

TABLA IV-14

ASOCIACION / INDEPENDENCIA
 ENTRE FENOTIPO DEL RECEPTOR Y
 ESTADO MENSTRUAL

	RE+	RE-	T ₁
Premenopáusicas	14	17	31
Postmenopáusicas	41	15	56
T ₂	55	32	87

Comoquiera que el receptor de progesterona es consecuencia directa de la acción estrogénica, resulta lógico pensar que entre el fenotipo del receptor de estrógenos y el fenotipo del receptor de progesterona, debe existir una determinada relación de asociación. Este hecho, plenamente aceptado en la actualidad, ha quedado confirmado en el presente estudio (Tabla IV-15). En efecto, el valor de χ^2_{exp} obtenido:

$$\chi^2_{exp} = 26,8 + 12,7 + 0,5 + 29,2 - 58 = 11,2$$

$$\chi^2_{exp} > \chi^2_{0.05}$$

demuestra que entre ambas proteínas existe una relación de dependencia estadísticamente significativa. A pesar de ello, llama la atención el hecho de que en una proporción no despreciable de casos (17/58 \approx 29%), al fenotipo RE+ se asocia el carácter RPg-. Este fenómeno, que ha sido descrito con anterioridad, se explica tomando en consideración los siguientes fenómenos (55, 178, 234, 235).

1) La existencia de errores metodológicos en la determinación de una u otra proteína.

2) La influencia de los niveles circulantes de progesterona, especialmente en la fase láctea del ciclo menstrual.

TABLA IV-15

ASOCIACION / INDEPENDENCIA
 ENTRE FENOTIPO RE Y
 FENOTIPO RPg.

	RE+	RE-	T ₁
RPg+	18	2	20
RPg-	17	21	38
T ₂	35	23	58

3) La existencia de un nivel de estrógenos circulantes insuficiente para estimular la síntesis del RPg en el tumor.

(Estas consideraciones inducen a pensar en la teórica hormonorresistencia de los tumores RE+/RPg- que debe ser cuestionada, al menos, cuando los niveles de progesterona circulante sean elevados (58)).

El pronóstico de la enfermedad puede matizarse, por último, utilizando los datos de RE y RPg simultáneamente. Así, la tabla IV-16, que ofrece los resultados de supervivencia global (P_s) y supervivencia libre de enfermedad (P_{se}), a tres años de seguimiento, para los subgrupos de pacientes RE+/RPg+ y RE-/RPg-, facilita la comparación estadística de los valores P_s y P_{se} de uno y otro subgrupo.

En el primer caso (P_s), el análisis estadístico:

$$F_{exp} = 0,118^2 / 0,054^2 = 4,78 ;$$

$$F_{exp} > F_{0,05} : 3,33 ; S_1 \neq S_2$$

$$t_{exp} = |0,94 - 0,61| / (0,054^2/11 + 0,118^2/6)^{1/2} = 6,48$$

$$(t'_{0,01} = 3,94) < (t_{exp} = 6,48)$$

TABLA IV-16

PROBABILIDAD DE SUPERVIVENCIA (P_s)
 Y DE SUPERVIVENCIA LIBRE DE
 ENFERMEDAD (P_{sL}) EN FUNCION
 DEL FENOTIPO DE RECEPTORES HORMONALES.

	RE+/RPg+	RE-/RPg-
P_s	0,94	0,61
σ_s	0,054	0,118
P_{sL}	0,76	0,52
σ_{sL}	0,108	0,128

indica que las diferencias observadas en su respectivo valor en pacientes RE+/RE- y RE-/RE+ son estadísticamente significativas. En el segundo caso (P_{SL}), como quiera que:

$$F_{exp} = 0,128^2 / 0,108^2 = 1,40 ; F_{0,05} = 3,33$$

$$F_{exp} < F_{0,05} ; S_1 = S_2$$

$$S = [(5 \times 0,128^2 + 10 \times 0,108^2) / 15]^{1/2} = 0,115$$

$$t_{exp} = |10,76 - 0,52| / [0,115(1/11 + 1/6)^{1/2}] = 4,11$$

$$(t_{exp} = 4,11) > (t_{0,001} = 4,073)$$

las diferencias objetivadas son, también, significativas.

4.2.5. Grado histológico de diferenciación.

En cáncer de mama, la existencia de una relación estadísticamente cierta entre grado de diferenciación y volumen "crítico" necesario para la diseminación del tumor parece demostrada (20,155,243). Se cree, además, que entre el grado de diferenciación y la presencia de receptores de estrógenos existe una relación de asociación que indica que tumores de alto grado (o muy indiferenciados) se asocian al fenotipo RE-, mientras que

los tumores de bajo grado (o poco indiferenciados) expresan frecuentemente la proteína RE (7,181,191).

Nuestros resultados permiten confirmar que entre el grado de diferenciación del tumor y la probabilidad de recidiva existe una relación de asociación. En efecto, la comparación estadística de los valores de P_s y P_{sl} obtenidos, demuestra que la supervivencia global y la supervivencia libre de enfermedad, para el grupo G I-II, son estadísticamente más elevadas que las que caracterizan al grupo G III:

$$t_{exp} \text{ para } P_s = 2,41 \quad ; \quad p < 0,05$$

$$t_{exp} \text{ para } P_{sl} = 7,44 \quad ; \quad p < 0,001$$

El tamaño del tumor ha resultado estar, por otra parte, ligado al grado de diferenciación tumoral (Tabla IV-17). En efecto, el cálculo del coeficiente:

$$\chi^2_{exp} = 20,4 + 3,8 + 5,6 + 16,8 - 42 = 4,6$$

$$\chi^2_{exp} > \chi^2_{0,05}$$

permite afirmar que el grado histológico III se asocia más frecuentemente con tumores de gran diámetro. Por el contrario, el patrón histológico bien o moderadamente diferenciado (G I - G II), se ha presentado, preferentemente, en tumores de diámetro inferior a 5 cm.

TABLA IV-17

ASOCIACION / INDEPENDENCIA
 ENTRE TAMAÑO TUMORAL Y
 GRADO DE DIFERENCIACION.

	G I-II	G III	T ₁
Ø ≤ 5 cm	16	8	24
Ø > 5 cm	6	12	18
T ₂	22	20	42

TABLA IV-18

ASOCIACION / INDEPENDENCIA
 ENTRE TAMANO TUMORAL Y
 FENOTIPO DEL RECEPTOR.

	G I-II	G III	T ₁
RE-	9	11	20
RE+	13	9	22
T ₂	22	20	42

Por último, el estudio de la posible relación existente entre grado histológico y fenotipo del receptor estrogénico (Tabla IV-18), ha ofrecido para χ^2_{exp} un valor:

$$\chi^2_{exp} = 7,7 + 12,7 + 14,7 + 7,7 - 42 = 0,8$$

inferior al $\chi^2_{0,05}$, por lo que la hipótesis de dependencia entre el grado de diferenciación y el carácter RE+ o RE- debe ser rechazada. Esta conclusión, que resulta concordante con los resultados publicados por Roberts y Hahnel (229), difiere claramente de la sostenida por otros autores. (7,181,191)

4.3. CANCER DE MAMA; ACTIVIDAD PROLIFERATIVA CELULAR Y HORMONODEPENDENCIA TUMORAL.

El cáncer de mama es una enfermedad cuyo curso, tras la mastectomía inicial es difícil de predecir. Hasta hace poco tiempo, el criterio general sobre el que se fundamentaba el pronóstico era la clasificación por estadios clínicos que servía y sirve aún como norma orientativa para decidir el tratamiento (15). La heterogeneidad existente en los distintos grupos de pacientes derivados de la clasificación por estadios ha impedido, sin embargo, la formulación de elementos de pro-

nostico más precisos (18,19,20). En los últimos años la biología del cancer de mama ha sido objeto de intensos estudios. Consecuencia de ellos ha sido la utilización de las características cinéticas y/o la dependencia hormonal del tumor como elementos definidores del pronóstico o como factores predictivos de la respuesta al tratamiento (60,151,167,182,188,189,269,292). En este sentido, publicaciones recientes han subrayado el significado de la velocidad de proliferación celular como índice predictivo de la recurrencia tumoral en pacientes N- sometidas a cirugía (99,189) o cirugía más irradiación (289). En efecto, el índice de marcaje con timidina tritiada (TLI), medido "in vitro" sobre las piezas tumorales procedentes de mastectomía, ha podido demostrarse que correlaciona, de manera significativa, con la agresividad del tumor (99,188,189,190,289). Junto con el estado axilar, el TLI ha resultado poseer, además, un importante valor como elemento predictivo del curso de la enfermedad, sin que entre uno y otro parámetro se haya encontrado relación de dependencia alguna (188).

Idéntico papel parece jugar el fenotipo del receptor estrogénico. Efectivamente, aunque en algunos casos se sostiene lo contrario (1,3) nuestros propios resultados y los publicados por otros autores demuestran que, en general, las pacientes con cáncer de mama

RE+ viven más -y su intervalo libre de enfermedad es más prolongado- que las enfermas con tumores RE- (4,62, 108,118,131,178,267).

El valor del fenotipo del receptor como elemento definidor del pronóstico parece ligado, por otra parte, a la velocidad de proliferación celular tumoral (188, 199,254). Con independencia de nuestros propios resultados se sabe, a este respecto, que los tumores indiferenciados y con rápida cinética de crecimiento (alto índice TLI) son más frecuentemente RE- que los tumores bien diferenciados que proliferan lentamente (191). Este hecho permitiría explicar, quizás, el alto porcentaje de tumores RE- que suele presentarse en mujeres premenopáusicas, en las cuales un alto nivel de 17- β -estradiol circulante podría ocasionar, no sólo modificaciones intracelulares de la concentración de estrofilina (128), sino también el incremento de la velocidad de proliferación de las células clonogénicas del tumor (168,170).

Los anteriores hallazgos hacen razonable la suposición de que los parámetros que definen la cinética celular del tumor y su dependencia/independencia hormonal, deben permitir una caracterización biológica del mismo. Pues bien, los experimentos que a continuación se discuten se han llevado a cabo con el propósito de

demostrar, "in vitro", que los niveles de receptores hormonales para estrógenos y progesterona en células de cáncer de mama mantenidas en cultivo resultan dependientes del ritmo de crecimiento de las células y de la fase del ciclo vital en el que éstas se encuentran.

4.3.1. Cinética de proliferación celular en cultivos MCF-7.

La velocidad de crecimiento de las células MCF-7 en cultivo puede ser modulada por numerosas sustancias: estrógenos, antiestrógenos, glucocorticoides, progesterona y andrógenos entre otras (168,169,171), cuya acción resulta mediada por la presencia de receptores hormonales intracelulares (35,126). 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 (141). Se ha observado, además, que la velocidad inicial de crecimiento de las células MCF-7, (133) resulta dependiente del número inicial de éstas presente en el cultivo. Este último hecho, que puede estar en relación con la producción, por parte de las células, de factores autoestimuladores

del crecimiento (172), explica que entre la densidad de siembra inicial y el tiempo de duplicación de las células MCF-7 medido en las primeras 72 horas de subcultivo exista una relación de proporcionalidad directa (302). Pasada la fase inicial del cultivo, y en condiciones de densidad de siembra y de 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 (TD). El valor del TD de la población celular MCF-7 encontrado en nuestro laboratorio es de $40,0 \pm 0,7$ horas. Este valor está en consonancia con el resultado obtenido por otros autores (12,306) y se corresponde también con el descrito por Jakesz y col. (133) cuando la densidad de siembra inicial se ajusta a 10^5 células.

4.3.2. Efecto del tamoxifeno sobre la proliferación de células MCF-7.

Se ha demostrado, en cáncer de mama clínico (273), en tejido endometrial humano y de rata (274, 308), en hígado de rata (308) y en líneas celulares establecidas de cáncer de mama (192), 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. Aunque su función es desconocida, se cree que ésta no guarda relación con las modificaciones del crecimiento celular que inducen los antiestrógenos y se ha sugerido que el mecanismo responsable de los efectos antiproliferativos es el enlace del tamoxifeno al receptor de estrógenos (192).

Los efectos del tamoxifeno sobre la población celular MCF-7 pueden ser reversibles -por efecto del estradiol- o irreversibles (163), según el nivel de concentración ensayado. Los efectos reversibles se asocian con la acumulación de las células en la fase G_0/G_1 del ciclo mitótico (271). Los efectos irreversibles -muerte celular- predominan a elevadas concentraciones de antiestrógeno (271). Existe, por último, un tercer mecanismo inhibitorio que parece no necesitar del concurso del receptor estrogénico, que, aunque no conduce a la lisis celular, resulta irreversible al estradiol (271). Este hecho sugiere que ciertas acciones del tamoxifeno pueden ser independientes del carácter receptor estrogénico positivo o negativo de la línea celular -o el tumor clínico- sometida a tratamiento, habiéndose demostrado (105) en efecto que, sobre líneas celulares RE-, el tamoxifeno 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 (278,279), la mayor parte del cultivo ($\approx 90-95\%$ respecto al total de células) se encuentra en fase G_1 , para $t = 1$ hora después de la selección mitótica. Transcurridas 7 horas, las células empiezan a abandonar el compartimento G_1 entrando progresivamente en fase de síntesis (S), llegando a ser de un 80% la proporción de elementos en esta fase. Para un tiempo comprendido entre 16 y 20 horas después de la selección, la mayor parte de las células ha completado la fase de síntesis y el periodo G_2/M finaliza de 4 a 6 horas más tarde (277). 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 el tiempo de ciclo completo (277).

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% (277). Estudiando los efectos del tamoxifeno sobre células MCF-7 sincrónicas, se ha podido demostrar que, estas células, son espe-

cialmente sensibles a la acción del antiestrógeno cuando el cultivo se encuentra justamente en la fase G₁ (4 horas después de M). El periodo de máxima sensibilidad tiene una duración comprendida entre 2 y 4 horas, fuera de la cual, el tamoxifeno ejerce una acción mínima. El tiempo de tránsito por la fase G₁ para la subpoblación celular de cinética lenta se ha estimado en torno a las 30 horas (272). El antiestrógeno, cuando se ensaya a bajas dosis, induce una alteración del "equilibrio" de distribución de células MCF-7 entre los dos estadios cinéticos (lento y rápido) haciendo predominante el número de células con largo tiempo de G₁ (272). Como resultado de este proceso tiene lugar la inhibición del crecimiento celular y la acumulación de células en fase G₁. Esta "sincronización" es máxima a los tres días del tratamiento con tamoxifeno (163).

4.3.3. Efecto del estradiol sobre cultivos celulares MCF-7 parcialmente sincronizados en fase G₀-G₁.

El tratamiento secuencial del cultivo de células MCF-7 con OH-TAM, 10⁻⁷ M. primero y 17-β-estradiol después, constituye un procedimiento experimental mediante el cual es posible demostrar el efecto proliferativo del estradiol (175,209,301,302). Según Sutherland y col. (274) las células hormonosensibles a la acción del

estradiol modifican su actividad proliferativa por alguno de los mecanismos siguientes:

1) Incremento de la fracción de crecimiento, mediante el reclutamiento de las células quiescentes de la población.

2) Acortamiento del tiempo de duración del ciclo celular, a través de la reducción de la fase G₁.

3) Disminución del índice de muerte celular.

En condiciones de cultivo normales la fracción de crecimiento de las células MCF-7 es del 40% y su TD está próximo a las 40 horas. Sin embargo, cuando se realiza el cultivo en MEM + FCS + OH-TAM 10^{-7} M, durante 72 horas para "sincronizar" las células y, posteriormente, se cambia el medio de cultivo usando MEM + FCS (grupo control) y MEM + FCS + $17-\beta-E_2$ (grupo estradiol) se ha demostrado (175) el incremento de la fracción de crecimiento de cada grupo (81% en el grupo control y 94% en el grupo estradiol) así como la disminución de los tiempos de duplicación que caracterizan la cinética de proliferación del cultivo (TD = 24,8 horas para el grupo control y TD = 22,3 para el grupo estradiol) (175).

Los resultados de nuestros experimentos (Tablas III-31 y III-32) ponen de manifiesto el efecto del rescate con suero de feto de ternera íntegro (FCS) o tra-

tado con carbón dextrano (FCS_(c)) para eliminar el estradiol (Figuras 4.7 y 4.8). El ajuste de los puntos experimentales a una función exponencial creciente permiten deducir el tiempo de duplicación de cada grupo experimental. Así para el grupo FCS el resultado del ajuste por mínimos cuadrados es el siguiente:

$$a = 0,816 \text{ (pendiente).}$$

$$b = 5,003 \text{ (ordenada en el origen).}$$

$$r = 0,987 \text{ (coeficiente de correlación).}$$

De la pendiente se puede deducir el valor del tiempo de duplicación de las células del cultivo:

$$TD = 0,693 / a = 0,693 / 0,816 = 0,85 \text{ días} = 20,4 \text{ horas}$$

Para el grupo FCS_(c) los parámetros correspondientes al ajuste son:

$$a = 0,408.$$

$$b = 11,937.$$

$$r = 0,903.$$

de donde se deduce que el valor de TD es de 40,8 horas. Este resultado es análogo al encontrado en condiciones de cultivo estandar (301) y claramente distinto del que caracteriza al fenómeno de reclutamiento promovido por el estradiol endógeno.

CINETICA DE CRECIMIENTO DE
CELULAS MCF-7 SINCRONIZADAS

EN MEM + FCS + OH-TAM 10^{-7} M (72 horas)

Y MEM + FCS (36 horas)

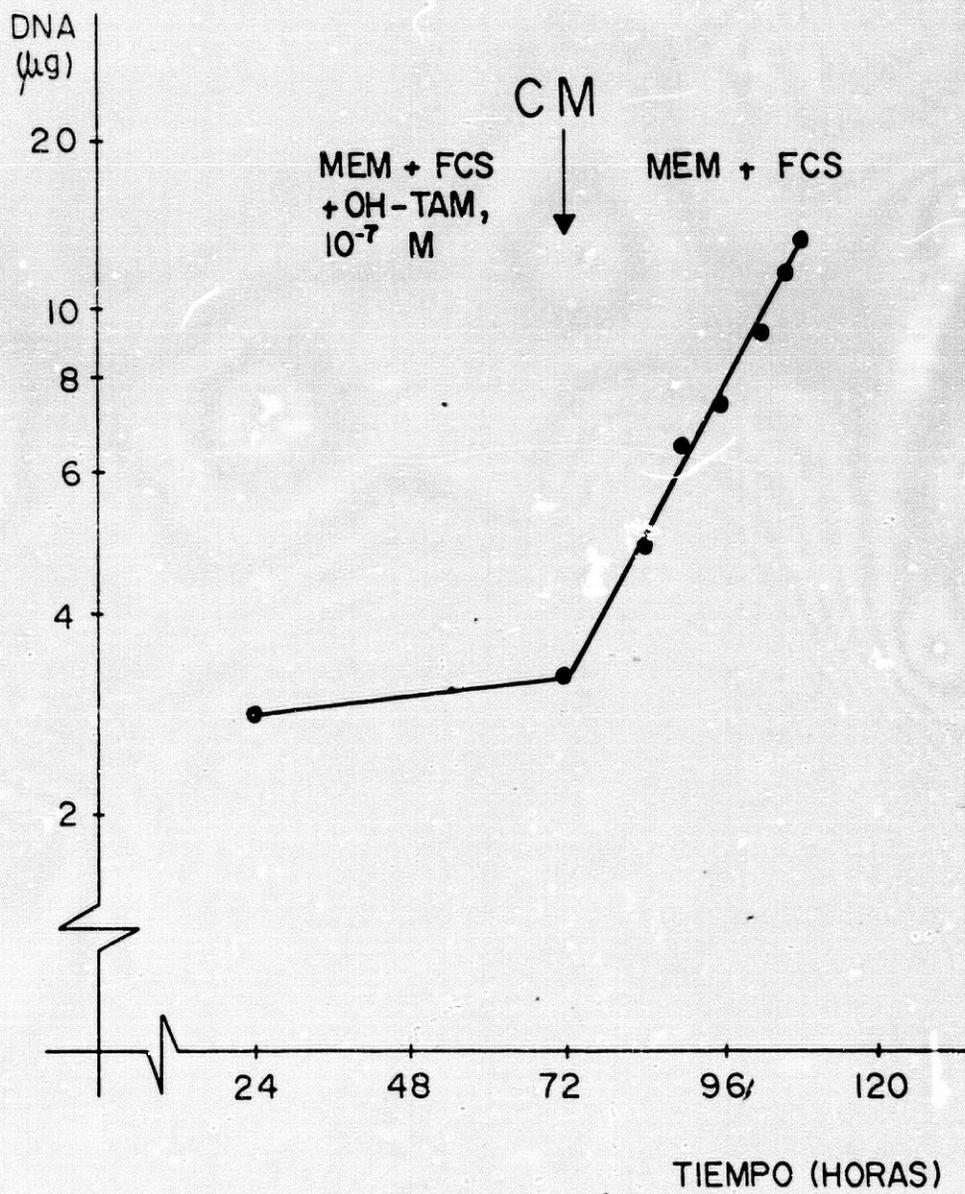


FIG.- 4.7.

CINETICA DE CRECIMIENTO DE CELULAS MCF - 7 SINCRONIZADAS

EN MEM + FCS + OH-TAM 10^{-7} M (72 horas)

Y MEM + FCS_(s) (36 horas)

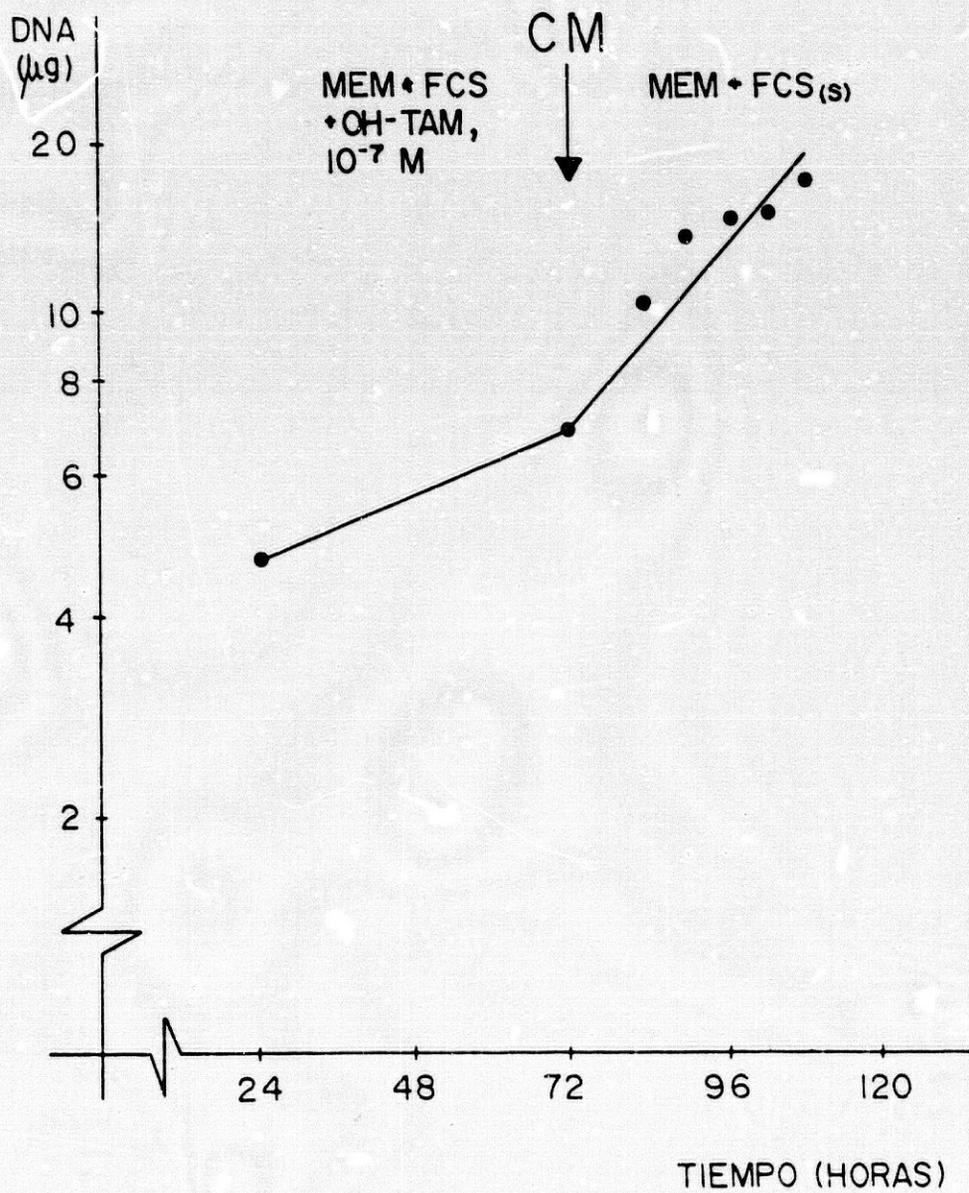


FIG.- 4.8.

4.3.4. Efecto del EGF sobre cultivos celulares MCF-7 parcialmente sincronizados en fase G₀-G₁...

El papel de las hormonas peptídicas como sustancias reguladoras del crecimiento de células cancerosas "in vivo" no se conoce en su totalidad. Recientemente, Osborne y col. (212) han demostrado que el EGF estimula el crecimiento de células MCF-7 cultivadas en medio libre de suero. El Epidermal Growth Factor (EGF) estimula también la velocidad de incorporación de precursores marcados (timidina, uridina y leucina) de manera dependiente de la dosis de EGF y del tiempo de exposición del cultivo a este factor (212). Como la línea celular MCF-7 posee receptores específicos para el EGF, se ha estudiado la afinidad del enlace hormona-receptor y la especificidad del mismo utilizando como competidores factor de crecimiento de fibroblastos, insulina y hormona del crecimiento (211). El modelo propuesto para la acción del EGF sobre las células en cultivo supone la asociación de la hormona y el receptor y la internalización o "secuestro" del complejo formado. A este proceso sigue la degradación de la hormona polipeptídica (88).

