steroid hormones, tamoxifen and prolactin. J. Natl. Cancer Inst., 73: 313-321.

263. SINGHAKOWINTA, A.; POTTER, H.G.; BUROKER, T.R. et al. (1976).:

Estrogen receptor and natural course of breast cancer. Ann. Surg., 183: 84-88.

264. SKIPPER, J.; EAKLE, S. and HAMILTON, T. (1981).:

Modulation by estrogen of synthesis of specific uterine proteins. Cell., 22: 69-78.

265. SKIPPER, H. and SCHABEL, F. (1982).:

Cuantitative and cytokinetic studies in experimental tumor systems. En: Cancer Medicine. Holland, J.F. and Frei E. eds. Lea and Febiger Ed. Philadelphia. pp. 636-648.

266. SKRYTEN, H.E. and SCHABEL, F.M. (1973).:

Cuantitative and cytokinetic studies in experimental tumor models. En: Cancer Medicina. Holland - Frei (ed.) Lea and Febiger Ed. Philadelphia.

267. SMITH, E. and BARKER, K. (1977).:

Effects of estradiol and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate on rate of degradation of uterine glucose-6-phosphate dehydrogenase.
J. Biol. Chem., 252: 3709-3714.

268. SOMJEN, D.; KAYE, A.M. and LINDER, H.R. (1974).:

Synthesis of specific estradiol-induced protein by surviving rat uteri and cell-free uterine extracts.
Mol. Cell. Endocrinol., 1: 77-88.

269. SOTO, A.M. and SONNESCHEIN, C. (1985).:

The role of estrogens on the proliferation of human breast tumor cells. (MCF-7).
J. Steroid. Biochem., 23: 87-94.

270. SOULE, H.D.; VAZQUEZ, J.; LONG, A. et al. (1973).:

Human cell line form a pleural effusion derived from a breast carcinoma.
J. Natl. Cancer Inst., 51: 1409-1416.

271. SPEER, J.F.; PETROSKY, V.E.; RETSKY, M. W. et al. (1984).:

A stochastic numerical model of breast cancer growth that simulates clinical data.
Cancer Res., 44: 4124-4130.

272. SPELSBERG, T.C.; LITTLEFIELD, B.A.; SEELKE, R. et al. (1983).:

Role of specific chromosomal proteins and DNA sequences in the nuclear binding sites for steroid receptors.
Recent. Prog. Horm. Res., 39: 463-517.

273. STEGGLES, A.W.; SPELSBERG, T.C.; GLASSER, S.R. et al. (1971).:

Soluble complexes between steroid hormones and target-tissue chromatin.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 68: 1479-1482.

274. STEIN, G.S.; SPELSBERG, T.C. and KLEINSMITH, L.S. (1974).:

Nonhistone chromosomal proteins and gene regulation
Science, 183: 817-824.

275. STEWARD, A.M.; NIXON, D.; ZAMCHECK, N. et al. (1974).:

Carcinoembryonic antigen in breast cancer patients: serum level and disease progress.
Cancer, 35: 1095-1100.

276. STOSCHECK, C. and KING, L. (1986).:

Role of epidermal growth factor in carcinogenesis.
Cancer Res., 46: 1030-1037.

277. SUTHERLAND, R.L.; GREEN, M.; HALL, R. et al. (1983).:

Tamoxifen induces accumulation of MCF-7 human mammary carcinoma cells in the G_0/G_1 phase of the cell cycle.
Eur. J. Cancer Clin. Oncol., 19: 615-621.

278. SUTHERLAND, R.L.; HALL, R L. and TAYLOR, W. (1983).:

Cell proliferation Kinetics of MCF-7 human mamary carcinoma cells in plateau phase cells.
Cancer Res., 43: 3998-4006.

279. SUTHERLAND, R.L. and MURPHY, L.C. (1980).:

The binding of tamoxifen to human mammary carcinoma cytosol.
Eur. J. Cancer, 16: 1141.

280. SUTHERLAND, R.L.; MURPHY, L.C.; FOO, M.O. et al. (1980).:

High-affinity antioestrogen binding site distinct from the oestrogen receptor.
Nature, 288: 273.

281. SUYAMALA, G. and GORSKI, J. (1967).:

Interrelation-ship of estrogen receptors in nucleus and cytosol.
J. Cell. Biol., 35: 125A (Abstract).

282. SYLVAN, S. (1979).:

TPA in Acute Hepatitis. En: Laboratory testing of cancer, Hantkamp H. and Högman A, (ed). Folksan, Stockholm, pp. 35-36.