Los resultados de nuestro experimento de sincronización con tamoxifeno y rescate utilizando MEM + FCS₅, suplementado o no con EGF en diferentes

concentraciones (Figuras 4.9 a 4.12) permiten deducir el tiempo de duplicación de cada uno de los grupos experimentales ensayados (Tabla IV-19) para densidades celulares situadas en torno a la confluencia del cultivo.

Los valores de TD encontrados no difieren significativamente aunque se puede intuir un efecto positivo del EGF cuando se utiliza a la concentración de 10 ng/ml. Los resultados de Osborne y col. (212) sugieren que el EGF actúa sobre el crecimiento de las células MCF-7 a través del mismo mecanismo bioquímico que utiliza la insulina. La demostración del efecto positivo del EGF requiere, por ello, el cultivo de las células en medios nutrientes carentes de esta hormona y/o de la sincronización por depleción de nutrientes (212). Como las condiciones en las que hemos realizado nuestro experimento (sincronismo inducido farmacológicamente y presencia de insulina en el FCS que no se elimina, al menos en su totalidad, mediante el tratamiento del suero con carbón dextrano (DCC)) son diferentes resulta explicable la carencia de efectos diferenciales en EGF. De forma similar el EGF no ha demostrado ejercer efecto alguno sobre la línea celular MDA-231, cultivada en medio suplementado con suero tratado con carbón dextrano (212).

CINETICA DE CRECIMIENTO DE MCF-7 SINCRONICA

RESCATE : MEM + FCS_(S)

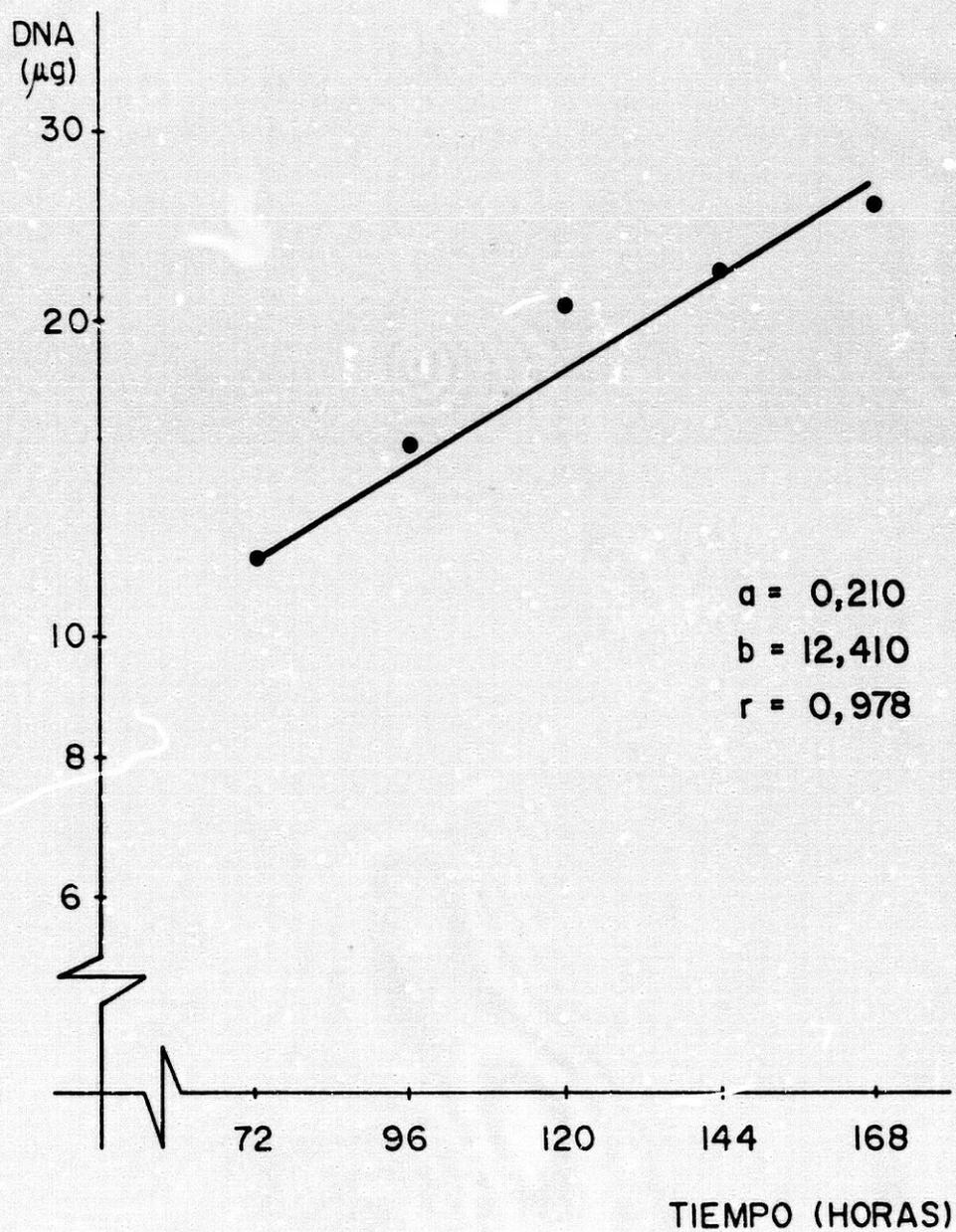


FIG.- 4.9.

CINETICA DE CRECIMIENTO DE CELULAS MCF - 7 SINCRONIZADAS

RESCATE: MEM + FCS₍₅₎ + EGF (1ng/ml)

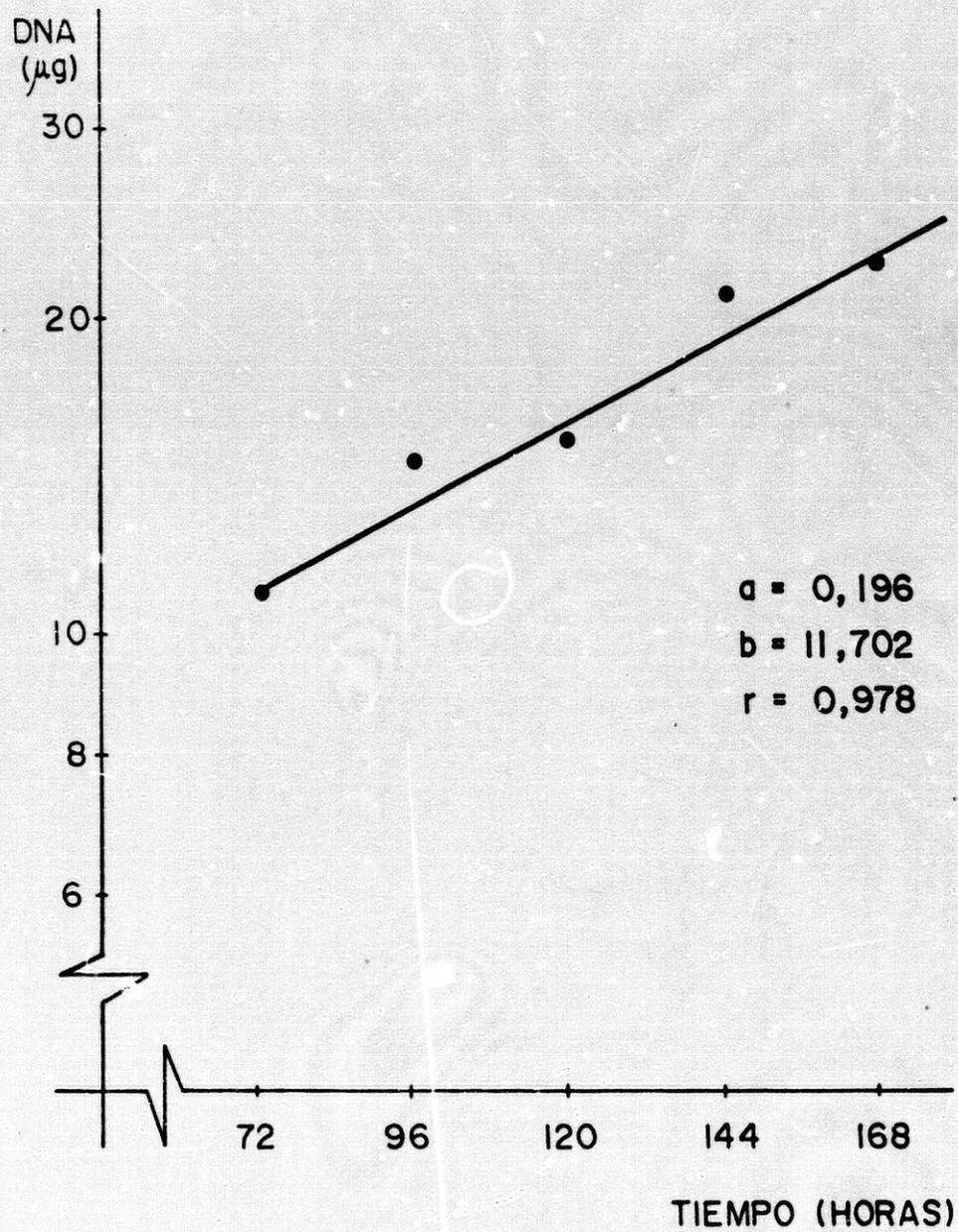


FIG.- 4.10.

CINETICA DE CRECIMIENTO DE CELULAS MCF - 7 SINCRONIZADAS

RESCATE: MEM + FCS_(s) + EGF (10 ng/ml)

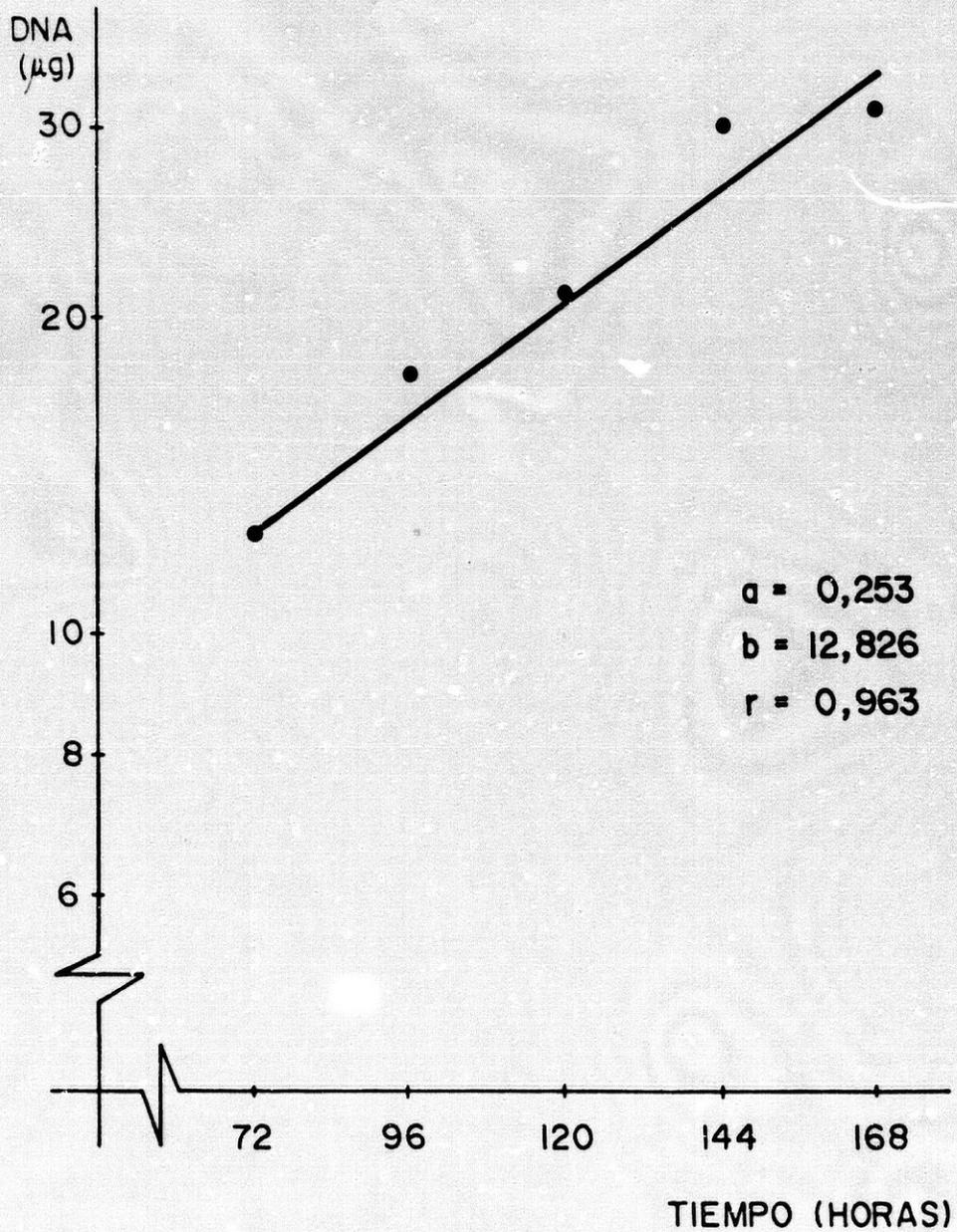


FIG.- 4. II.

CINETICA DE CRECIMIENTO DE CELULAS MCF - 7 SINCRONIZADAS

RESCATE: MEM + FCS(s) + EGF (100 ng/ml)

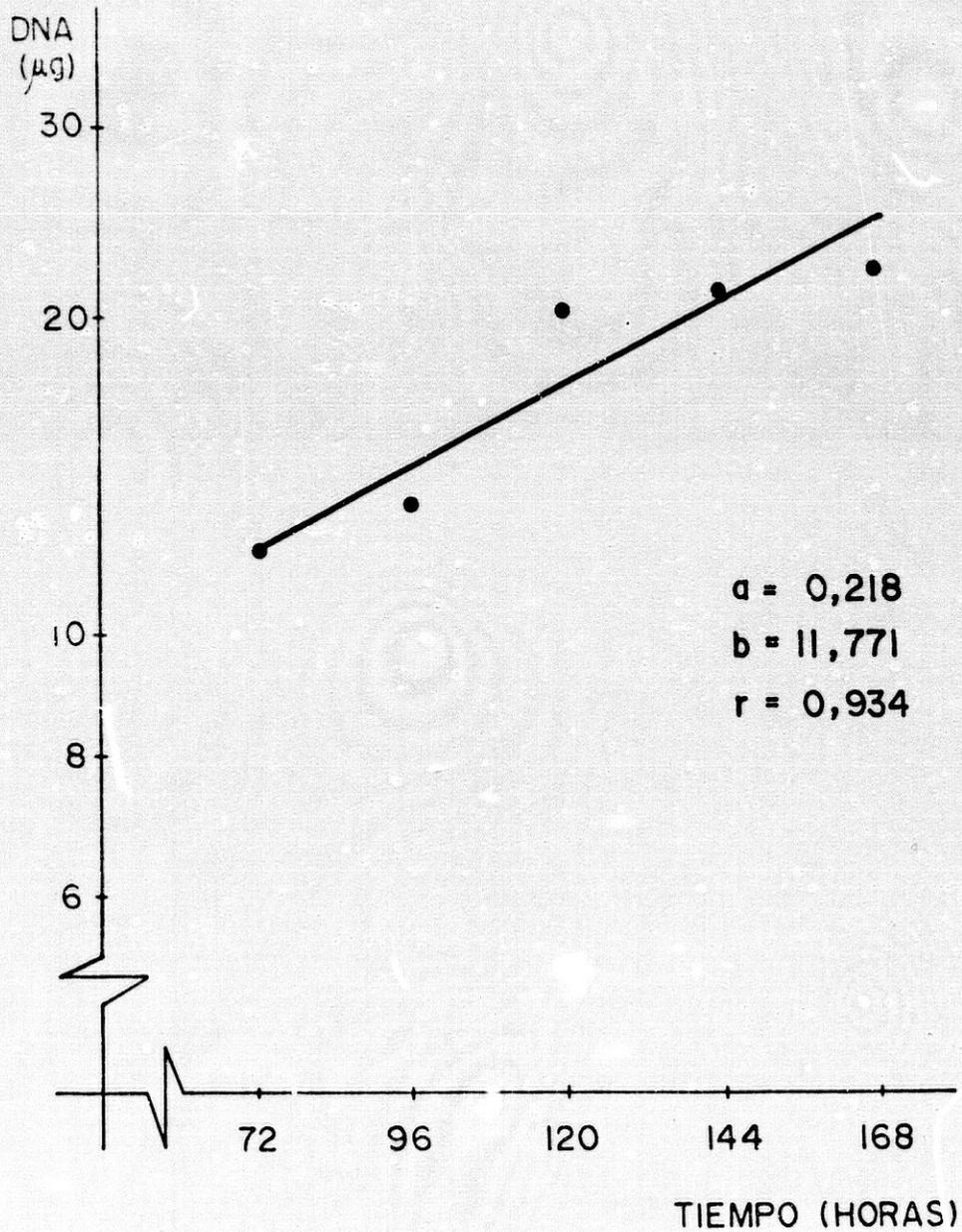


FIG.- 4.12.

Por otra parte, cuando se utiliza como medio nutriente MEM + EGF en ausencia de suplemento de suero, las células en cultivo, carentes de factores de crecimiento distintos del EGF, muestran una cinética de proliferación negativa (Figuras 4.13 a 4.15) que indica que el número de elementos celulares presente en el cultivo disminuye en función del tiempo. Este resultado se observa en todos los grupos experimentales (EGF = 1 ng/ml, EGF = 10 ng/ml y EGF = 100 ng/ml.) ensayados.

Para estudiar más detalladamente los efectos mitógenos del EGF sobre las células MCF-7 y su relación con determinados cofactores presentes en el suero (174, 268) hemos sometido a estudio comparativo el crecimiento de cuatro grupos celulares cultivados, tras sincronización con hidroxí-tamoxifeno:

MEM + FCS : Grupo A.

MEM + FCS + EGF, 10 ng/ml : Grupo B.

MEM + FCS_(e) : Grupo C.

MEM + FCS_(e) + EGF, 10 ng/ml : Grupo D. (Figuras 4.16 a 4.19).

CINETICA DE CRECIMIENTO DE CELULAS MCF - 7 SINCRONIZADAS

RESCATE : MEM + EGF (1 ng/ml)

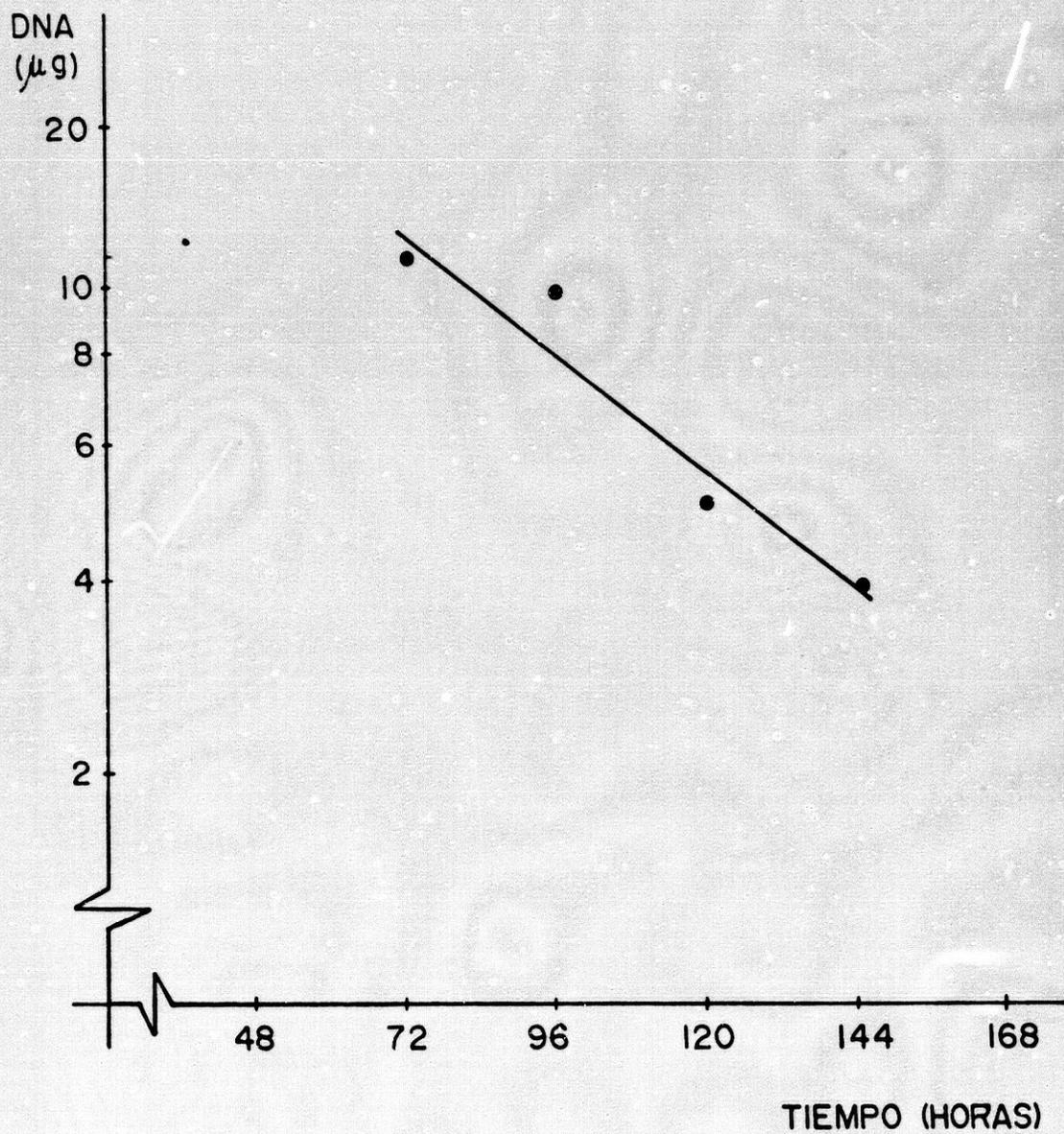


FIG.- 4.13

CINETICA DE CRECIMIENTO DE CELULAS MCF - 7 SINCRONIZADAS

RESCATE: MEM + EGF (10 ng/ml)

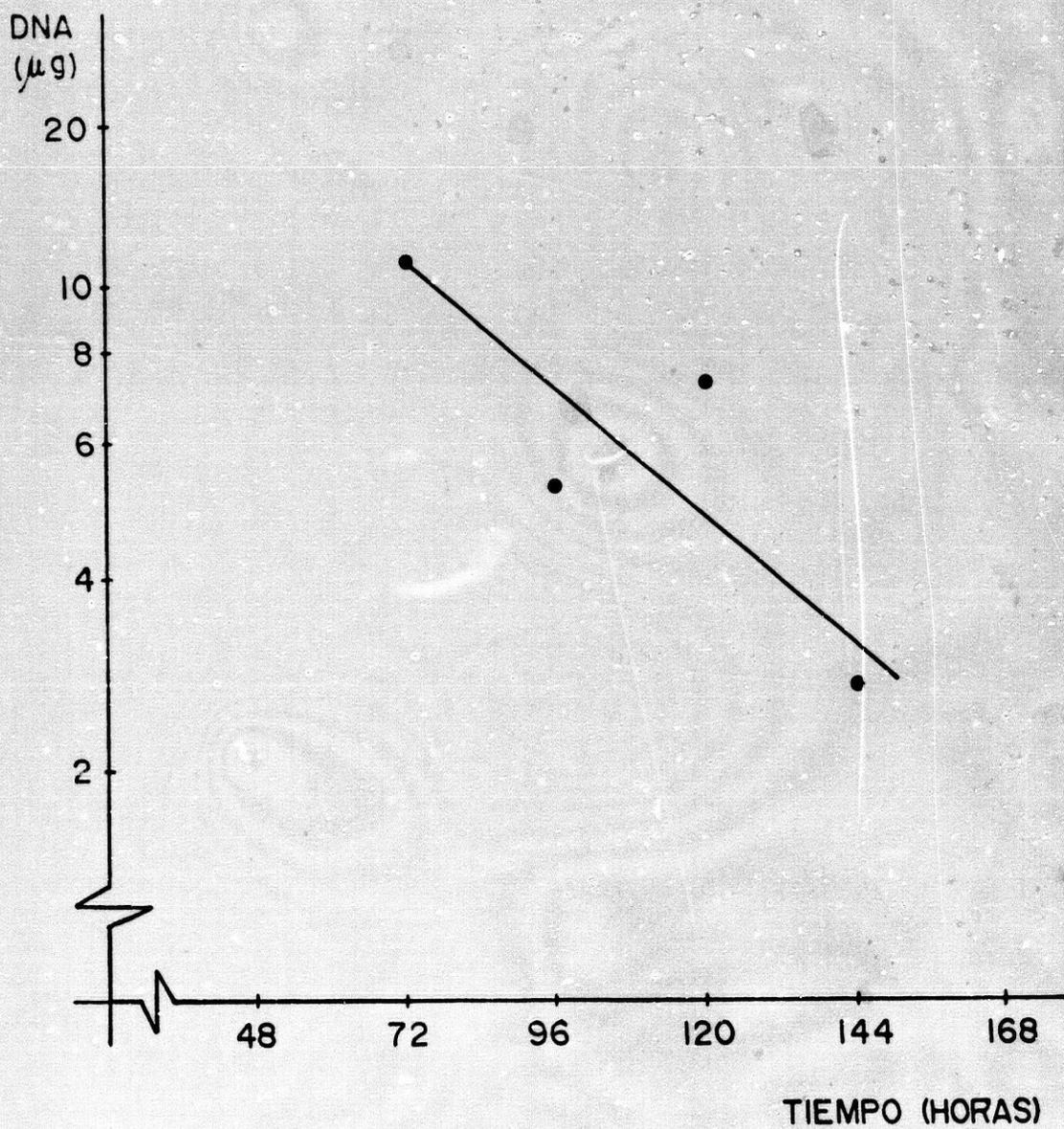


FIG.- 4.14.

CINETICA DE CRECIMIENTO DE CELULAS MCF - 7 SINCRONIZADAS

RESCATE : MEM + EGF (100 ng / ml)

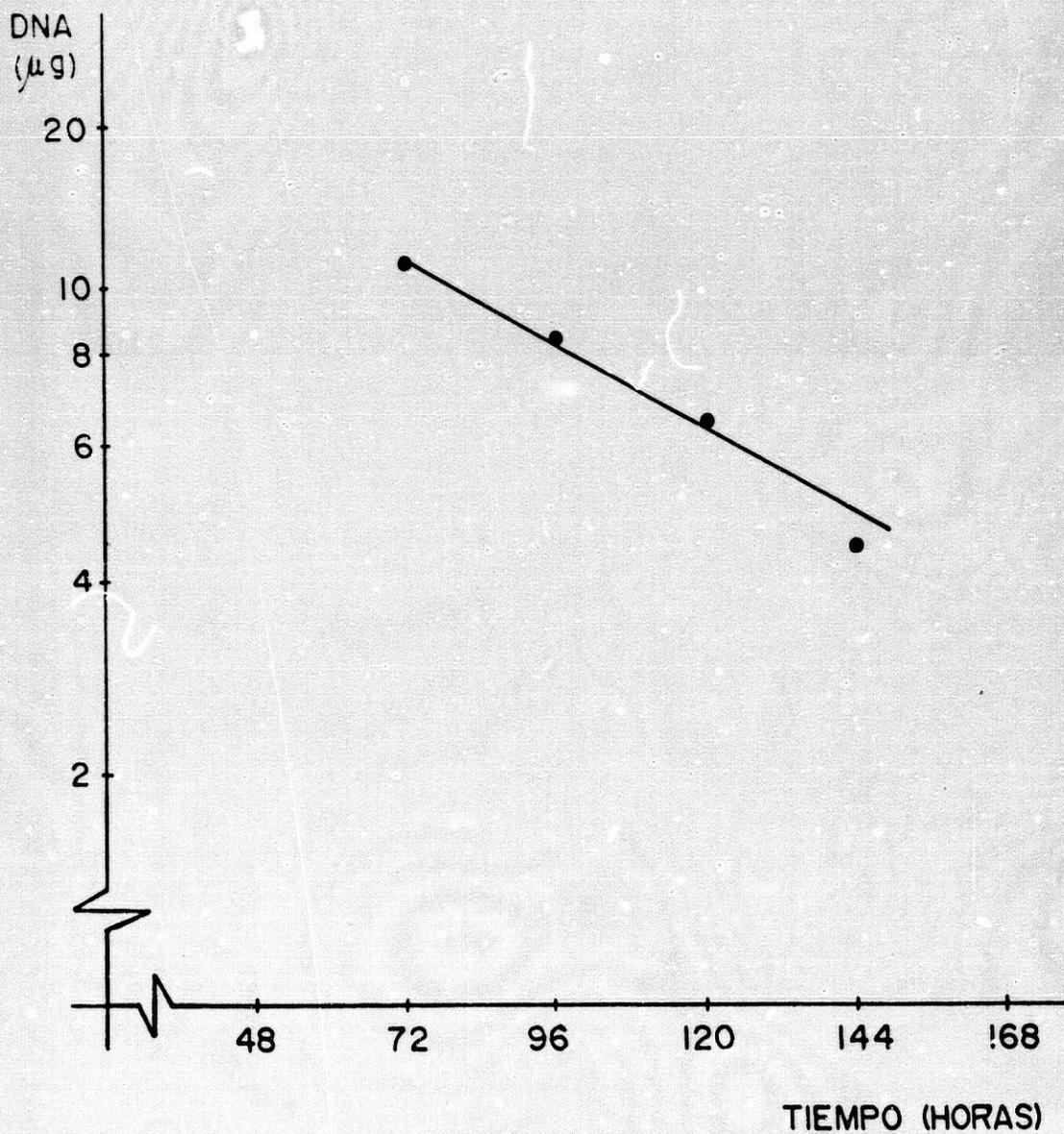


FIG.- 4.15.

CRECIMIENTO DE CELULAS MCF - 7 SINCRONIZADAS

GRUPO A: MEM + FCS

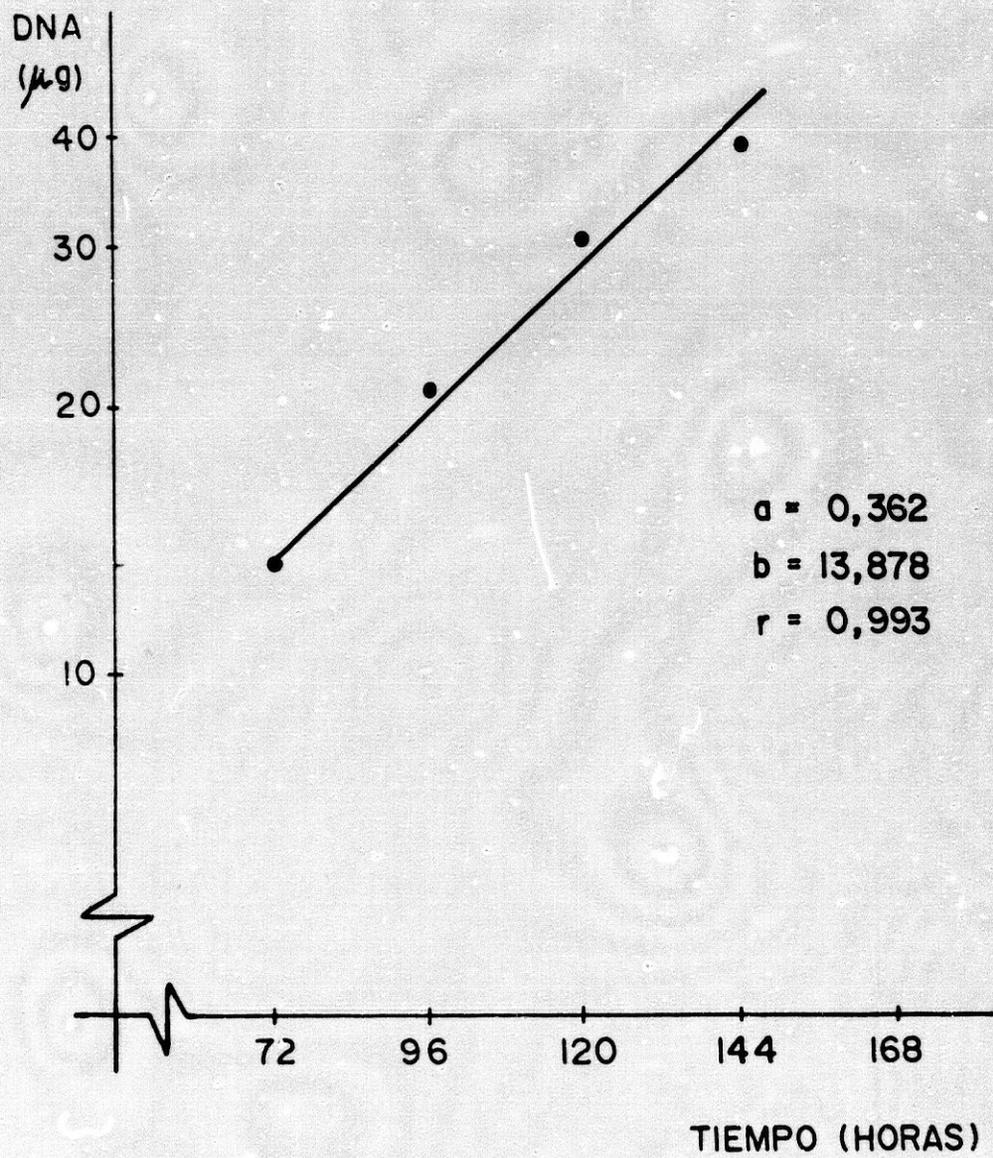


FIG.- 4.16.

CRECIMIENTO DE CELULAS MCF - 7 SINCRONIZADAS

GRUPO B: MEM + FCS + EGF (10 ng / ml)

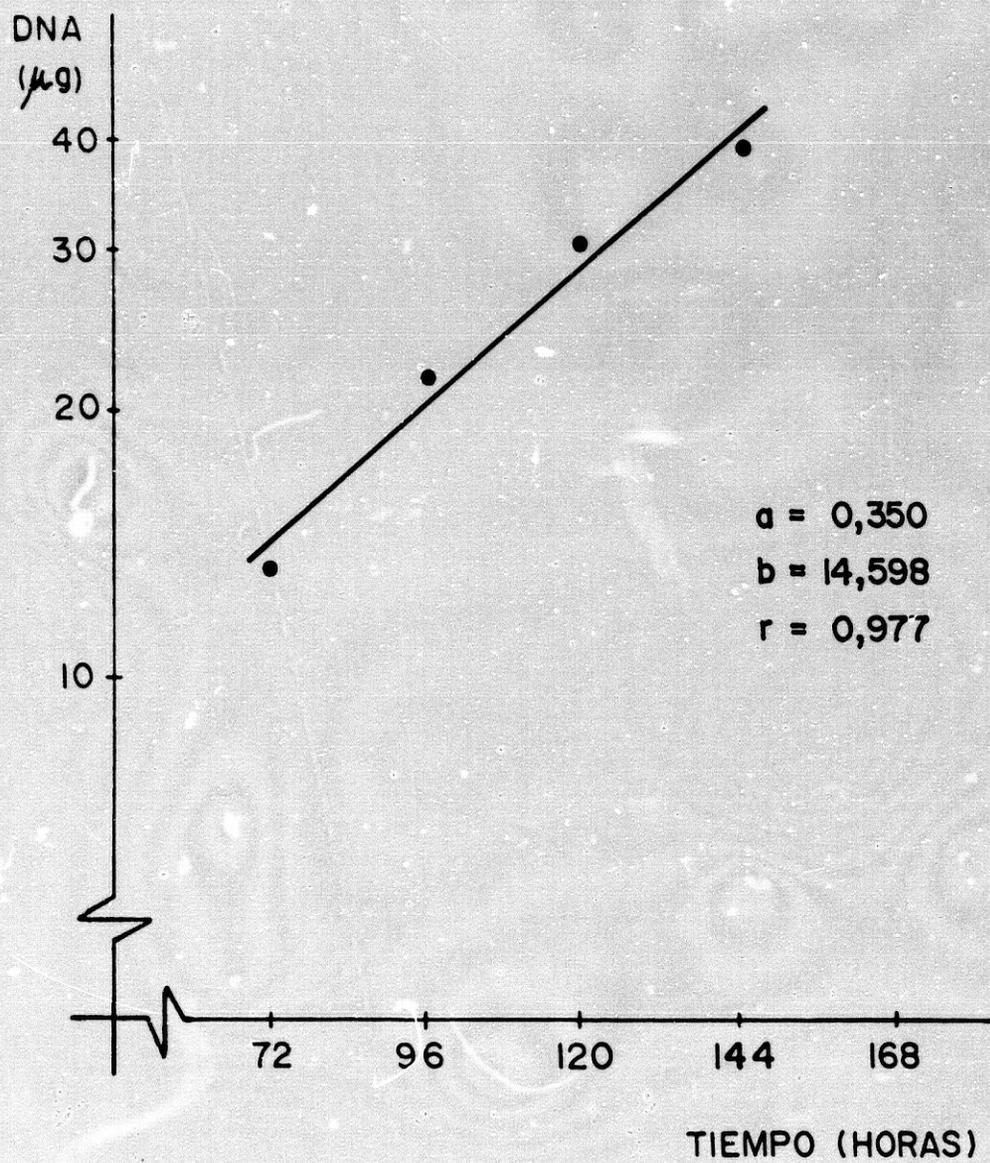


FIG.- 4.17.

CRECIMIENTO DE CELULAS
MCF - 7 SINCRONIZADAS

GRUPO C: MEM + FCS_(s)

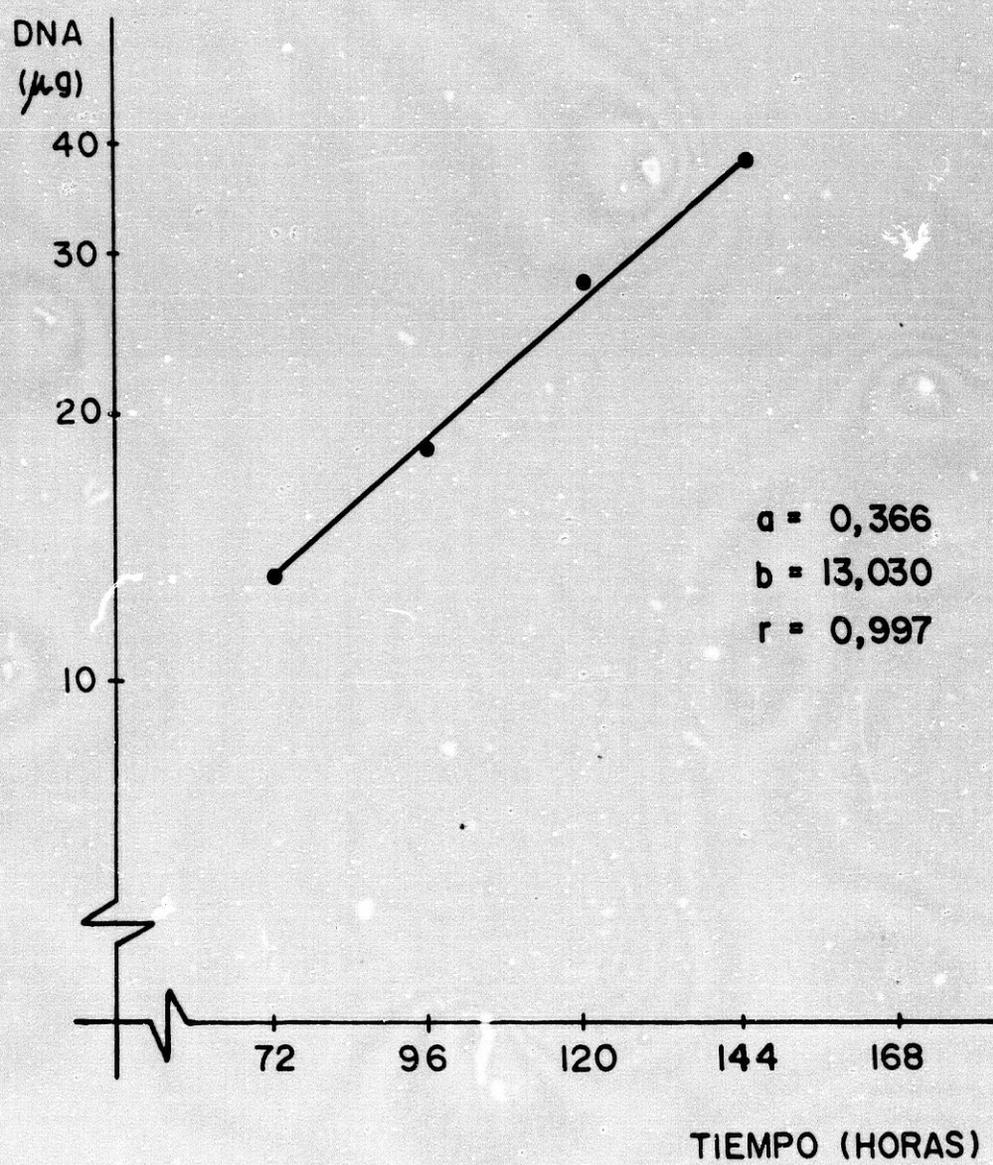


FIG.- 4.18.

CRECIMIENTO DE CELULAS MCF - 7 SINCRONIZADAS

GRUPO D: MEM + FCS_(s) + EGF (10 ng / ml)

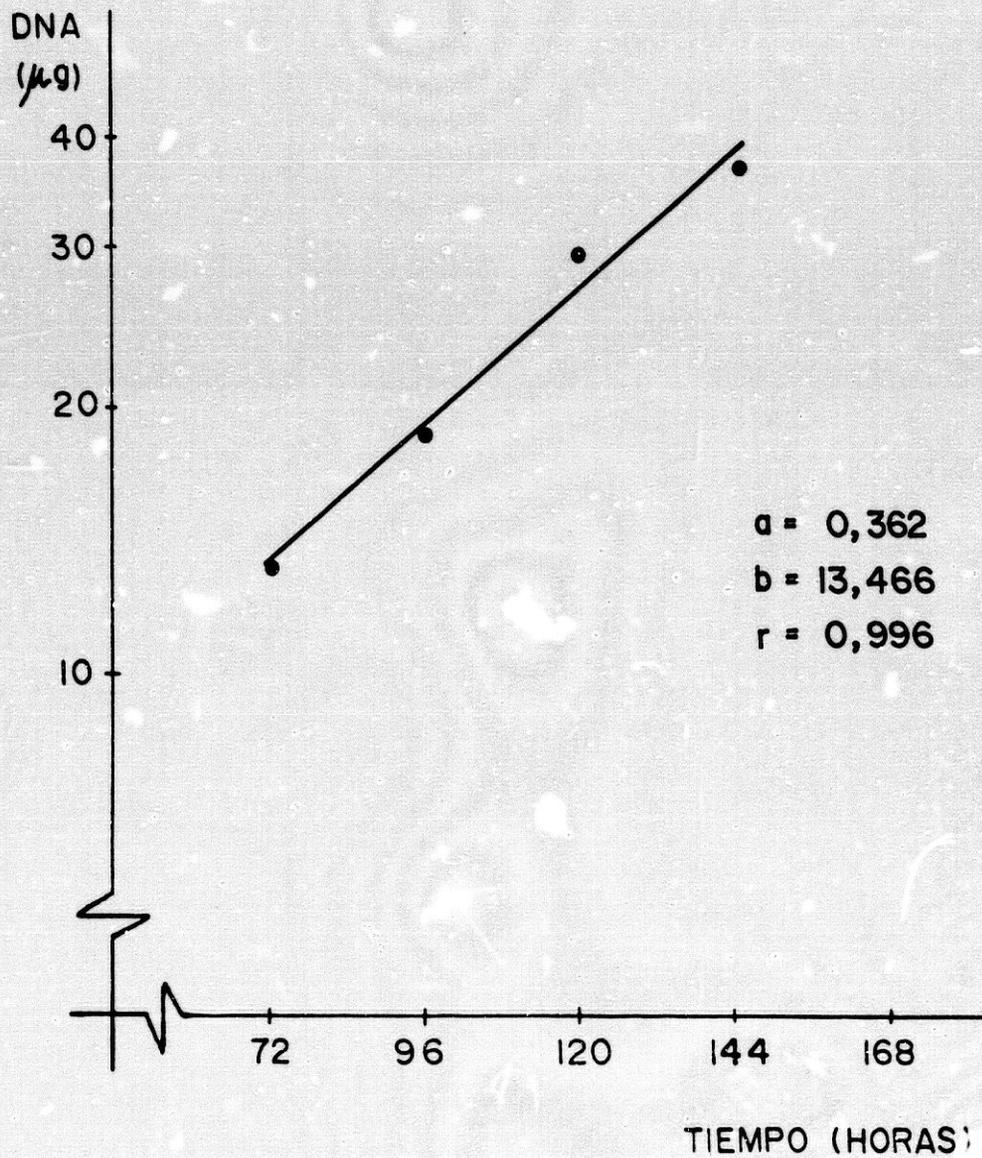


FIG.- 4.19.

Los resultados de este experimento, realizado, por otra parte, cuando las células del cultivo se encuentran en situación preconfluyente, ponen de manifiesto que al término del ensayo, no existen diferencias entre la cuantía de DNA o el número de células pertenecientes a cada grupo. Los valores que caracterizan la cinética de proliferación (Tabla IV-20) demuestran, concluyentemente, la afirmación anterior.

Sin embargo, cuando se analizan los datos de crecimiento celular a las 24 horas del cambio de medio (Figura 4.20) resultan evidentes las diferencias entre los grupos FCS y FCS_o. Este hecho pone nuevamente de manifiesto el efecto del estradiol endógeno como agente promotor del crecimiento celular. De igual forma, tanto en los grupos FCS como en los grupos FCS_o, se intuye la existencia de ligeras diferencias en la cantidad de DNA, cuyo origen puede ser atribuido al estímulo mitógeno desencadenado por el EGF. A partir de las primeras 24 horas las diferencias tienden a desaparecer. Este fenómeno puede ser explicado mediante:

- 1) La degradación del EGF (88).

- 2) La secreción por parte de las células existentes en el cultivo de factores TGF (238) que actúan autoestimulando el crecimiento celular (173).

PROLIFERACION DE CELULAS
MCF - 7 SINCRONIZADAS
INFLUENCIA DEL $17\beta E_2$ Y DEL EGF

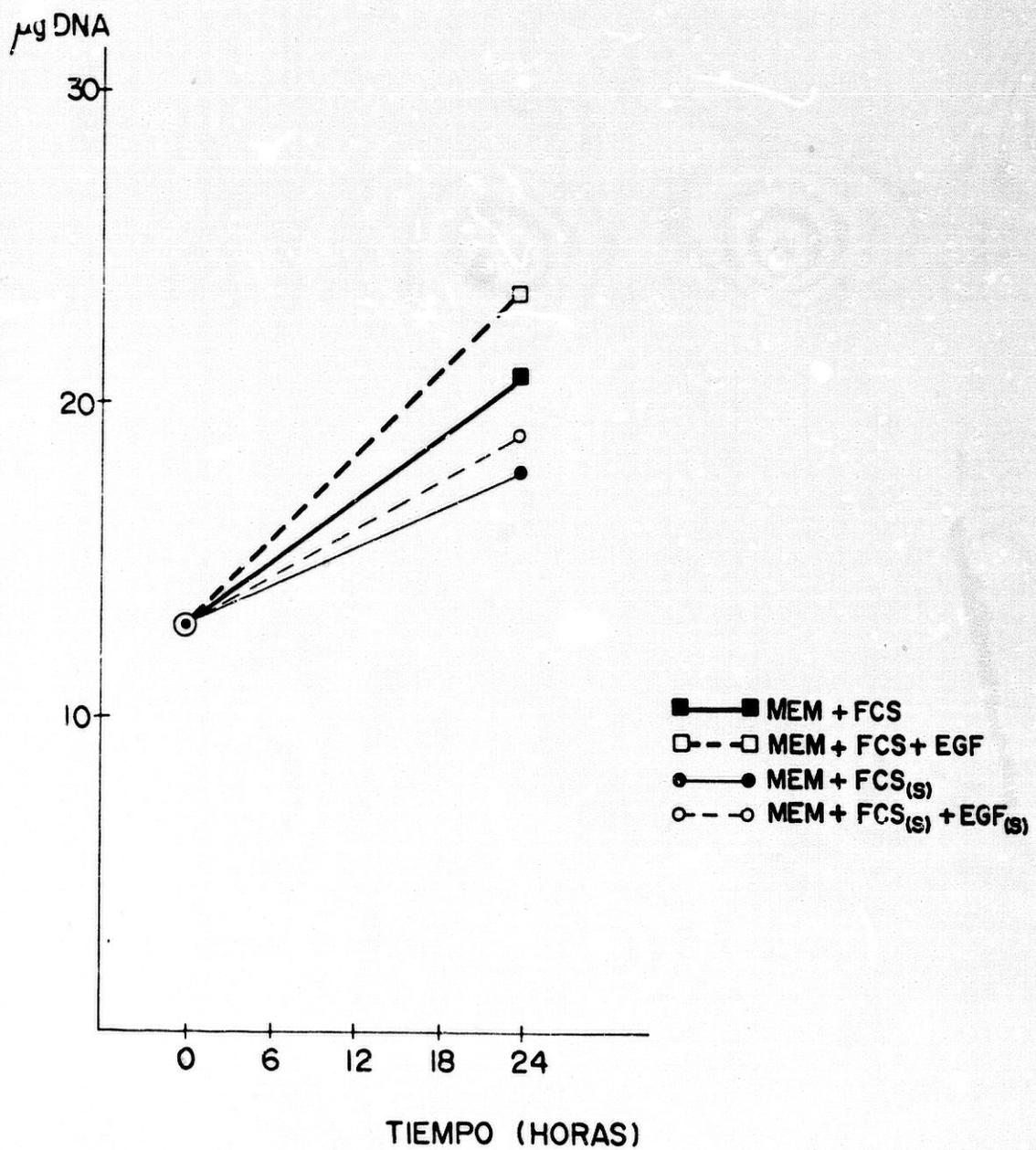


FIG.- 4.20

4.3.5. Efecto del EGF sobre la incorporación de timidina a células MCF-7 parcialmente sincronizadas.

Los efectos del EGF sobre la incorporación de timidina ($^3\text{HTdR}$) a cultivos de células MCF-7 sometidos a sincronización con OH-TAM y rescate con MEM suplementado con 10% de suero de feto de ternera se han estudiado en dos grupos experimentales definidos, como en el caso anterior, por la utilización de suero íntegro (FCS) o tratado con carbón dextrano (FCS_{CD}). Los resultados obtenidos revelan (Figura 4.21) que, tras la eliminación del OH-TAM por 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 alcanza su máximo a las 24 horas. El valor mínimo de incorporación de $^3\text{HTdR}$, 30 horas después del cambio de medio, indica que, en este momento, la mayoría de las células han finalizado la fase de síntesis de DNA y se encuentran en tránsito por G₂-M.