283. SZEGO, C.M. and PIETRAS, R.J. (1985).:

Subcelular distribution of oestrogen receptor.
Nature, 317: 88-89.

284. TATA, J. (1979).:

Control by oestrogen of reversible gene expression: The vitellogenin model.
J. Steroid Biochem., 11: 361-371.

285. TAYLOR, I.; HODSON, P.; GREEN, M. et al. (1983).:

Effects of tamoxifen on cell cycle progression of synchronous MCF-7 human mammary carcinoma cells.
Cancer Res., 43: 4007-4010.

286. TAYLOR, J.M.; MITCHELL, W.M. and COHEN, S. (1972).:

Epidermal growth factor: physical and chemical properties.
J. Biol. Chem., 247: 5928-5934.

287. TERASIMA, T. and TOLMACH, L.J. (1961).:

Changes in X-ray sensitivity of Hela cells during
the division cycle.
Nature (Lond.), 190: 1210-1211.

288. TERASIMA, T. and TOLMACH, L.J. (1963).:

Growth and nucleic acid synthesis in synchronously dividing
population of Hela cells.
Exp. Cell Res., 30: 344-362.

289. THOMAS, J. (1987).:

Comunic. personal.

290. TODARO, G.J.; DeLARCO, J.E. (1978).:

Growth factors produced by sarcoma virus-transformed cells.
Cancer Res., 38: 4147-4154.

291. TODARO, G.J.; DeLARCO, J.E. and COHEN, S. (1976).:

Transformation by murine and feline sarcoma viruses specifically blocks binding of epidermal growth factor to cells.
Nature (Lond.), 264: 26-31.

292. TODARO, G.J.; DeLARCO, J.E.; FRYLING, C. et al. (1981).:

Tranforming growth factors (TGFs): properties and possible mechanisms of action.
J. Supramol. Struct. Mol. Biochem., 15: 287-301.

293. TOFT, D. (1972).:

The interaction of uterine estrogen receptors with DNA.
J. Steroid. Biochem., 2: 515-522.

294. TORRES, M. (1985).:

CEA y TPA en cáncer de mama. Hallazgos y criterios de utilización.
Tesis Doctoral. Facultad de Medicina. Universidad de Granada.

295. TORRES, M.; RUIZ DE ALMODOVAR, J.; VILLALBA, J et al. (1985).:

CEA y TPA en cáncer de mama. Hallazgos y criterios de utilización.
Rev. Esp. Oncología, 32: 265-280.

296. TUBIANA, M. (1975):

Cinétique des populations de cellules. En: Traité de Médicine Nucléaire. Meyniel, L. ed. Flammarion Médicine Sciences Ed. Paris, pp. 95-99.

297. TUCKER, R.F.; SHIPLEY, G.D.; MOSES, H.L. et al. (1984).:

Growth inhibitor from BSC-1 cells closely related to the platelet type β transforming growth factor.
Science (Wash. DC), 226: 705-707.

298. TWARDZIK, D.R.; RANCHALIS, J.E. and TODARO, G.J. (1982).:

Mouse embryonic transforming growth factors related to those from tumor cells.
Cancer Res., 42: 590-593.

299. USHIRO, H. and COHEN, S. (1980).:

Identification of phosphotyrosine as a product of epidermal growth factors-activated protein kinase in A431 cell membranes.
J. Biol. Chem , 255: 8363-8365.

300. VALERIOTE, F. and VIETI, T.J. (1977).:

Celular Kinetics and conceptual basis of chemotherapy. En: Clinical Pediatric Oncology. Suton, Vietti, and Ferubach eds. C.V. Macby Company Ed. St. Louis, pp. 182-196.

301. VALLADARES, J. (1985).:

Estado actual de los marcadores biológicos en Oncología. Rev. Esp. Oncología, 32:129-161.

302. VIC, P.; VIGNON, F.; DEROCQ, M. et al. (1982).:

Effect of estradiol on the ultrastructure of the MCF-7 human breast cancer cells in culture. Cancer Res., 42: 667-673.

303. VIGNON, F.; C[illegible]-CNY, F.; CHAMBON, M. et al. (1986).:

Autocrine growth stimulation of the MCF-7 breast cancer cells by the estrogen-regulated 52k protein. Endocrinology, 118: 1537-1545.

304. VIGNON, F.; DEROCQ, D.; CHAMBON, M. et al. (1983):

Les protéines estrogeno-induites sécrétées par les cellules mammaires cancéreuses humaines MCF-7 stimulatent leur prolifération. C.R. Acad. Sc. Paris, 296: 151-156..