Si ordenamos los grupos experimentales de acuerdo con el dato de incorporación de timidina a las 24 horas del rescate, los resultados obtenidos:

INCORPORACION DE TIMIDINA EN
 CELULAS MCF - 7 SINCRONIZADAS
 INFLUENCIA DEL $17\beta E_2$ Y DEL EGF

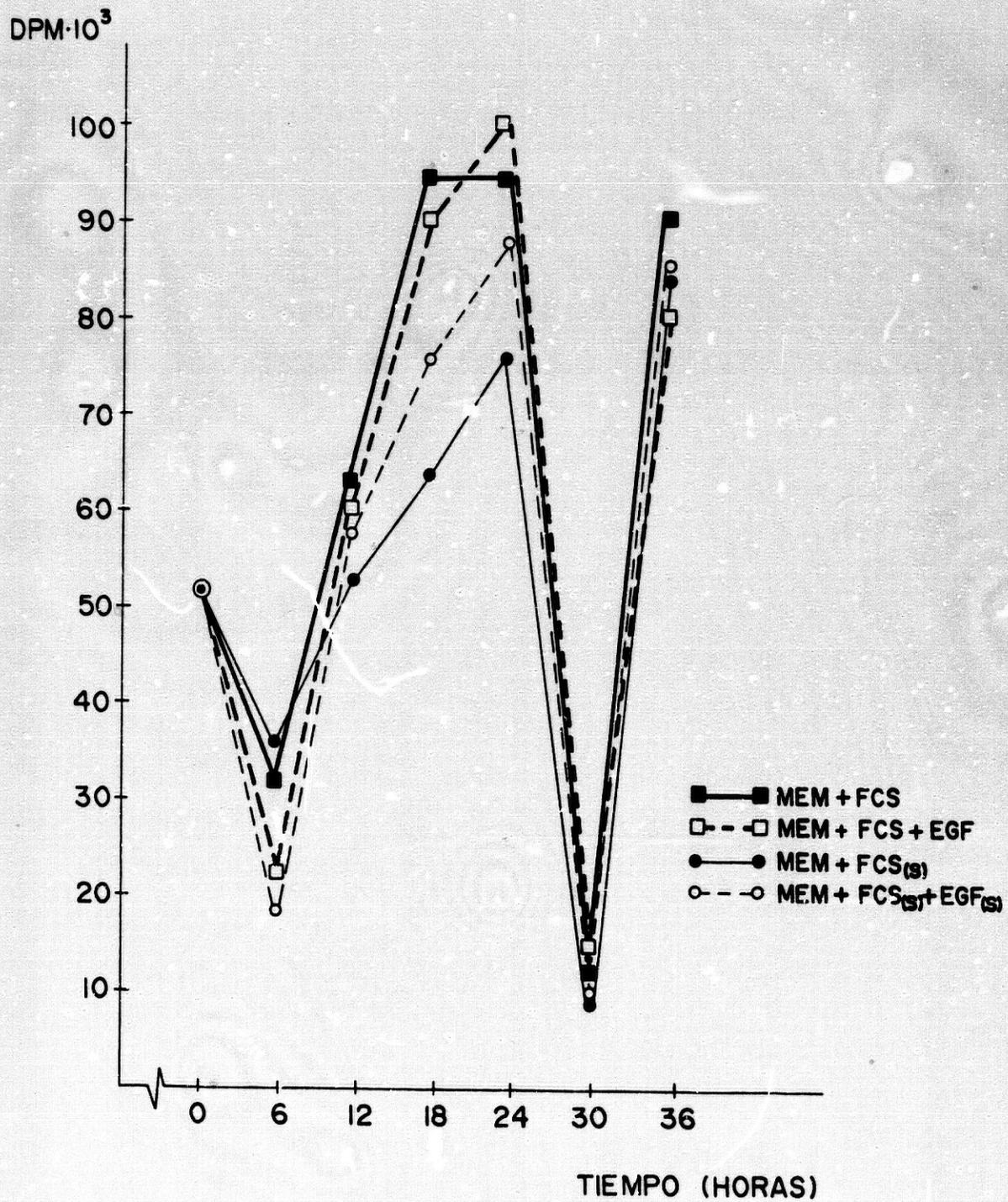


FIG. - 4.21

Grupo B > Grupo A > Grupo D > Grupo C coinciden, como era lógico esperar, con los precedentes. Ello permite afirmar que el EGF, en las condiciones experimentales de nuestro trabajo, estimula la proliferación de las células MCF-7.

4.3.6. Receptores de estrógenos y progesterona y ciclo celular.

Utilizando el procedimiento de sincronización de células MCF-7 tratadas con hidroxí-tamoxifeno durante 72 horas y sometidas luego a rescate con medio nutriente fresco, hemos determinado la concentración de receptores para estradiol y progesterona presentes en el cultivo en diferentes periodos de tiempo tras el cambio de medio. El ensayo de receptores hormonales se ha efectuado aplicando el método descrito por Olea y col. (208) para células intactas cultivadas en monocapa. Los tiempos elegidos tras la eliminación del OH-TAM han sido los siguientes:

- A) 0 horas: Las células del cultivo se encuentran mayoritariamente (80-85%) en fase G₀-G₁.
- B) 12 horas: La población celular sincronizada se encuentra en fase G₁.
- C) 18 horas: Las células inician la fase de síntesis de DNA.

- D) 24 horas: Las células alcanzan el periodo final de síntesis de DNA.
- E) 30 horas: Las células se encuentran en tránsito por G₂-M.
- F) 36 horas: Se inicia un nuevo periodo presintético (G₁).

Los resultados obtenidos para el enlace establecido entre hormonas y células han sido estudiados haciendo uso de la transformación de Scatchard (244) y aparecen gráficamente representados en las figuras 4.22 a 4.27 para el experimento en el que el rescate se efectuó con MEM + FCS y en las figuras 4.28 a 4.33 para el grupo experimental en el que el rescate se llevó a cabo con MEM + FCS₁₅.

El simple análisis de esas representaciones gráficas permite observar que la concentración intracelular de los receptores de estradiol y de progesterona no permanece constante a lo largo del ciclo mitótico, resultado que se confirma cuando se representa gráficamente el valor de la máxima capacidad de enlace ($B_{max} = 1 \text{ mol}/\mu\text{g DNA}$) en ordenadas, frente al tiempo, en abscisas (Figuras 4.34 y 4.35). En efecto, en el grupo de células cultivadas en suero de feto de ternera íntegro (FCS) la concentración de receptores para estradiol es máxima en el instante en el que se libera a las cé-

RECEPTORES HORMONALES Y CICLO CELULAR

RESCATE: MEM + FCS

TIEMPO DE RESCATE: 0 HORAS

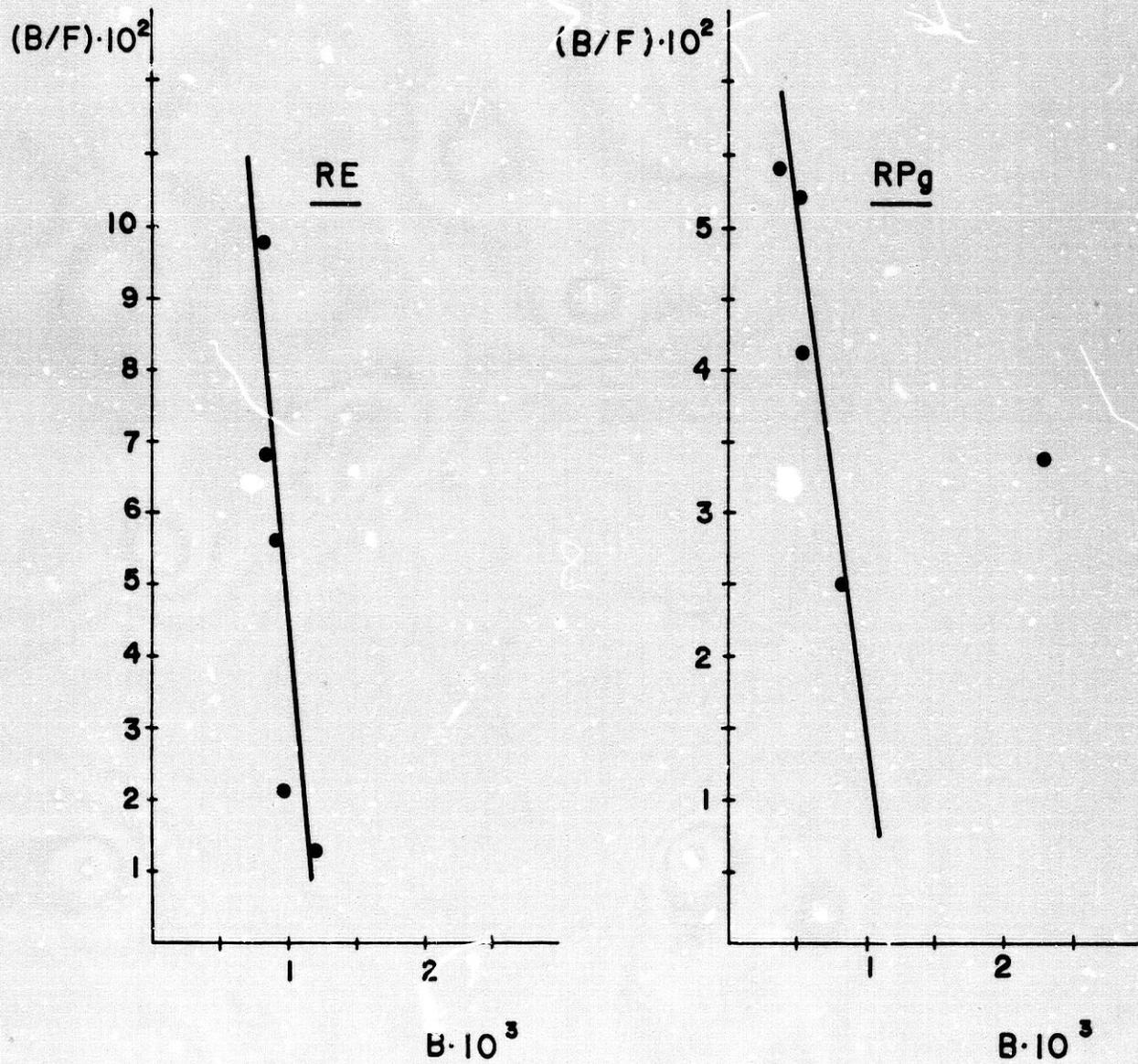


FIG.- 4. 22.

RECEPTORES HORMONALES Y CICLO CELULAR

RESCATE: MEM + FCS

TIEMPO DE RESCATE: 12 HORAS

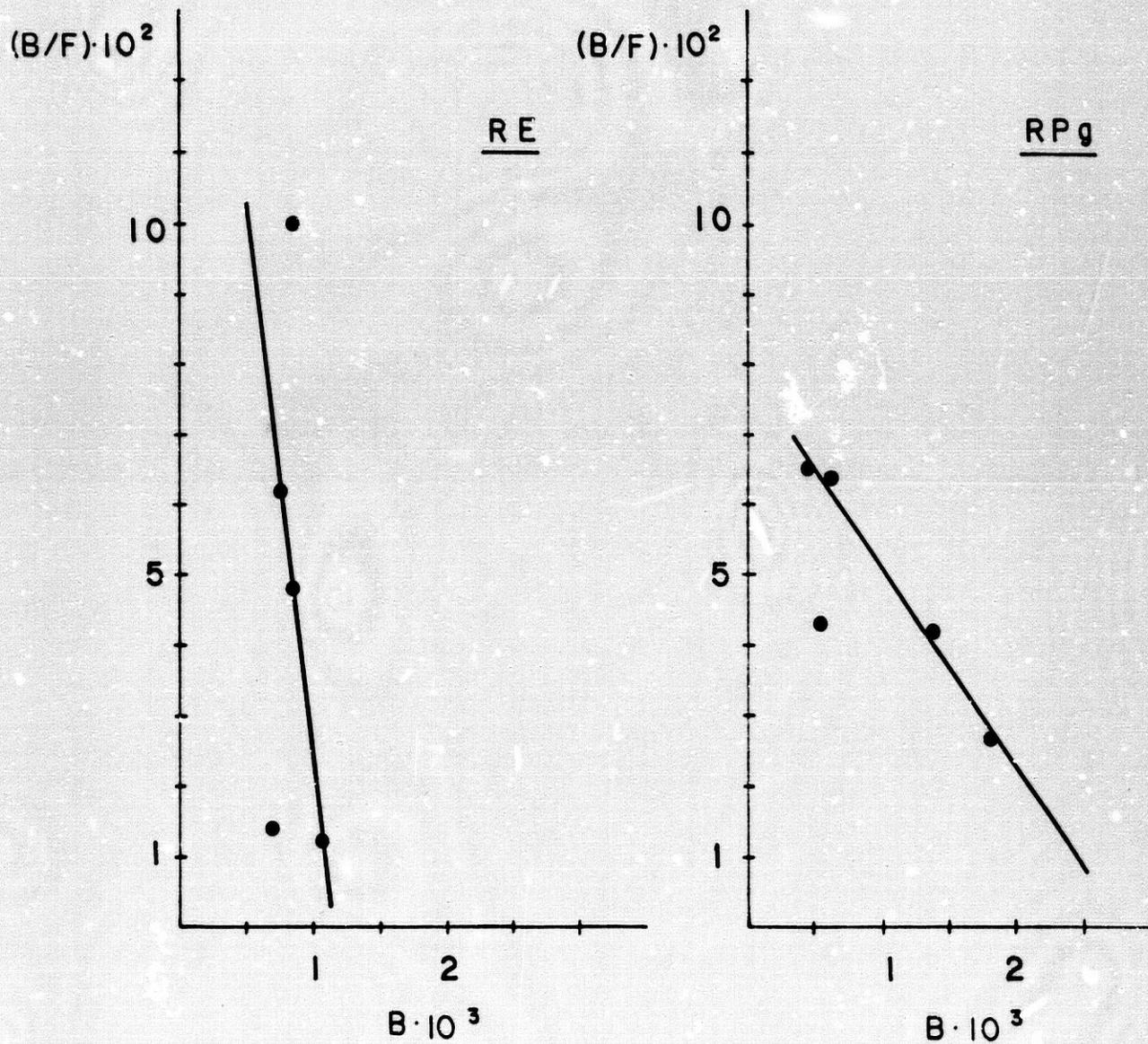


FIG.- 4.23.

RECEPTORES HORMONALES Y CICLO CELULAR

RESCATE: MEM + FCS

TIEMPO DE RESCATE: 18 HORAS

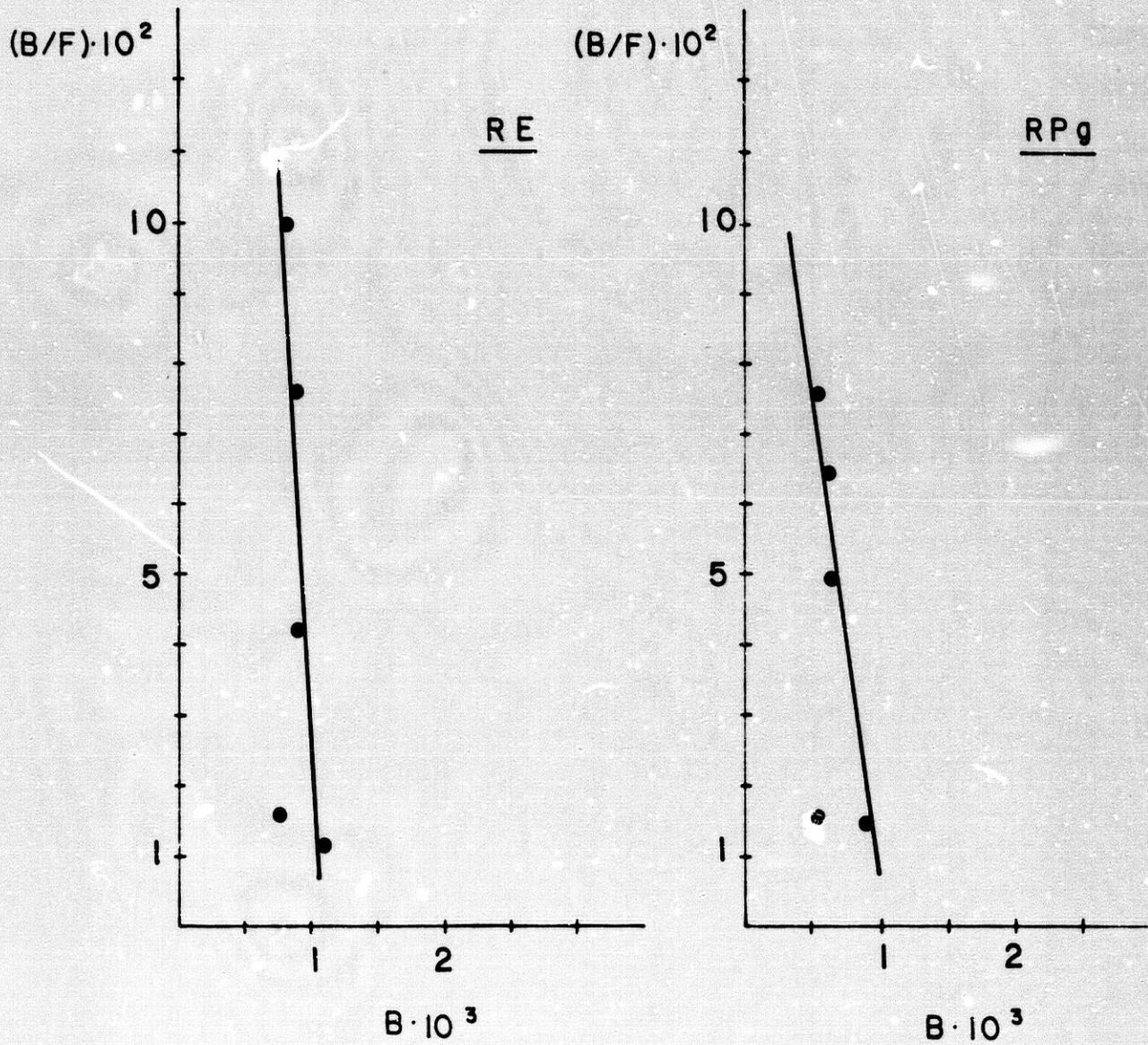


FIG.- 4.24.

RECEPTORES HORMONALES Y CICLO CELULAR

RESCATE: MEM + FCS

TIEMPO DE RESCATE: 24 HORAS

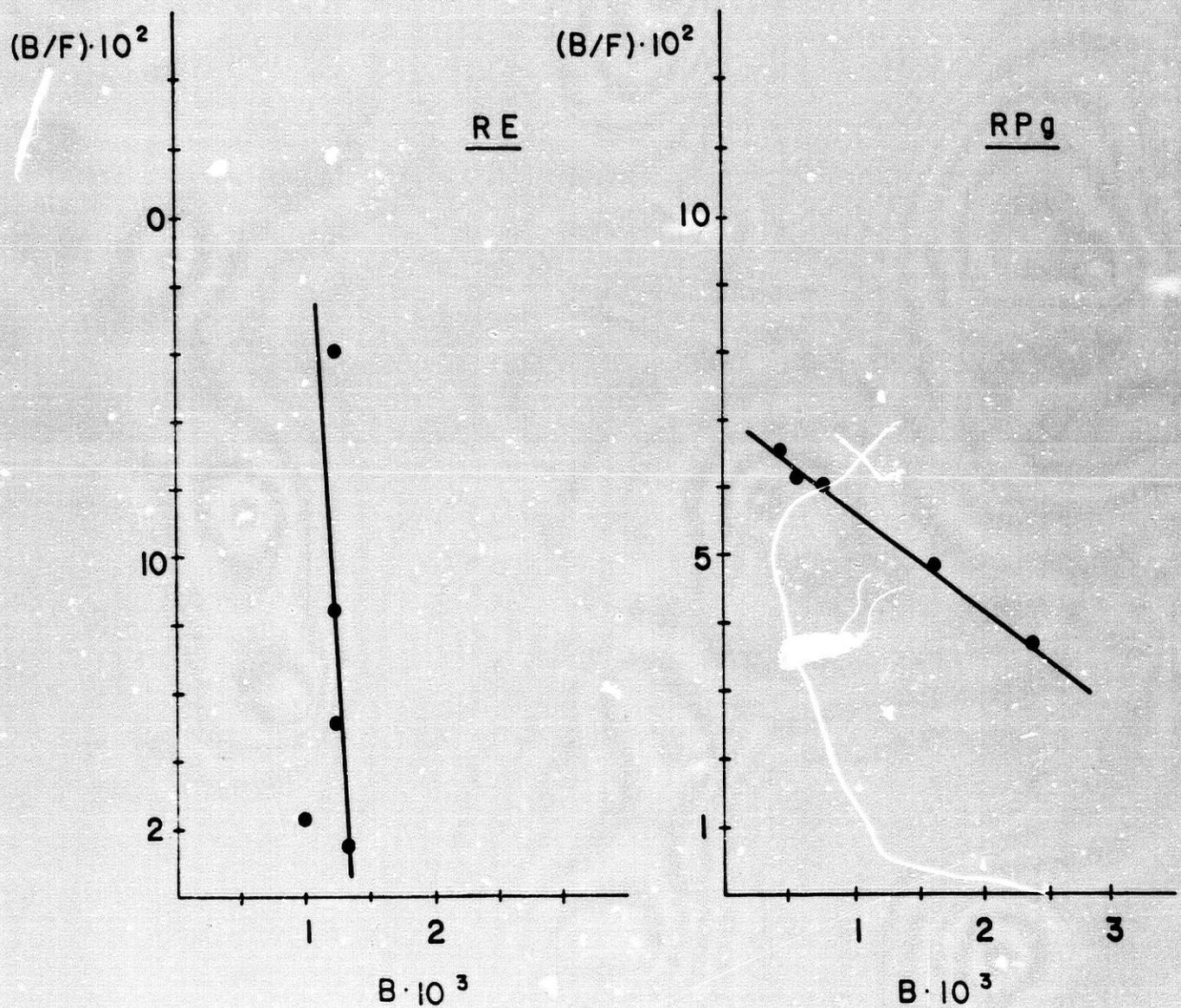


FIG.- 4.25.

RECEPTORES HORMONALES Y CICLO CELULAR

RESCATE: MEM + FCS

TIEMPO DE RESCATE: 30 HORAS

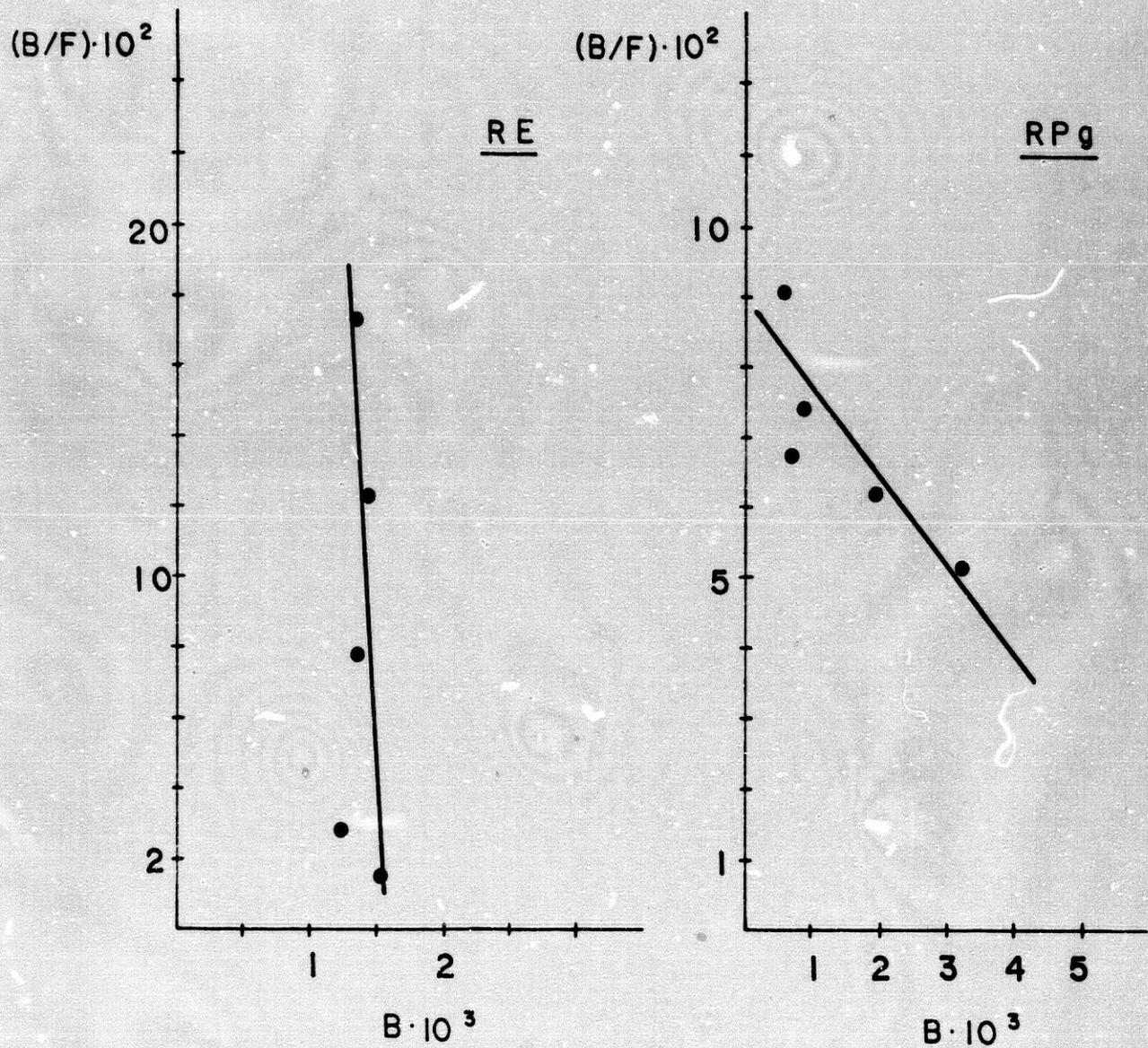


FIG.- 4.26.

RECEPTORES HORMONALES Y CICLO CELULAR

RESCATE: MEN + FCS

TIEMPO DE RESCATE: 36 HORAS

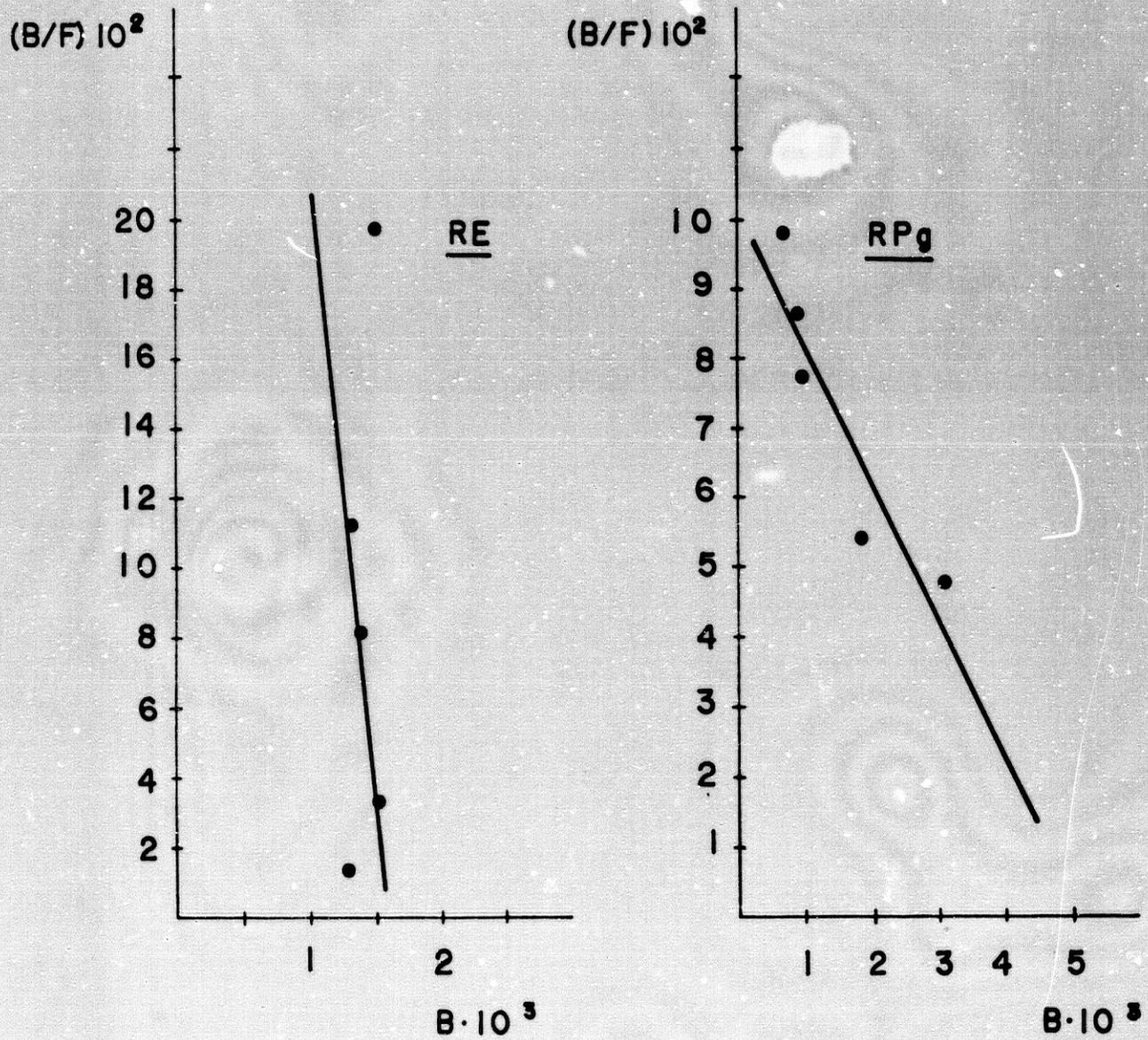


FIG. - 4.27.

RECEPTORES HORMONALES Y CICLO CELULAR

RESCATE: MEM + FCS (s)

TIEMPO DE RESCATE: 0 HORAS

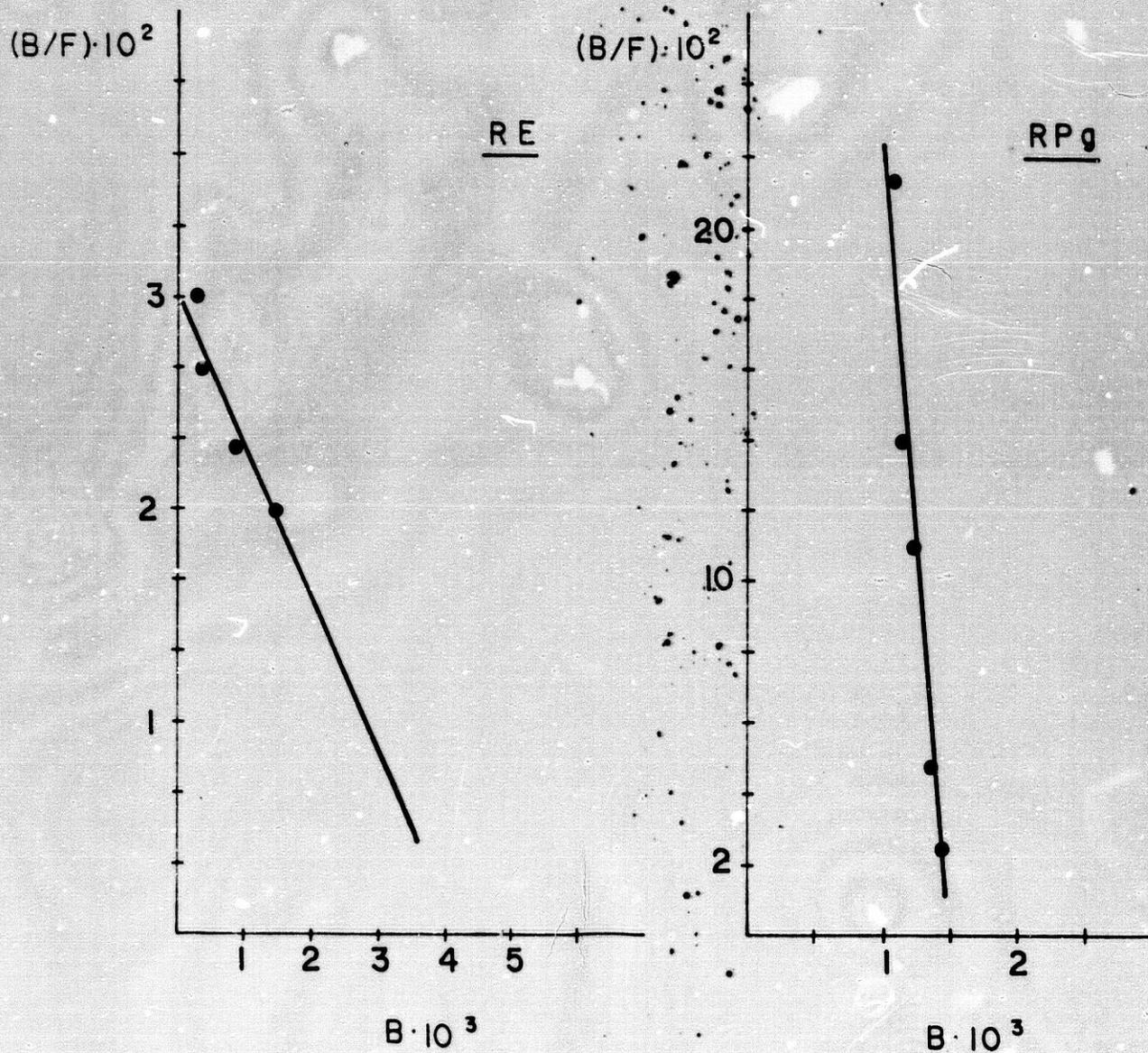


FIG.- 4.28.

RECEPTORES HORMONALES Y CICLO CELULAR

RESCATE: MEN + FCS (s)

TIEMPO DE RESCATE: 12 HORAS

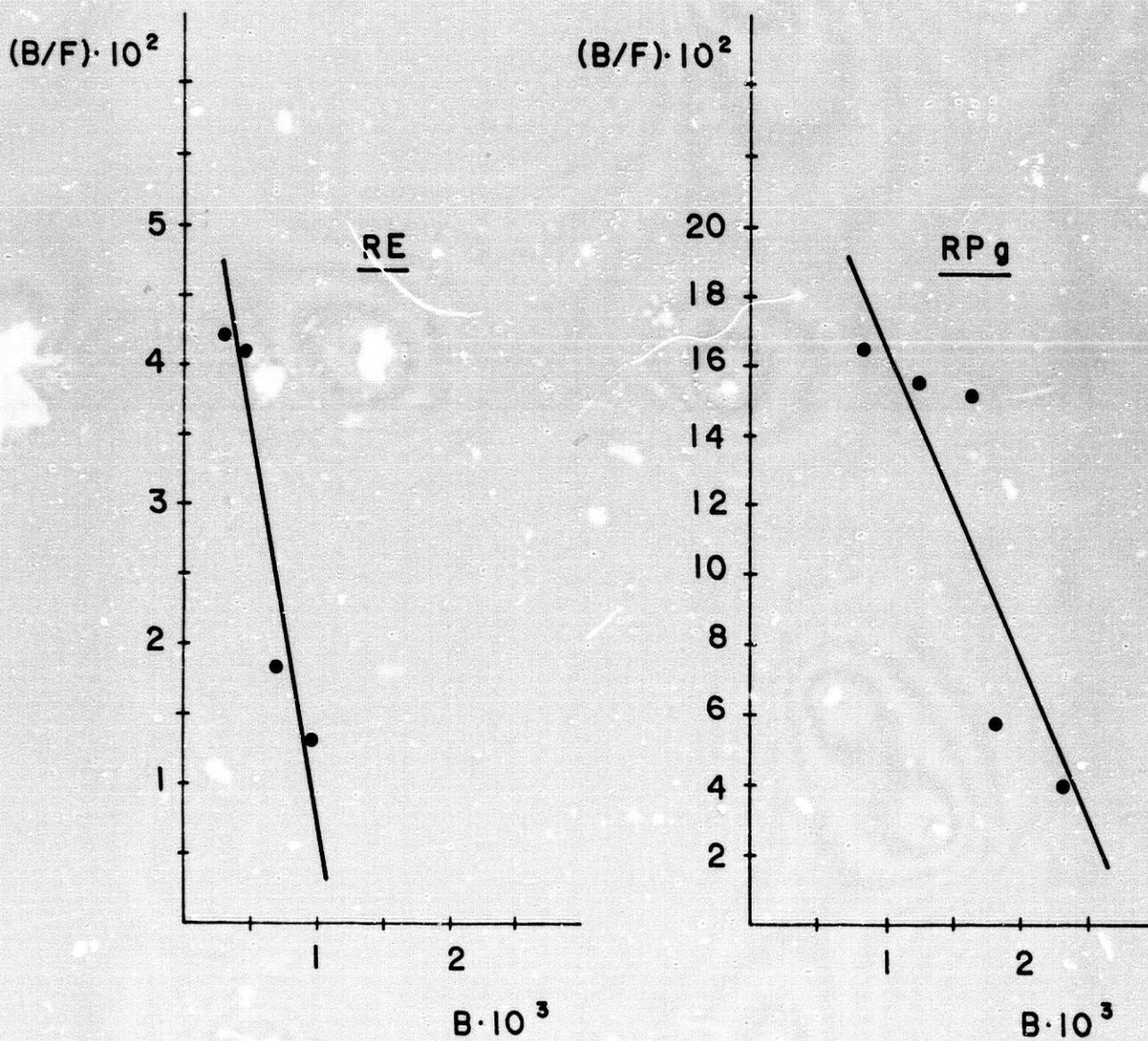


FIG. 4.29.

RECEPTORES HORMONALES Y CICLO CELULAR

RESCATE: MEIM + FCS (s)

TIEMPO DE RESCATE: 18 HORAS

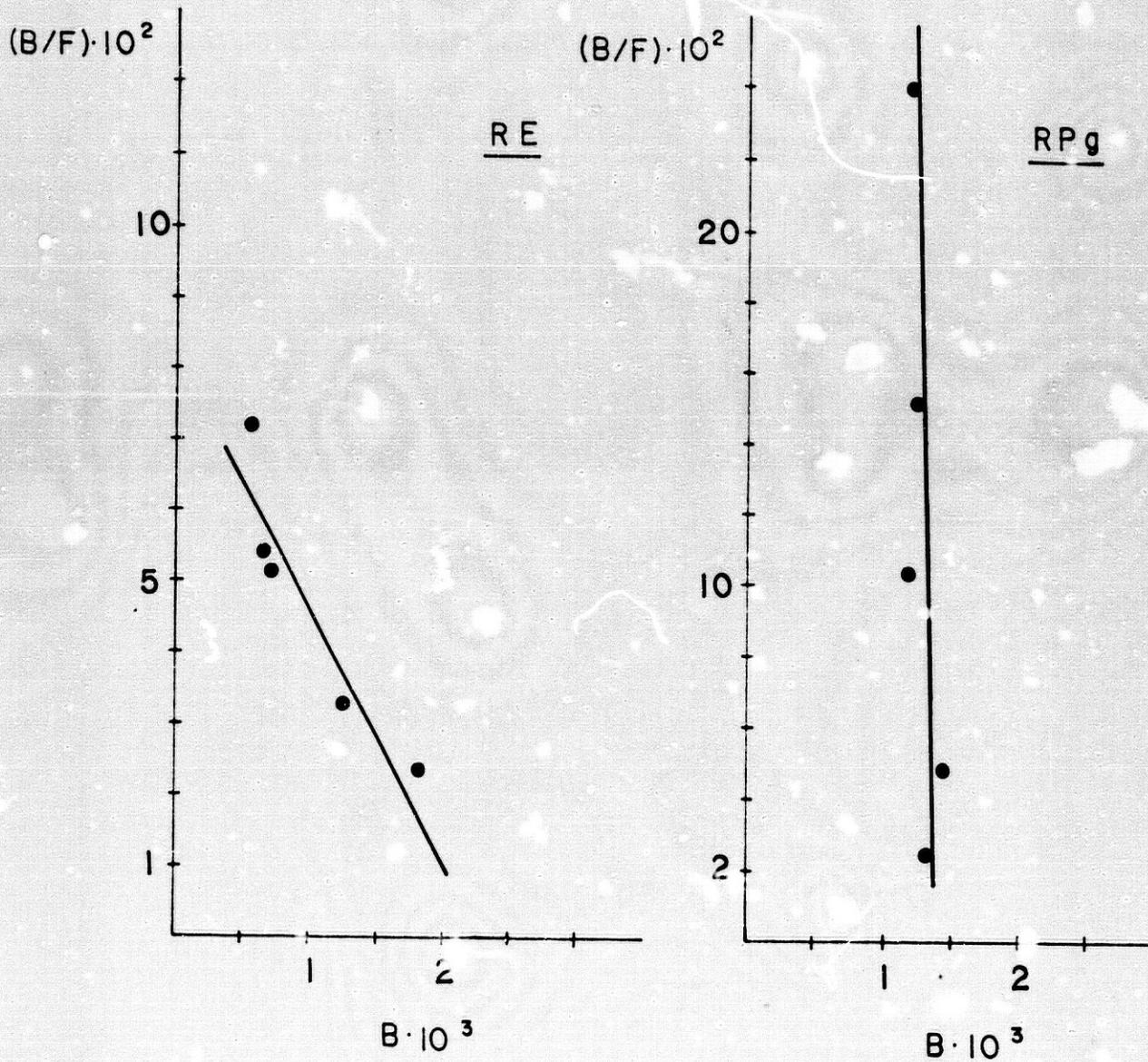


FIG.- 4.30.

RECEPTORES HORMONALES Y CICLO CELULAR

RESCATE: MEM + FCS (s)

TIEMPO DE RESCATE: 24 HORAS

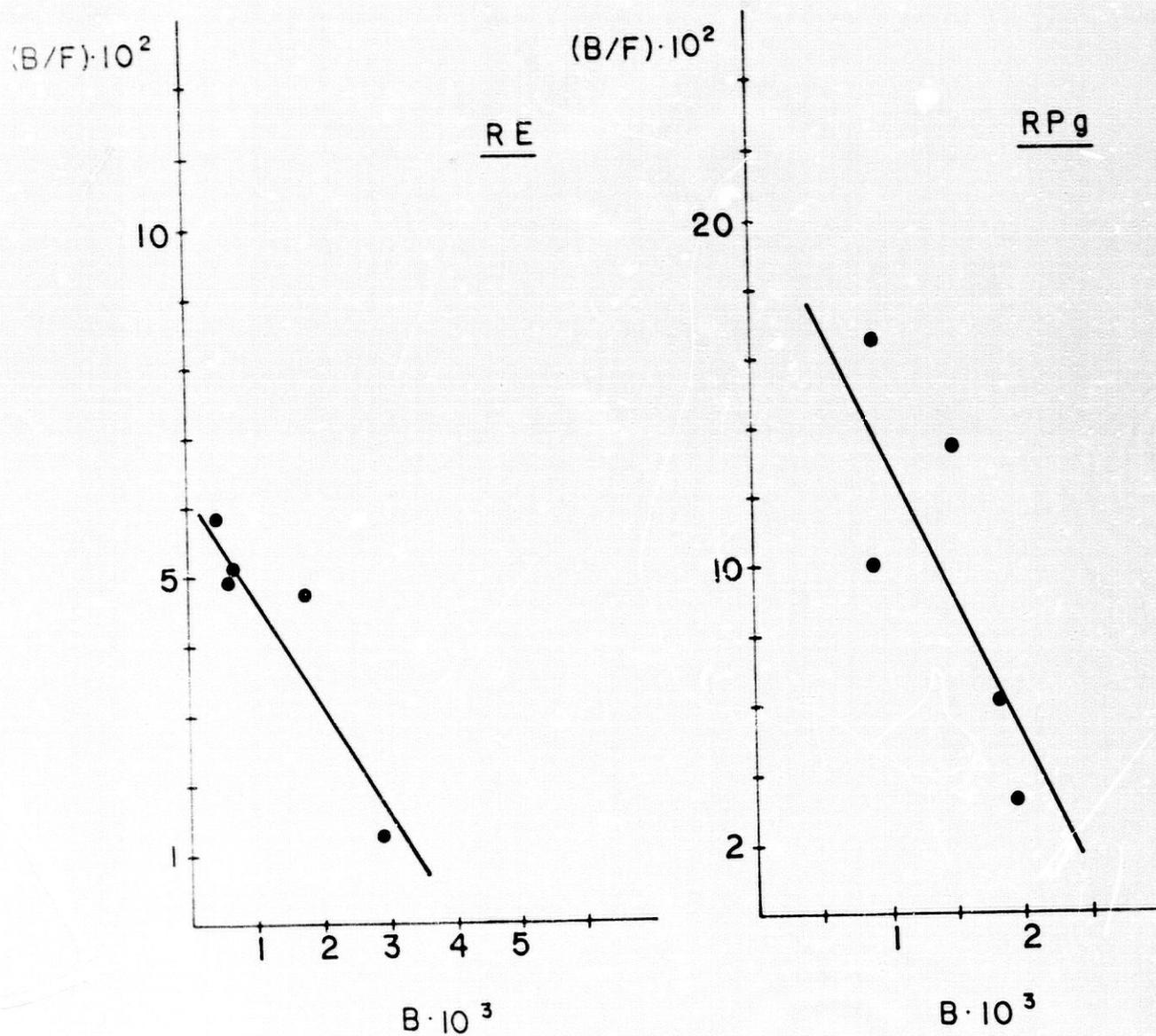


FIG.- 4.31

RECEPTORES HORMONALES Y CICLO CELULAR

RESCATE: MEM + FCS (s)

TIEMPO DE RESCATE: 30 HORAS

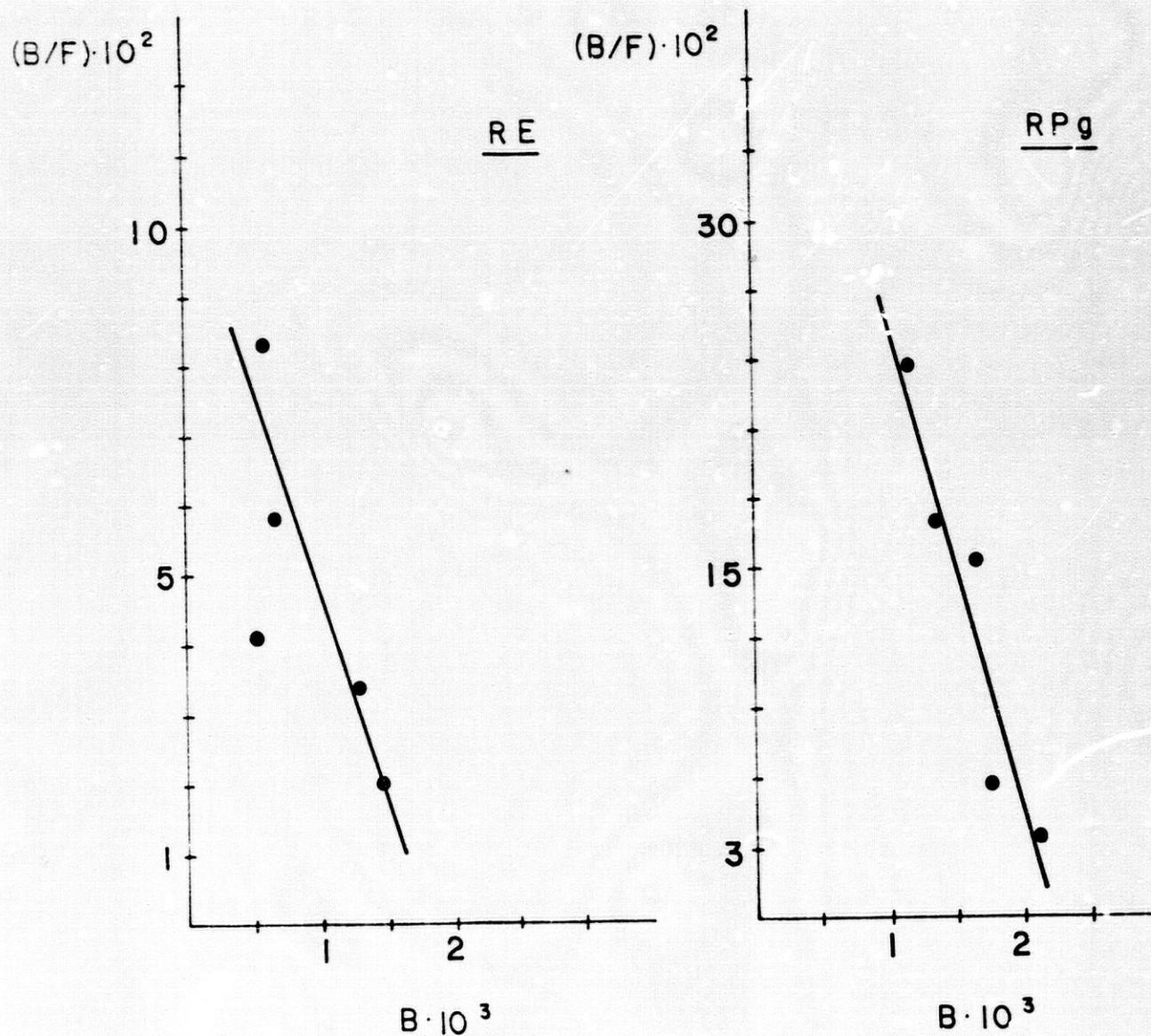


FIG.- 4.32

RECEPTORES HORMONALES Y CICLO CELULAR

RESCATE: MEM + FCS(s)

TIEMPO DE RESCATE: 36 HORAS

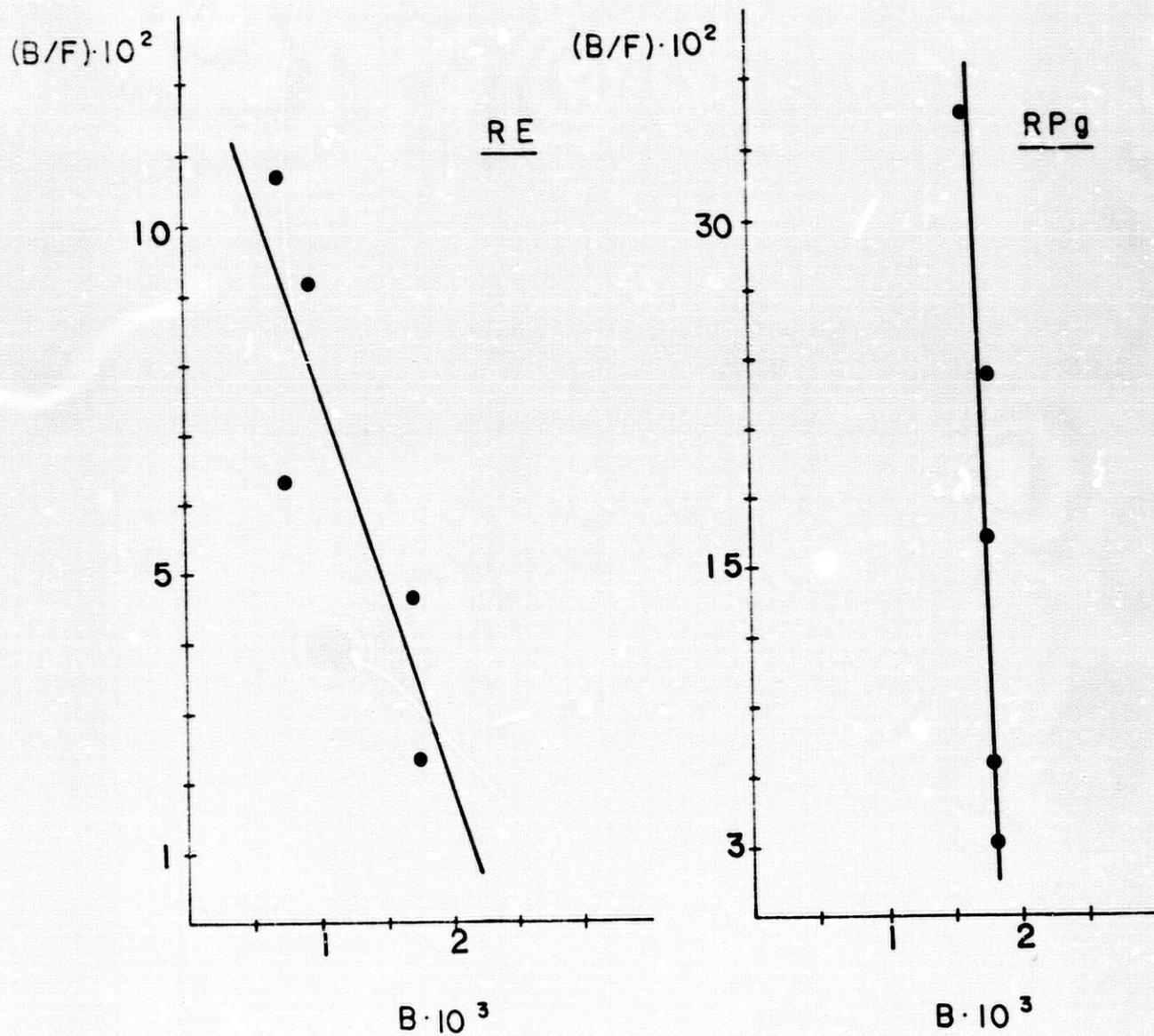


FIG.- 4.33.