305. VIGNON, F.; TERQUI, M.; WESTLEY, B. et al. (1980).:

Effects of plasma estrogen sulfates in mammary cancer cells.
Endocrinology, 106: 1079-1086.

306. VILLALBA, J. (1986).:

Receptores de Estrógenos en Células Intactas.
Tesis Doctoral. Facultad de Medicina. Universidad de Granada.

307. VILLALOBOS, M. (1986):

Modelos Tumorales: Estudio de la cinética de proliferación celular en MCF-7 y EVSA-T.
Memoria de licenciatura. Facultad de Medicina. Universidad de Granada.

308. VILLALOBOS, M.; OLEA, N.; GORGOJO, L. et al. (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: 12-68.

309. WALT, A.J.; SINGHAKOWINTA, A.; BROOKS, S.C. et al. (1976).:

The surgical implications of estrophile protein estimations in carcinoma of the breast.
Surgery, 80: 506-512.

310. WATERFIELD, M.D.; SCRACE, G.T.; WHITTLE, N. et al. (1983).:

Patelet-derived growth factor is structurally related to the putative transforming p 28 sis of simian sarcoma virus.
Nature, 304: 35-39.

311. WEBER, K.; OSBORN, M.; MOLL, R. et al. (1984).:

Tissue polypeptide antigen (TPA) is related to the non - epidermal keratins 8, 18 and 19 typical of simple and non-squamous epithelia: re-evaluation of a human tumor marker.
The EMBO Journal, 3: 2707-2714.

312. WEICHSELBAUM, R.R.; HELLMAN, S.; PIRO, A.J. et al. (1978).:

Proliferation kinetics of a human breast cancer line in vitro following treatment with 17-β-estradiol and 1-β-D-arabinofuranosyl cytosine.
Cancer Res., 38: 2339-2342.

313. WELSHONS, W.V.; LIEBERMAN, M.E. and GORSKI, J. (1984).:

Nuclear localization of unoccupied oestrogen receptors.
Nature, 307: 747-749.

314. WESTLEY, B. and ROCHEFORT, H. (1979).:

Estradiol induced proteins in the MCF-7 human breast cancer cell line.
Biochem. Byophys. Res. Commun 93: 410-416.

315. WESTLEY, B. and ROCHEFORT, H. (1980).:

A secreted glycoprotein induced by estrogen in human breast cancer cell lines.
Cell., 20: 353-362.

316. WHITEHEAD, R.; QUIRK, S.; VITALI, A. et al. (1984).:

A new human breast carcinoma cell line (PCM42) with stem cell characteristics. III. Hormone receptor status and responsiveness.
J. Natl. Cancer Inst., 73: 643-648.

317. WIKLUND, B. and LÖNING, B. (1982).:

Further immunochemical studies of tissue polypeptide antigen (TPA). In protides of the biological fluids.
Peeters H(ed.), Pergamon Press, Oxford, pp. 143-146.

318. WIKLUND, B.; LUNING, B. and BJÖRKLUND, B. (1981).:

Chemical studies of tissue polypeptide antigen (TPA) III. On the nature of the Antigenic Determinat (S) of TPA subfraction B_1.
Acta Chem. Scand. B., 35 : 325-336.

319. WILLIANS, D. and GORSKI, J. (1972).:

Association behavier of the oestradiol binding protein complex with the nuclear fraction.
Acta Endocrinol. Copenh. Suppl., 168: 420-435.

320. WILLIANS, D. and GORSKI, J. (1972).:

Kinetic and equilibrium analysis of estradiol in uterus. A model of binding site distribution in uterine cell.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 69: 3464-3468.

321. WINNEKER, R.C. and CLARK, J.H. (1983).:

Estrogenic stimulation of the antiestrogen specific binding site in rat uterus and liver.
Endocrinology, 112: 1910.

322. WOLF, K. (1979).:

Laboratory management of cell cultures. En: Cell culture Methods in Enzimology LVIII. Jakoly, W.B. and Pastan, I.H. eds. Academic Press Ed. New York, pp. 116-119.

323. YAMAMOTO, K.R. (1974).:

Characterizacion of the 4S and 5S forms of the estradiol receptor protein and their interaction with deoxyribonucleic acid.
J. Biol. Chem., 249: 7068-7075.

324. YAMAMOTO, K.R. and ALBERTS, B. (1974).:

On the specifity of the binding of the estradiol receptor protein to deoxyribonucleic acid.
J. Biol. Chem., 249: 7076-7086.

325. ZWIEBEL, J.A.; DAVIS, M.R.; KOHN, E. et al. (1982).:

Anchorage-independent growth-conferring factor production by rat mammary tumor cells.
Cancer Res., 42: 5117-5125.