EVOLUCION DE LOS NIVELES DE RECEPTORES
HORMONALES EN CULTIVOS DE CELULAS
MCF - 7 SINCRONIZADAS

RESCATE: MEM + FCS

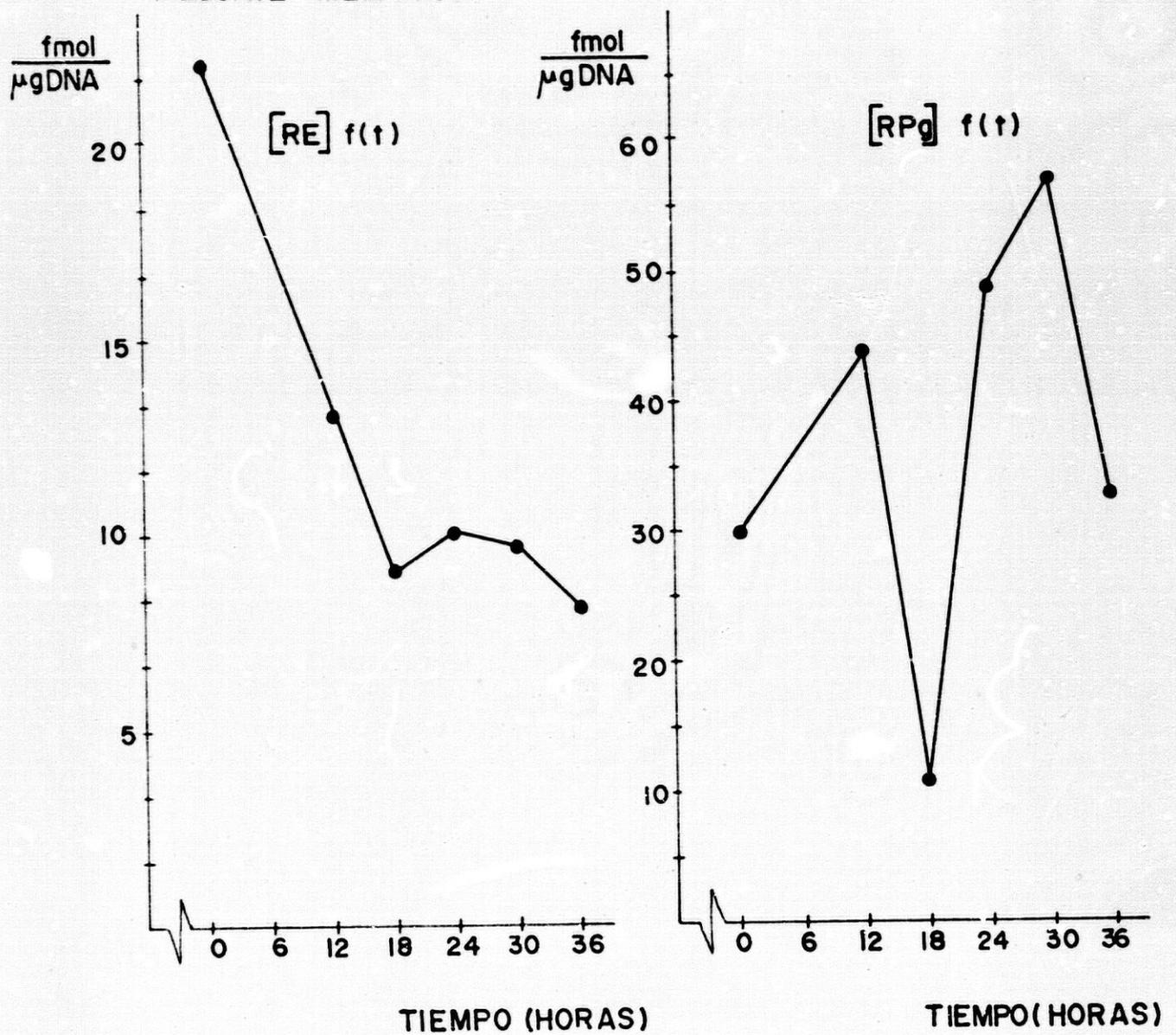


FIG - 4.34

EVOLUCION DE LOS NIVELES DE RECEPTORES
HORMONALES EN CULTIVOS DE CELULAS
MCF - 7 SINCRONIZADAS

RESCATE: MEM + FCS(s)

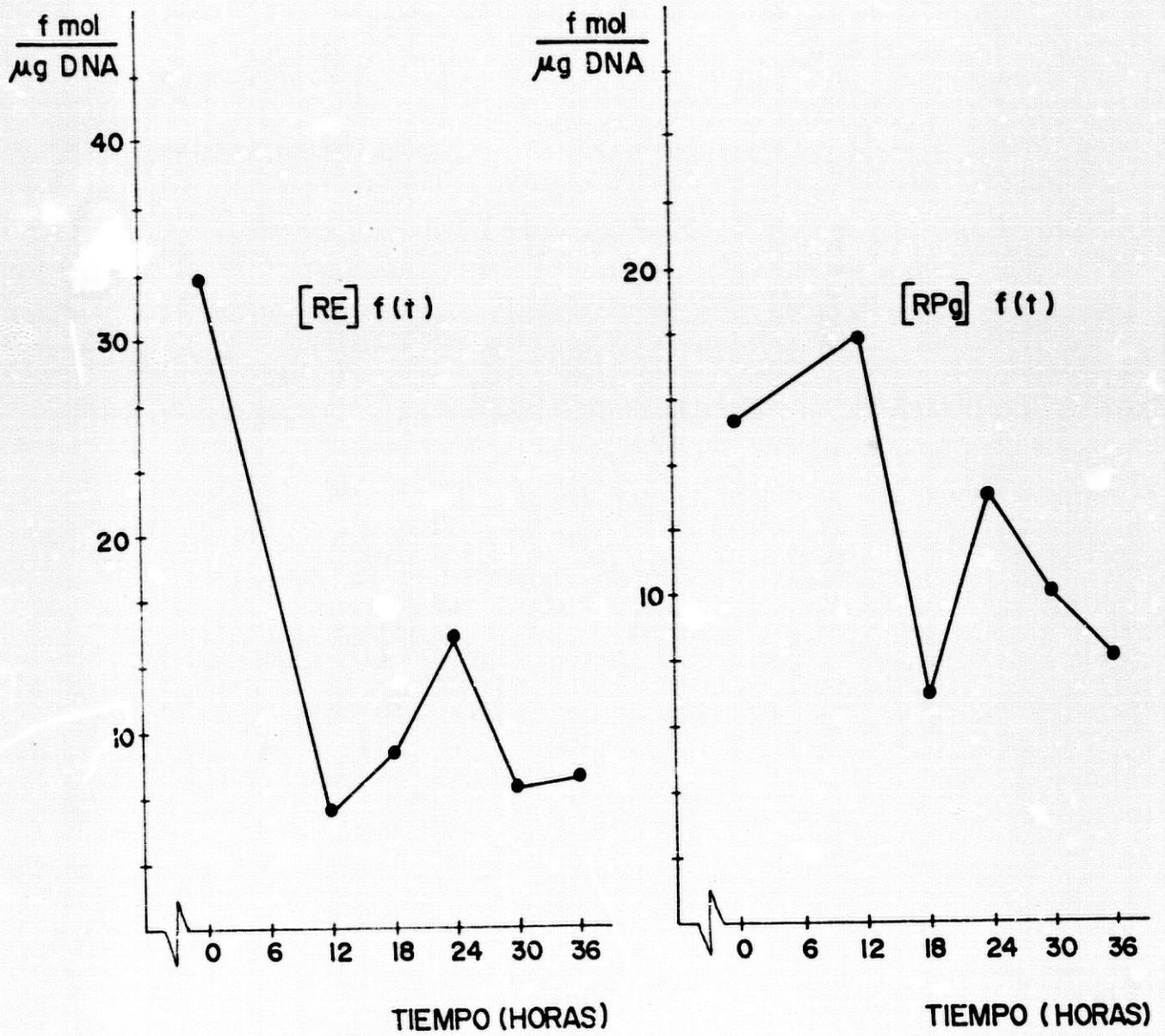


FIG.- 4.35.

lulas del antiestrogeno, esto es, cuando la mayoría de los elementos celulares están en fase G_0-G_1 y su cinética de proliferación es muy lenta. Se puede suponer, en esta situación, que en el cultivo existe una alta proporción de elementos quiescentes. Cuando las células entran en el ciclo mitótico, los niveles de receptores de estrógenos caen muy rápidamente hasta alcanzar un mínimo que, en nuestro ensayo, se sitúa en torno a las 18 horas del rescate. Este hecho podría indicar que la entrada de los elementos celulares al ciclo divisorio exige del "consumo" de la molécula receptora y que esta molécula se acumula en el interior de la célula cuando la fase G_1 resulta bloqueada o entecida por el tamoxifeno. Cuando las células entran en síntesis (18 a 24 horas tras el cambio de medio), los niveles de receptor crecen ligeramente observándose un nuevo descenso entre las 30 y las 36 horas cuando se inicia de nuevo el ciclo mitótico.

Cuando se analizan los resultados obtenidos en el experimento llevado a cabo con FCS, aunque la forma de la curva $[RE]/f(t)$ (Figura 4.35) resulta similar a la comentada anteriormente, llama la atención la mayor altura del pico observado a las 24 horas del rescate. En efecto, tras el "consumo" del RE en los procesos metabólicos que conducen a la célula a la fase de síntesis, se observa un ascenso claro de la concentra-

ción intracelular del mismo que alcanza un máximo al final de S. Durante G₂-M se observa una nueva disminución del nivel de receptor. Entre un experimento y otro hay una diferencia fundamental: El tratamiento del FCS con carbón dextrano que elimina, prácticamente, la totalidad de los estrógenos existentes en el suero. Las diferencias entre ambas curvas hay que atribuir las, entonces, a la presencia o ausencia de estradiol en el medio de cultivo celular.

Se piensa que el nivel de receptores intracelulares para estrógenos es el factor que regula la sensibilidad de las células a esta hormona (147) y que la alteración del ritmo de síntesis o degradación del receptor puede afectar de manera notoria la respuesta de las células hormonosensibles. Este hallazgo nos permite explicar, sobre una base molecular, la respuesta proliferativa de las células MCF-7 tratadas con OH-TAM, al cambio de medio (175,209,302). En efecto, tras 72 horas de subcultivo en MEM + FCS + OH-TAM 10^{-7} M, se produce en el cultivo una cierta acumulación del receptor quizás por la alteración del ritmo de degradación del mismo. Cuando se elimina el OH-TAM, la tasa de RE por célula es máxima y, en respuesta al estradiol -presente en el FCS o adicionado al medio nutriente (302)- se observa una hiperactividad celular definida por el aumento de la fracción de crecimiento que llega a ser

de hasta el 95% de las células que componen el cultivo (175). En el plano clínico este resultado puede explicar también los hallazgos de Hubay y col. (132), y los del grupo ECOG (210) y NSABP (84) que sugieren que, en enfermas afectas de cáncer de mama, la supresión del tratamiento con tamoxifeno se asocia con un notable incremento de la tasa de recidivas observada.

Por otra parte, se conoce que el receptor de estrógenos se sintetiza y se degrada con rapidez extrema. La velocidad de síntesis, utilizando células MCF-7 como modelo experimental, se ha estimado en torno a 0,3-0,5 pmol/ μ g de DNA \times hora (72) y su vida media biológica, medida en ausencia de estradiol, resulta ser $4,47 \pm 0,26$ horas (72). En presencia de estradiol, la velocidad de degradación del receptor se incrementa reduciéndose el valor calculado para su vida media a $3,00 \pm 0,38$ horas (72).

El predominio de los procesos de degradación sobre los de síntesis, en la primera fase de nuestro experimento, explicaría la forma inicialmente descendente de las curvas obtenidas. Durante el tiempo de duplicación del material genético la relación existente entre velocidad de síntesis y de degradación debe invertirse de manera que el resultado final conduzca a un incremento de los niveles intracelulares del receptor.

Finalmente, durante G₂-M la degradación debe superar a la síntesis. Por ello, los niveles de RE, medidos en esta fase, son inferiores a los observados al término de S.

Las diferencias advertidas en la velocidad de desaparición del RE en presencia y en ausencia de estradiol explican, finalmente, los hallazgos encontrados en nuestro estudio. Recordemos que en presencia de estradiol endógeno es difícilmente observable el máximo de concentración de receptor que caracteriza, en el grupo cultivado en FCS₀, a la fase final de síntesis de DNA. Considerando que ambos procesos, síntesis y degradación del receptor, ocurren simultáneamente en presencia de estradiol, la velocidad de uno y otro fenómeno tienden a igualarse para alcanzar cierto estado de equilibrio capaz de regular la proliferación celular a un nivel de eficacia máxima. En ausencia de la hormona los niveles del receptor crecen -predomina la síntesis- quizás como un intento de la célula para mantener a nivel óptimo su ritmo de crecimiento.

Los datos de observación anteriores permiten, por tanto afirmar que:

1) las células hormonodependientes necesitan del estradiol para alcanzar su máxima velocidad de proliferación.

2) el receptor de estrógenos -proteína intermedia-
ria imprescindible para la acción hormonal y la
expresión de la respuesta celular a ésta- modifica su
nivel de concentración a lo largo del ciclo mitótico,
atendiendo a los requerimientos metabólicos que carac-
terizan cada fase.

3) la concentración del receptor alcanza su valor
máximo en situaciones caracterizadas por una cinética
de proliferación celular lenta y, precisamente, en la
fase del ciclo celular de cuya prolongación se deriva
tal enlentecimiento.

4) el estado de equilibrio entre el receptor y la
hormona efectora puede depender del ritmo de creci-
miento del cultivo.

5) en ausencia de estradiol y en la fase S del
ciclo celular, el estado de equilibrio probablemente
existente entre los procesos de síntesis y degradación
del receptor se resuelve favorablemente a favor de los
primeros.

En apoyo de lo expuesto está la demostración
experimental de la existencia de una relación de pro-
porcionalidad inversa entre la actividad proliferativa
de los cultivos de células MCF-7 y la concentración de
receptores de estrógenos cuantificados sobre los mismos
(133). De nuestros resultados se deduce también que la
entrada de las células al comportamiento proliferativo

Implica la degradación del receptor. Cabe concluir, por tanto, que el receptor de estrógenos es una proteína funcional cuya presencia en los cultivos responde, básicamente, a dos órdenes distintos de factores:

a) El ritmo de crecimiento de las células (a mayor velocidad de proliferación menos cantidad de receptor).

b) La acción de los estrógenos (cuando disminuye la concentración de hormona estrogénica aumenta el nivel intracelular del receptor).

Por otra parte, las modificaciones de la concentración intracelular del receptor de progesterona, tanto en el experimento llevado a cabo en FCS como en el realizado en FCS_(s), muestran notables similitudes. Efectivamente, la entrada de las células al ciclo mitótico se acompaña, en ambos casos, del incremento de los niveles de RPg. Este hecho indica que el RPg se sintetiza durante el periodo que sigue a la liberación de las células del antiestrógeno OH-TAM. El receptor de progesterona debe cumplir su función metabólica en el periodo que antecede a la fase de síntesis de DNA, puesto que, entre las 12 y las 18 horas (fase G₁) y entre las 30 y las 36 horas (nueva fase G₁), se produce un descenso espectacular de su nivel de concentración. La síntesis del RPg predomina en la fase S del ciclo mitótico. En la experiencia realizada con FCS_(s), si bien la forma de la curva es equivalente a la anterior-

mente descrita, el proceso de síntesis de RPg reduce su intensidad, disminución fácilmente explicable por la ausencia de estradiol en el medio de cultivo de las células. Se sabe que el RPg es uno de los productos que resultan de la acción estrogénica (95,128). El fenómeno antes citado no debe parecer, por ello, sorprendente.

4.3.7. Influencia del EGF sobre la evolución de los niveles de receptores de estrógenos y de progesterona en células MCF-7 sincronizadas.

Utilizando un procedimiento experimental semejante al descrito hemos sometido a estudio la influencia del EGF sobre las modificaciones de la concentración intracelular de receptores de estrógenos (RE) y de progesterona (RPg) y su relación con el ciclo mitótico. Las Figuras 4.36 a 4.40 muestran los resultados obtenidos en el experimento realizado empleando FCS como suplemento sérico del MEM y las Figuras 4.41 a 4.45 ofrecen los resultados del estudio en presencia de FCS₀. Las Figuras 4.46 y 4.47 han sido construidas representando la concentración de RE y RPg en femtomol/ μ g de DNA, en ordenadas, frente al tiempo, en abscisas. Como origen de tiempos se ha tomado el correspondiente a la eliminación del antiestrógeno, OH-TAM, por cambio de medio nutriente.

RECEPTORES HORMONALES Y CICLO CELULAR

RESCATE: MEM + FCS + EGF

TIEMPO DE RESCATE: 0 HORAS

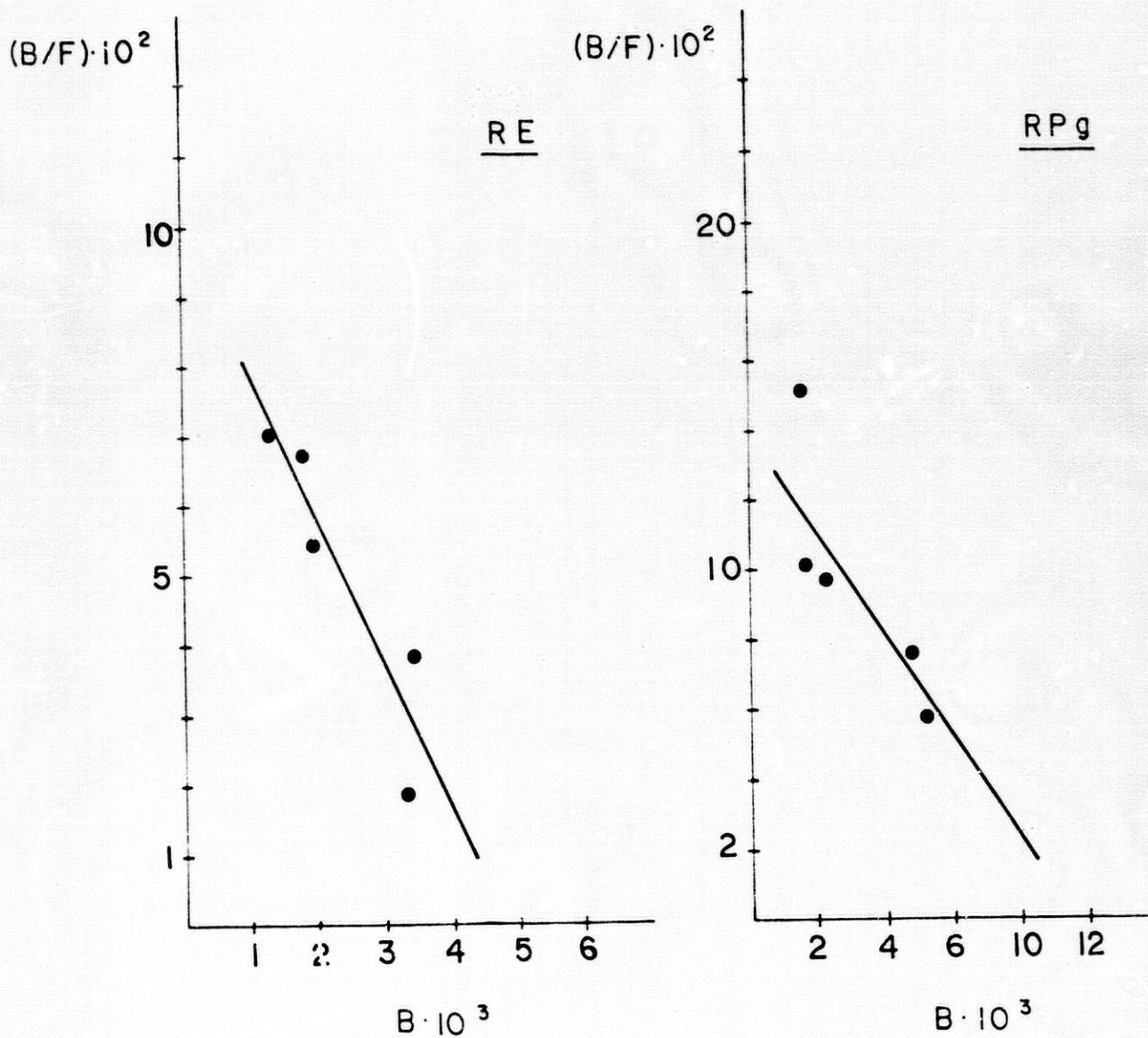


FIG.- 4.36.

RECEPTORES HORMONALES Y CICLO CELULAR

RESCATE: MEM + FCS + EGF

TIEMPO DE RESCATE: 6 HORAS

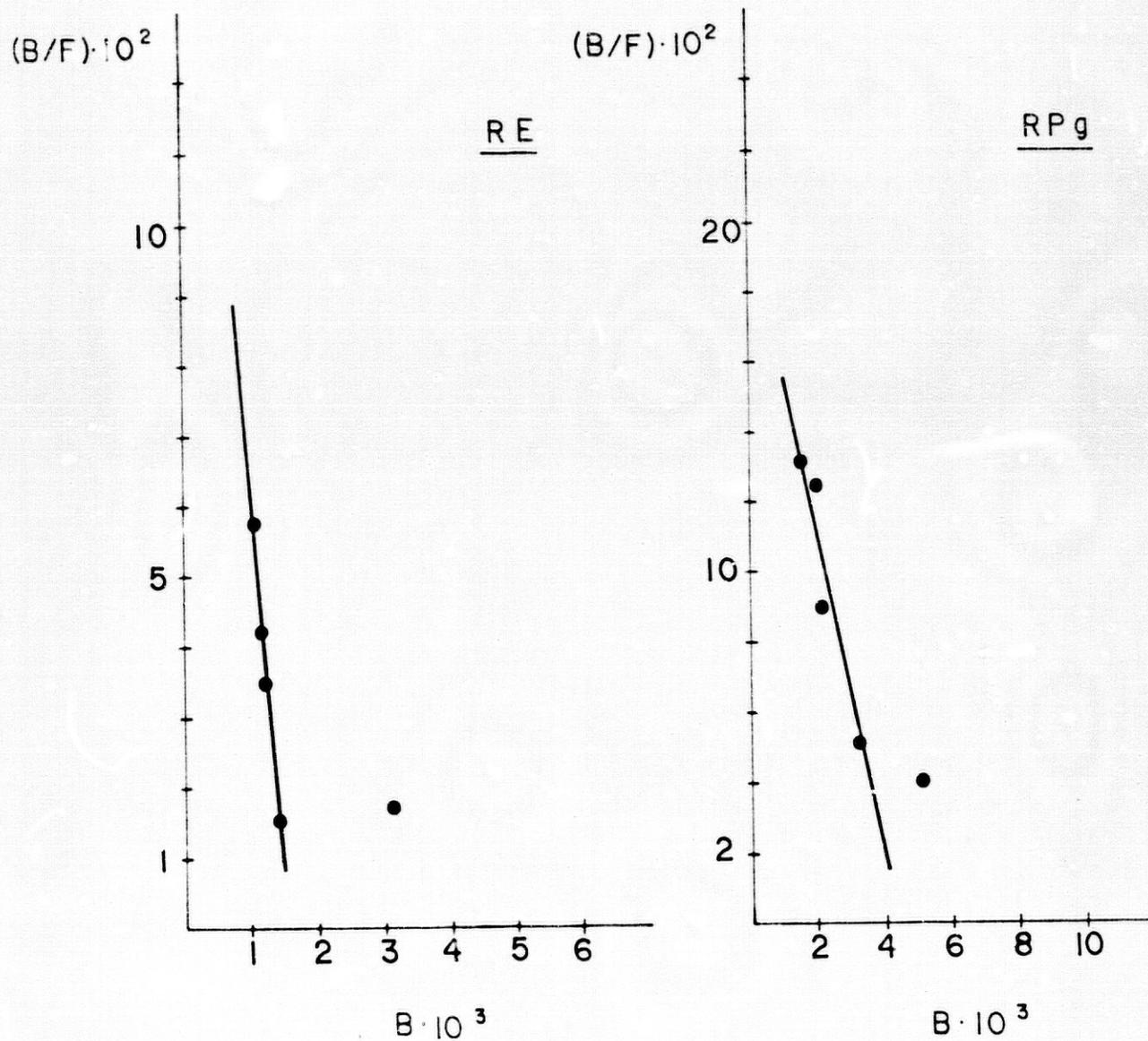


FIG.- 4.37.

RECEPTORES HORMONALES Y CICLO CELULAR

RESCATE: MEM+FCS+EGF

TIEMPO DE RESCATE: 12 HORAS

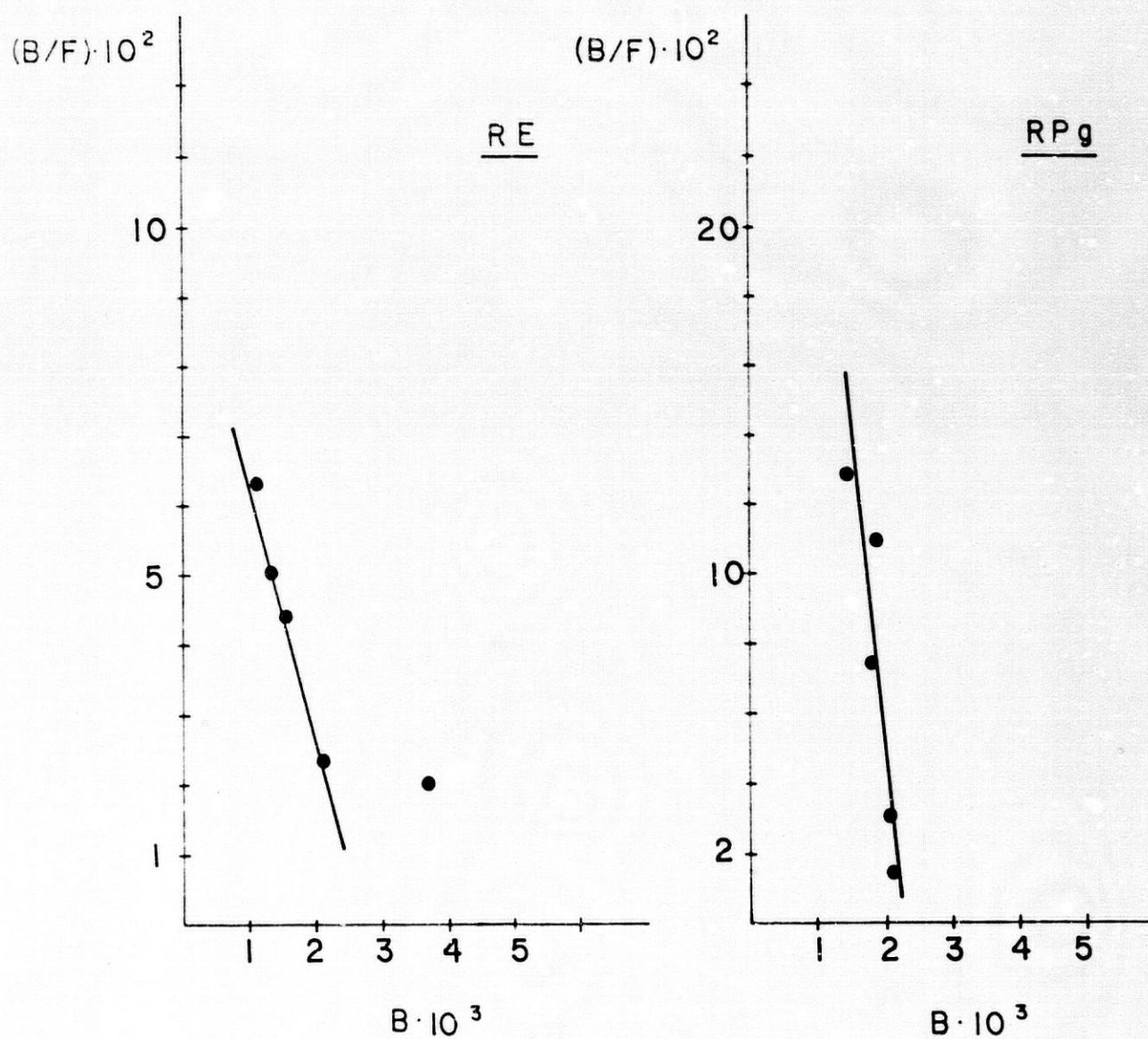


FIG.- 4.38.

RECEPTORES HORMONALES Y CICLO CELULAR

RESCATE: MEM + FCS + EGF

TIEMPO DE RESCATE: 18 HORAS

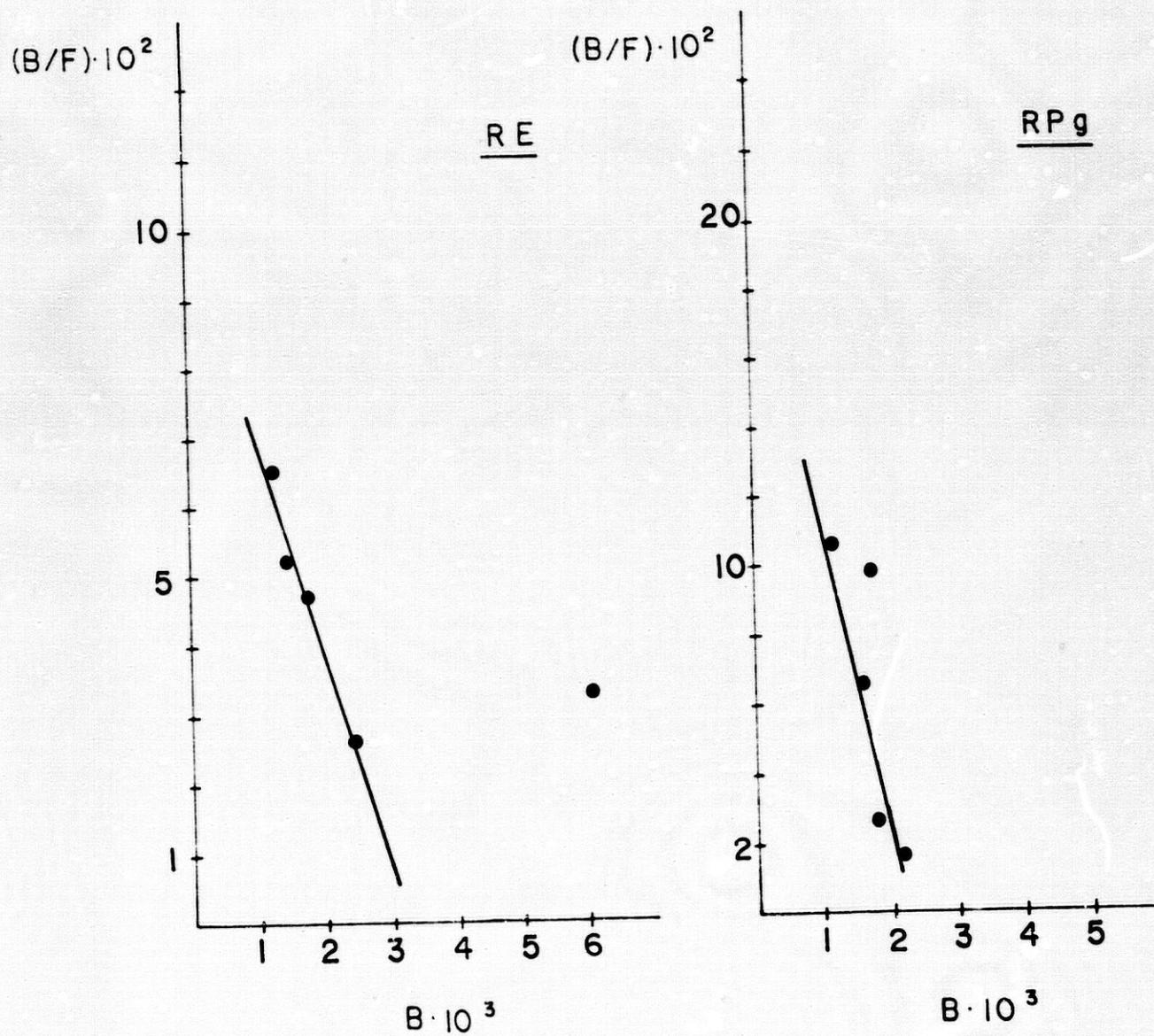


FIG.- 4.39.

RECEPTORES HORMONALES Y CICLO CELULAR

RESCATE: MEM + FCS + EGF

TIEMPO DE RESCATE: 24 HORAS

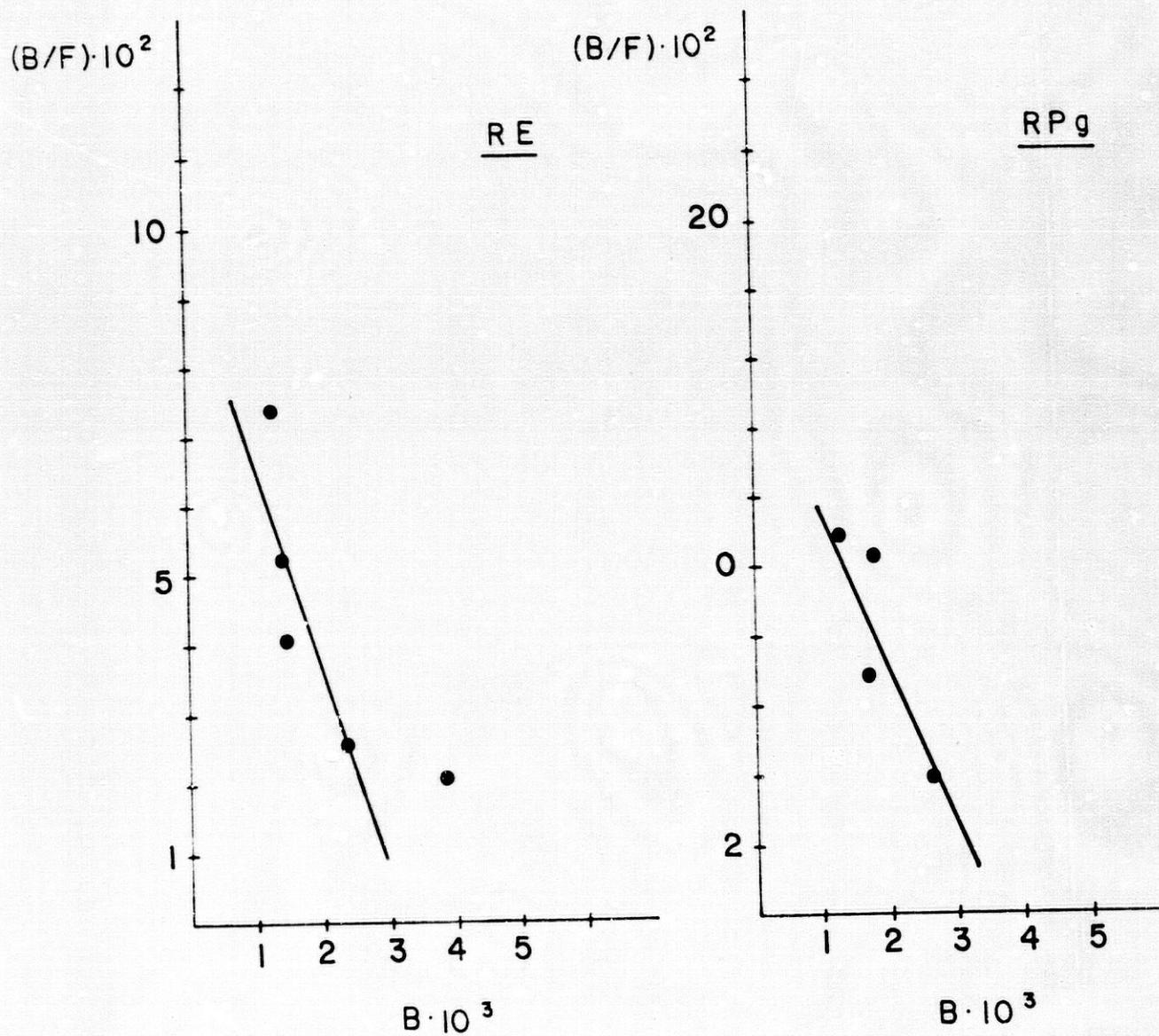


FIG.- 4.40.

RECEPTORES HORMONALES
Y CICLO CELULAR

RESCATE. MEM + FCS(s) + EGF

TIEMPO DE RESCATE: 0 HORAS

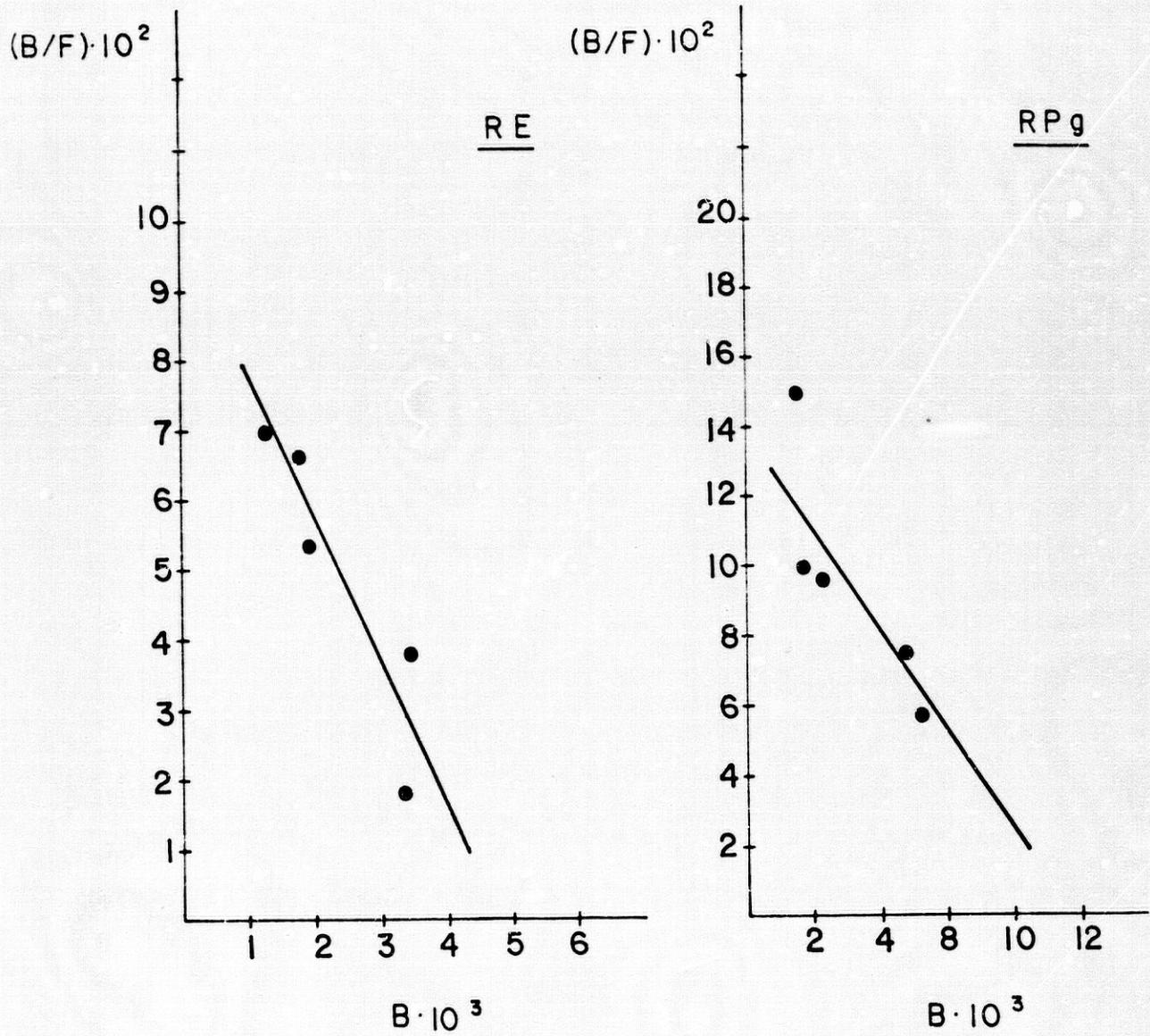


FIG.- 4.41.

RECEPTORES HORMONALES Y CICLO CELULAR

RESCATE: MEM + FCS(s) + EGF

TIEMPO DE RESCATE: 6 HORAS

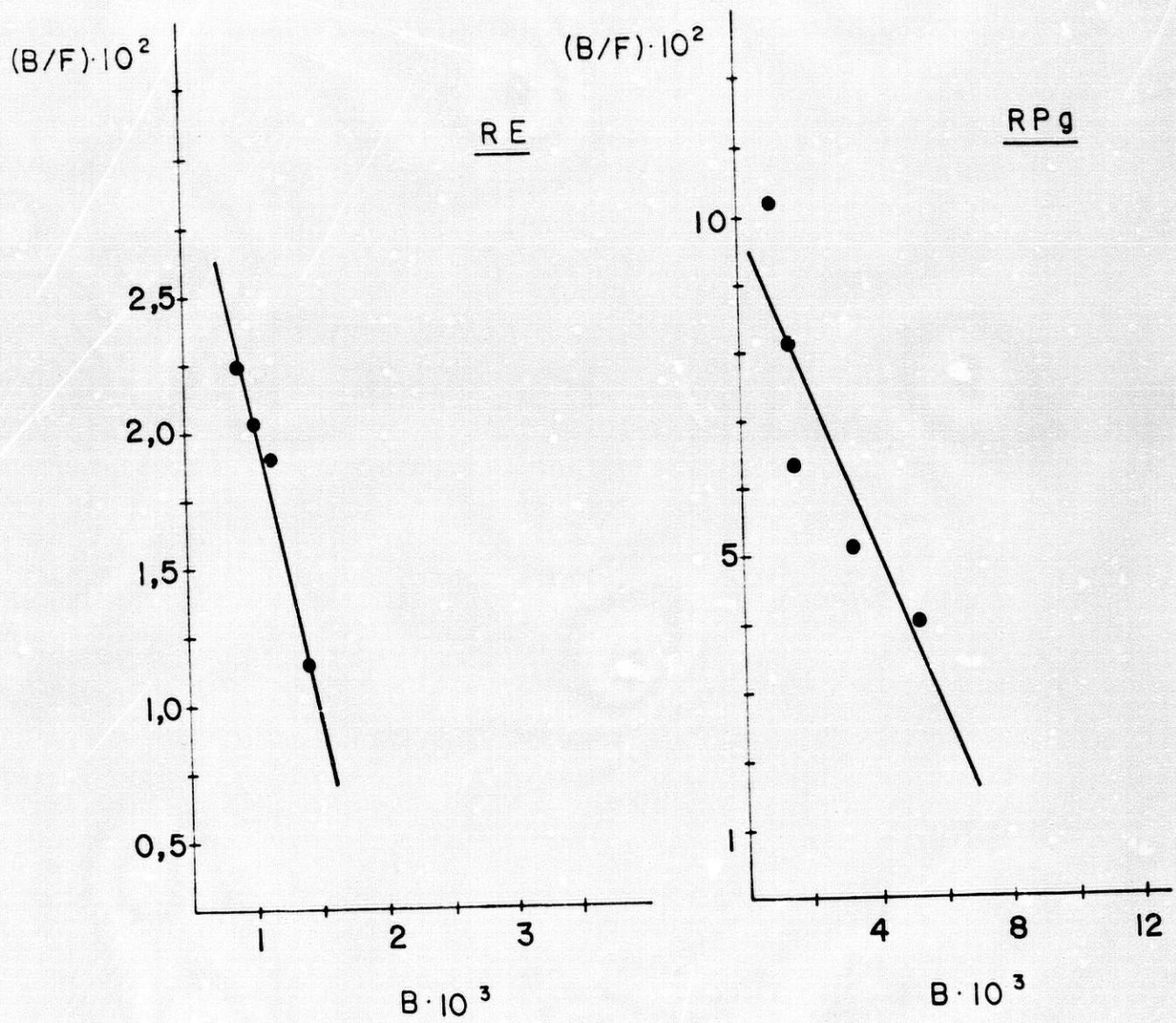


FIG.- 4.42.

RECEPTORES HORMONALES Y CICLO CELULAR

RESCATE: MEM + FCS(s) + EGF

TIEMPO DE RESCATE: 12 HORAS

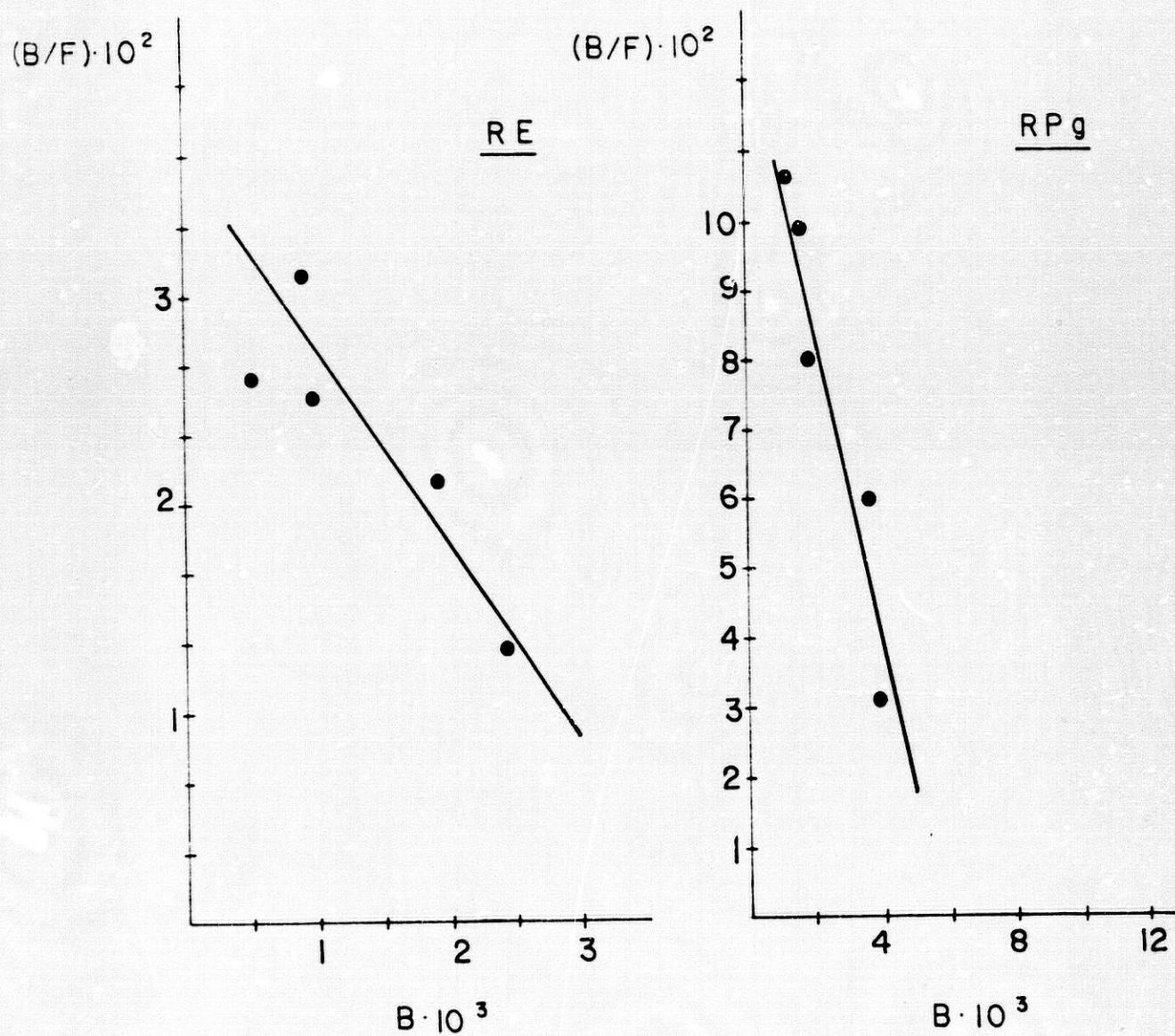


FIG.- 4.43.

RECEPTORES HORMONALES Y CICLO CELULAR

RESCATE: MEM + FCS(s) + EGF

TIEMPO DE RESCATE: 18 HORAS

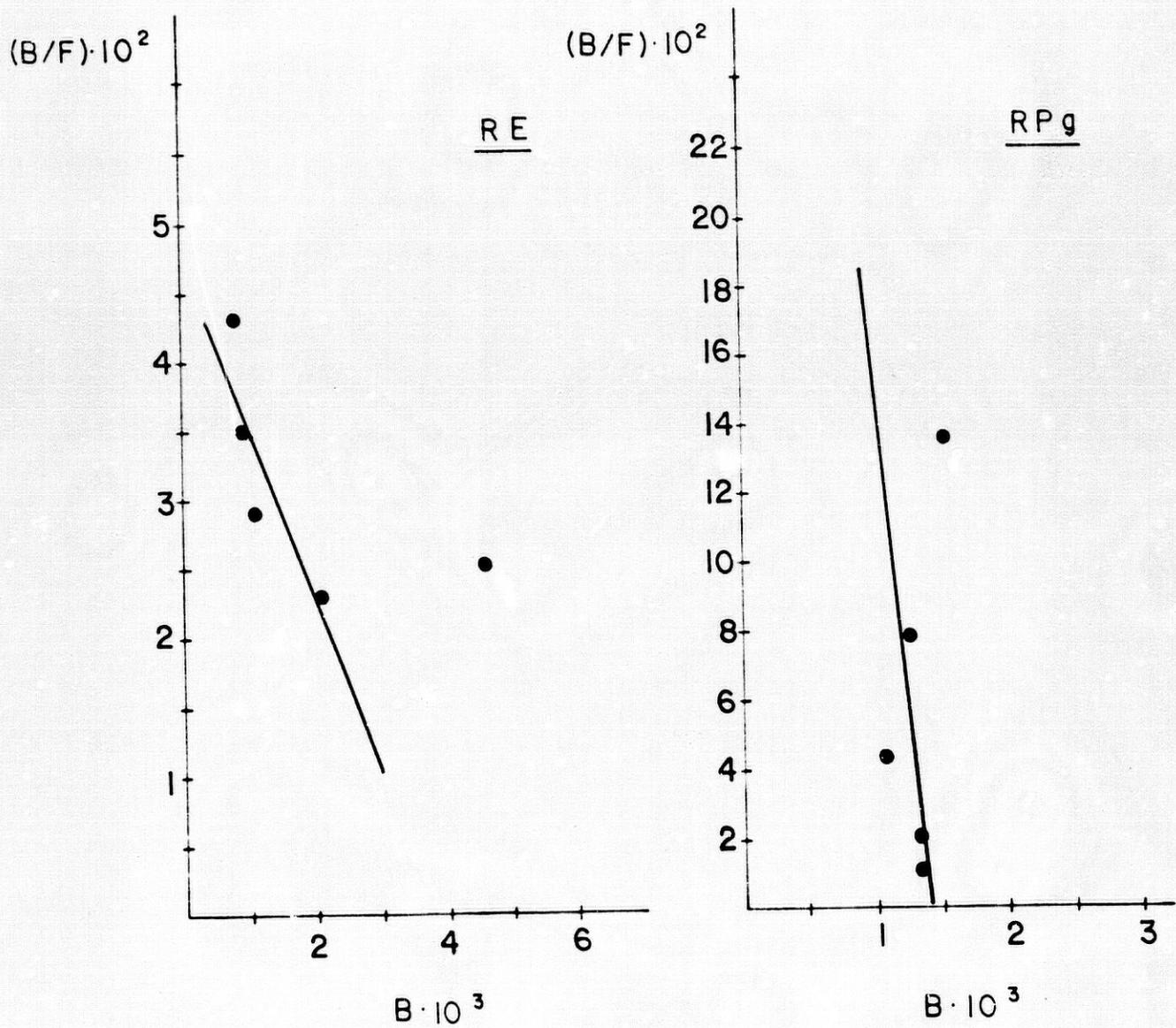


FIG.- 4.44.

RECEPTORES HORMONALES Y CICLO CELULAR

RESCATE: MEM + FCS(s) + EGF

TIEMPO DE RESCATE: 24 HORAS

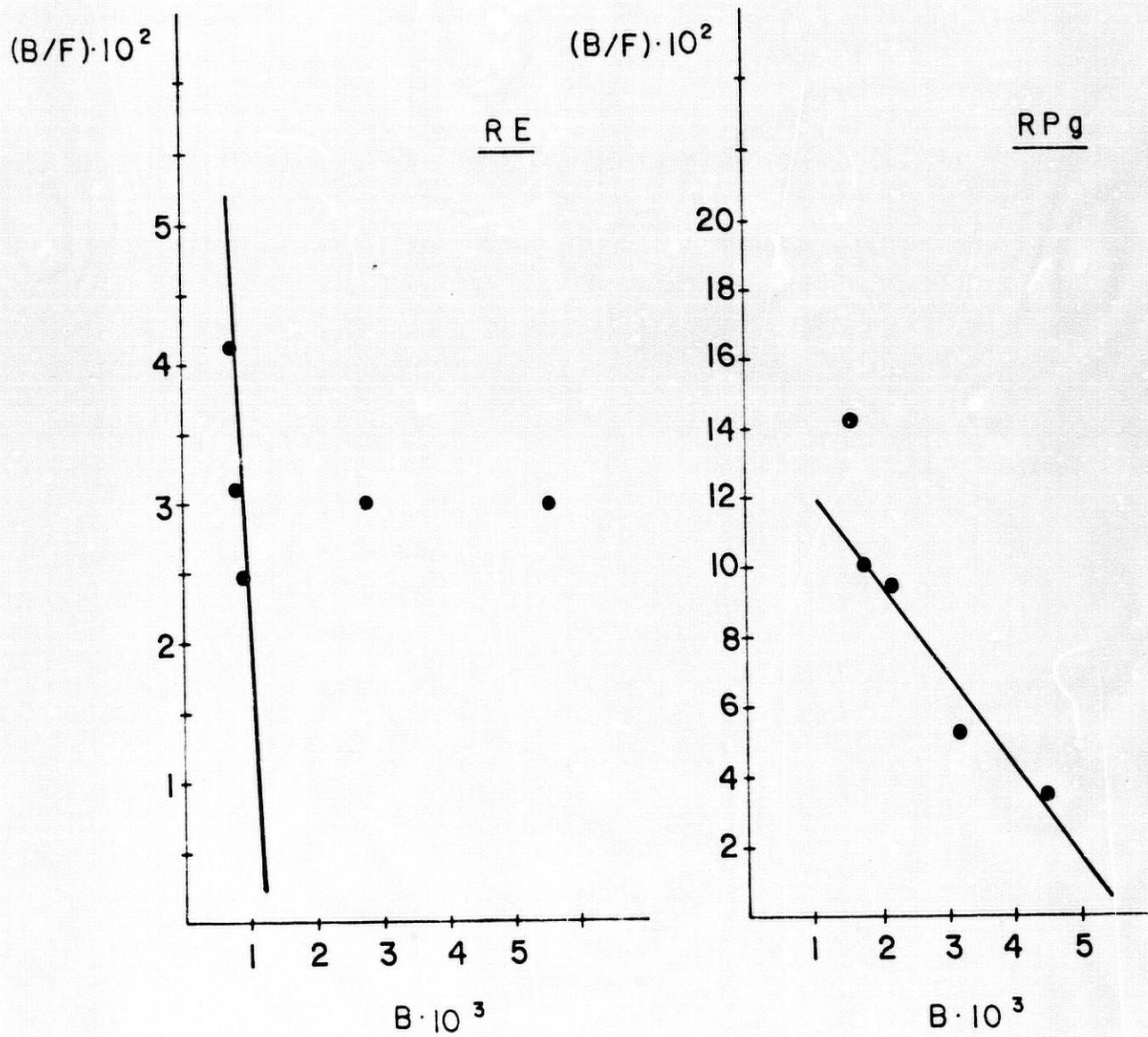


FIG.- 4.45.

EVOLUCION DE LOS NIVELES DE RECEPTORES
HORMONALES EN CULTIVOS DE CELULAS
MCF - 7 SINCRONIZADAS

RESCATE: MEM + FCS + EGF (10 ng/ml)

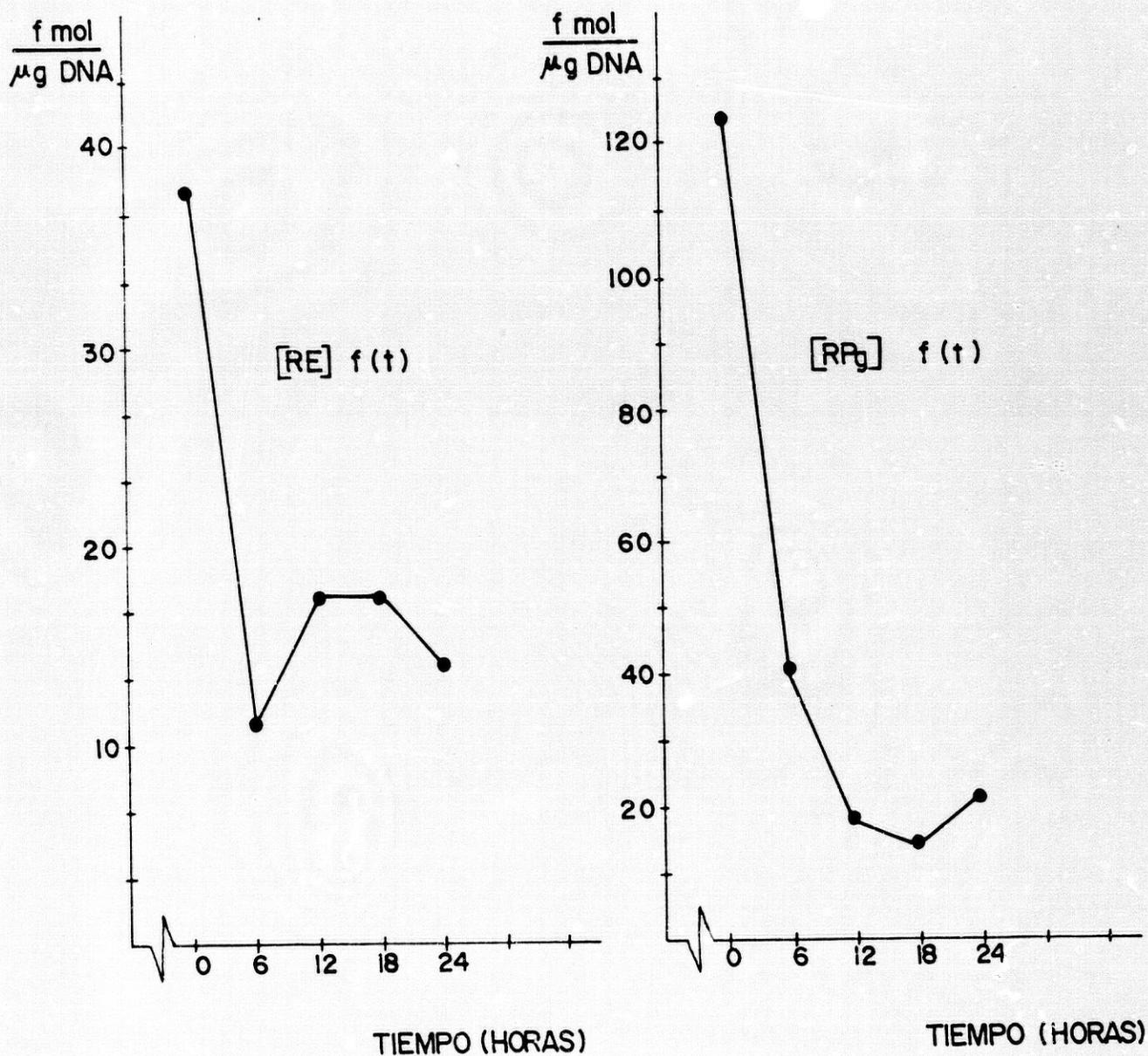


FIG.- 4. 46.

EVOLUCION DE LOS NIVELES DE RECEPTORES
HORMONALES EN CULTIVOS DE CELULAS
MCF - 7 SINCRONIZADAS

RESCATE : MEM + FCS_(s) + EGF (10 ng/ml)

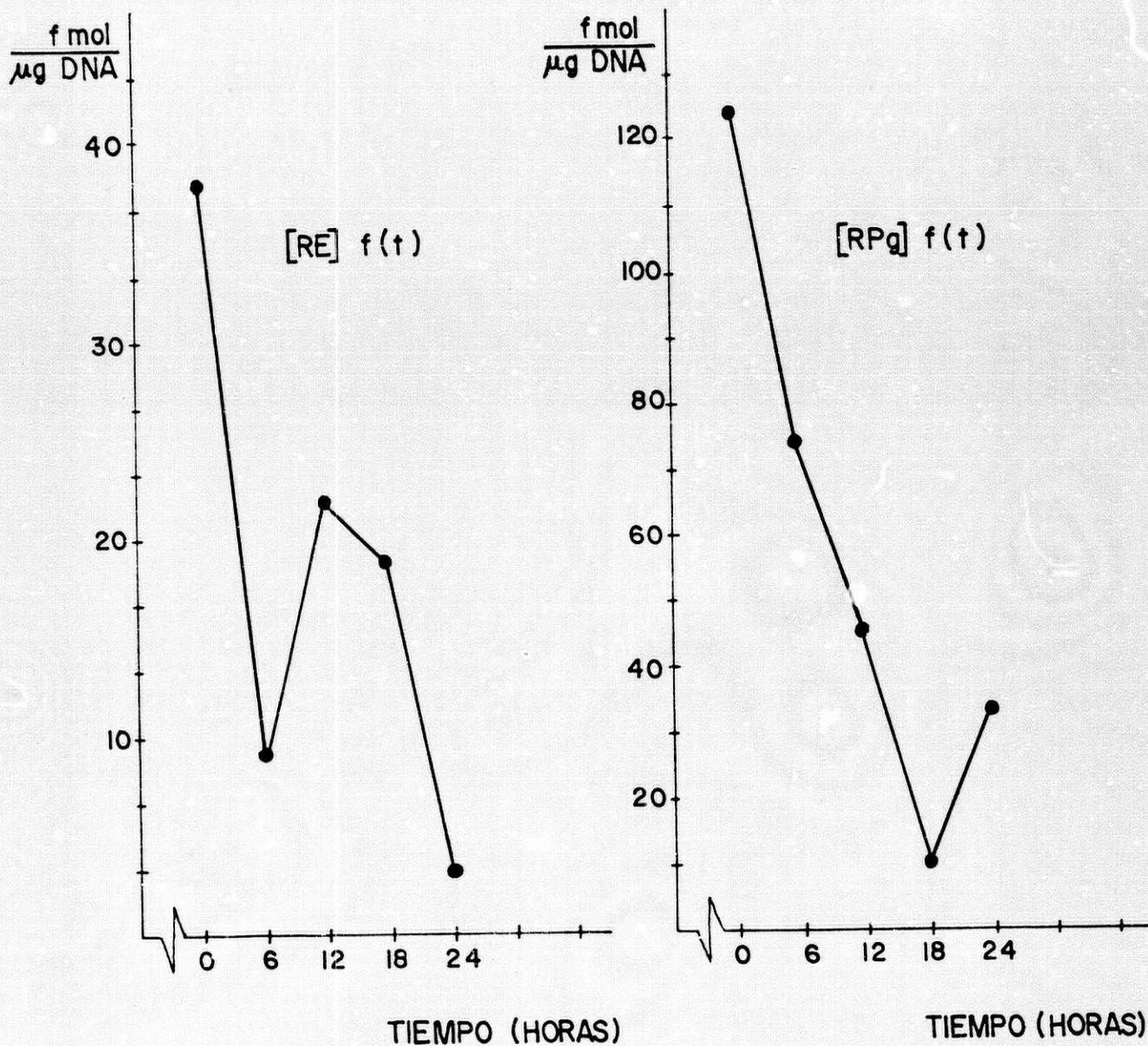


FIG.- 4.47.

La evolución de la concentración de los RE en función del tiempo transcurrido desde el "rescate", en ambos experimentos, es muy parecida a la descrita en el apartado anterior. Sin embargo hay una diferencia clara: en presencia de EGF las curvas de concentración del RE se encuentran desplazadas hacia la izquierda respecto de las obtenidas en su ausencia (Fig. 4.46 y 4.47 frente a Fig. 4.34 y 4.35). Este fenómeno parece indicar que la acción del EGF modula los procesos de síntesis y degradación del receptor. En efecto, el valor mínimo para la tasa de RE intracelular se alcanza a las 6 horas de subcultivo, la síntesis del receptor predomina en la fase G₁ y su "consumo" es evidente en el tiempo correspondiente a la fase S. Por otra parte, en ausencia de estradiol (FCS₁₈) se observa, nuevamente, una mayor estimulación de la síntesis del RE.

Mayores diferencias pueden observarse cuando se analizan las curvas que reflejan la evolución de los niveles intracelulares de RPg. En presencia de EGF desaparece la rama ascendente inicial y el consumo del RPg es inmediato al "rescate". Tanto en estas experiencias como en las discutidas en el apartado anterior, el valor del tiempo para el que la concentración de RPg es mínima resulta coincidente (18 horas tras el cambio de medio). Finalmente, la síntesis del receptor de progesterona que acompaña al periodo de duplicación

del DNA, cuando el cultivo se realiza en ausencia de EGF, no resulta demostrable en presencia de éste. La interpretación de estos hallazgos, la influencia que el EGF ejerce sobre los niveles intracelulares de RE y RPg, y sobre todo sus modificaciones cíclicas, constituyen problemas pendientes de esclarecimiento.

4.4 HIPOTESIS FINAL.

De los experimentos anteriormente descritos y del estudio de la bibliografía relacionada surgen variadas cuestiones de importancia fundamental, que pueden formularse así:

1) ¿La expresión del fenotipo RE+, está ligada a la velocidad de proliferación de los elementos celulares?.

2) Si lo anterior es cierto, ¿un tumor RE+ es un tumor de lenta cinética de crecimiento?. Por el contrario, ¿la no expresión tumoral del receptor de estrógenos caracteriza a las neoplasias con actividad mitótica y fracción de crecimiento elevada?.

3) La heterogeneidad tumoral en lo que a expresión del RE+ se refiere, ¿indica la existencia en el seno

del tumor de zonas caracterizadas por diferentes fracciones de crecimiento?

4) La coexistencia de células RE+ y RE- tanto en la mama normal como en el cáncer mamario ¿puede ser explicada en virtud de los cambios de concentración de RE observados en relación con el ciclo celular?

Determinados hechos de observación permiten dar una respuesta, al menos intuitiva, a alguna de tales cuestiones. Se sabe, al respecto, que la expresión del fenotipo RE+/RPG+ es más infrecuente en el cáncer de mama inflamatorio (59,162,179), tumor caracterizado por una gran velocidad evolutiva. Las técnicas histoquímicas han demostrado, por otra parte, que el patrón de expresión del RE tanto en la mama normal como en el cáncer es complejo, mostrando la mayor parte de los tumores una marcada heterogeneidad en la fijación positiva del anticuerpo frente al receptor y coexistiendo células RE+ con células RE- (204). Debe destacarse, además que los tumores de pequeño tamaño no son menos heterogéneos, hecho que ha permitido suponer que el cáncer de mama es una entidad compleja desde que alcanza el plano clínico (205).

El significado biológico de estos hallazgos ha sido recientemente discutido (205). Como las células

de la mama normal manifiestan tambien este mismo patrón heterogeneo se ha sugerido que la expresión de un determinante particular pueda responder a fluctuaciones del estado funcional de tales células en relación con el tiempo (125,219,233). ¿Podría, pues, esta heterogeneidad ser consecuencia de la distribución de las células hormonodependientes en los compartimentos quiescente y proliferativo del espécimen tisular analizado?. Creemos que una respuesta afirmativa es posible. Las células quiescentes, o las células con largo periodo de G₁, que existen en el cultivo celular MCF-7 tratado con OH-TAM muestran, en efecto, una capacidad de enlace para el estradiol entre tres y cuatro veces superior a la que poseen las células mitoticamente activas.

Por otra parte la posibilidad de que el tratamiento sistémico de las enfermas con cáncer de mama modifique el carácter RE+ o RE- del tumor ha sido ampliamente discutida (140,207,283) y hoy día parece claro que en respuesta al tratamiento endocrino con tamoxifeno el contenido en receptor estrogénico en el tumor clinico tiende a descender hasta hacerse en muchos casos negativo. Esto que puede ser, sin embargo, un efecto transitorio (282), está en absoluta contradicción con los resultados experimentales que surgen de nuestro trabajo. La contradicción resulta ser, no obstante, sólo aparente. En efecto, en cáncer de mama

humano el ensayo de receptores hormonales se realiza sobre el citosol procedente de la homogeneización del tumor. El tamoxifeno actúa sobre la célula blanco a través de su enlace al receptor estrogénico (52,276). De acuerdo con el modelo actualmente aceptado para el mecanismo de acción de las hormonas esteroideas, el receptor de estrógenos se localiza en el núcleo de la célula, presumiblemente enlazado a la cromatina (152,307) y su energía de enlace aumenta cuando se forma el complejo receptor-estradiol. El tiempo de retención del receptor en el núcleo se ha demostrado que es mayor cuando la proteína está enlazada al antiestrógeno (OH-TAM) que cuando el enlace tiene lugar con el 17- β -estradiol (53). Esta circunstancia justifica que el receptor no sea extraíble en la fracción citosólica cuando se realiza el homogeneizado de un tumor de una paciente que está siendo tratada con antiestrógenos y explica que el resultado del ensayo sea inferior (o incluso negativo) al obtenido en ausencia de tratamiento. (El método de ensayo utilizado en este trabajo se realiza sobre células intactas y como el estradiol desplaza, por simples razones de afinidad química, al tamoxifeno de su lugar de enlace con el receptor la valoración de la capacidad de enlace de las células para la hormona resulta, en consecuencia, más real).

La quimioterapia sistémica y otras moléculas de acción hormonal distintas al tamoxifeno han demostrado, en ocasiones, un efecto inverso: Hacen receptor positivo a tumores que inicialmente fueron caracterizados como receptor negativo (140,282). ¿Puede ser esto consecuencia del enlentecimiento del ritmo de crecimiento del tumor impuesto por la acción farmacológica de tales sustancias?. El experimento que a continuación describimos intenta demostrar que en la línea celular tumoral mamaria hormono-independiente EVSA-T (168) es posible detectar receptores de estrógenos, cuando la manipulación del cultivo consigue enlentecer su crecimiento.

Metodologicamente el experimento es análogo a los realizados con células MCF-7. La única diferencia radica en que la técnica empleada para detener el crecimiento celular ha sido, en este caso, la depleción del suplemento de suero que enriquece el medio de cultivo. El esquema de procedimiento utilizado fue el siguiente:

- 1) Siembra de aproximadamente 10^5 células por disco. Cultivo en 2 ml de MEM + FCS en 5% CO_2 , 37°C y saturación de humedad durante 2 días.

- 2) Eliminación del medio de cultivo y sustitución del mismo por 2 ml de Dulbecco + Ham's F-12. Las células se dejan en estas condiciones durante 24 horas.

3) Rescate de la población celular con 2 ml de MEM + FCS.

4) Ensayo de receptores de estrógenos y de progesterona a las 0, 6, 12, 18, 24 y 30 horas del rescate.

5) Determinación de la cantidad de células presentes en el cultivo (contenido en DNA) en esos mismos intervalos de tiempo.

Los resultados obtenidos para la evolución de células presentes en el cultivo (Figura 4.48) demuestran que en las primeras 18 horas, tras el cambio de medio, predomina la muerte celular. Entre las 18 y las 30 horas la cantidad de DNA existente en el cultivo se duplica. Este fenómeno indica que todas las células que sobreviven a la depleción de FCS inician, y completan, la fase de síntesis de DNA entre estos tiempos. Durante la fase anterior (tiempo comprendido entre 0 y 18 horas) las células salen del bloqueo, reparan sus lesiones y entran en el compartimento proliferativo. Los resultados obtenidos para la transformación de Scatchard de los datos de enlace entre el estradiol y las células EVSA-T se ofrecen en las Figuras 4.49 a 4.54. De su análisis se desprende fácilmente que los RE son indetectables a las 0, 6 y 12 horas, siendo claramente positivos a las 18 y 24 horas y nuevamente negativos a las 30 horas. La positividad para el receptor de progesterona se observa desplazada 6 horas res-

CRECIMIENTO DE CELULAS EVSA-T
TRAS CULTIVO EN MEDIO LIBRE
DE SUERO

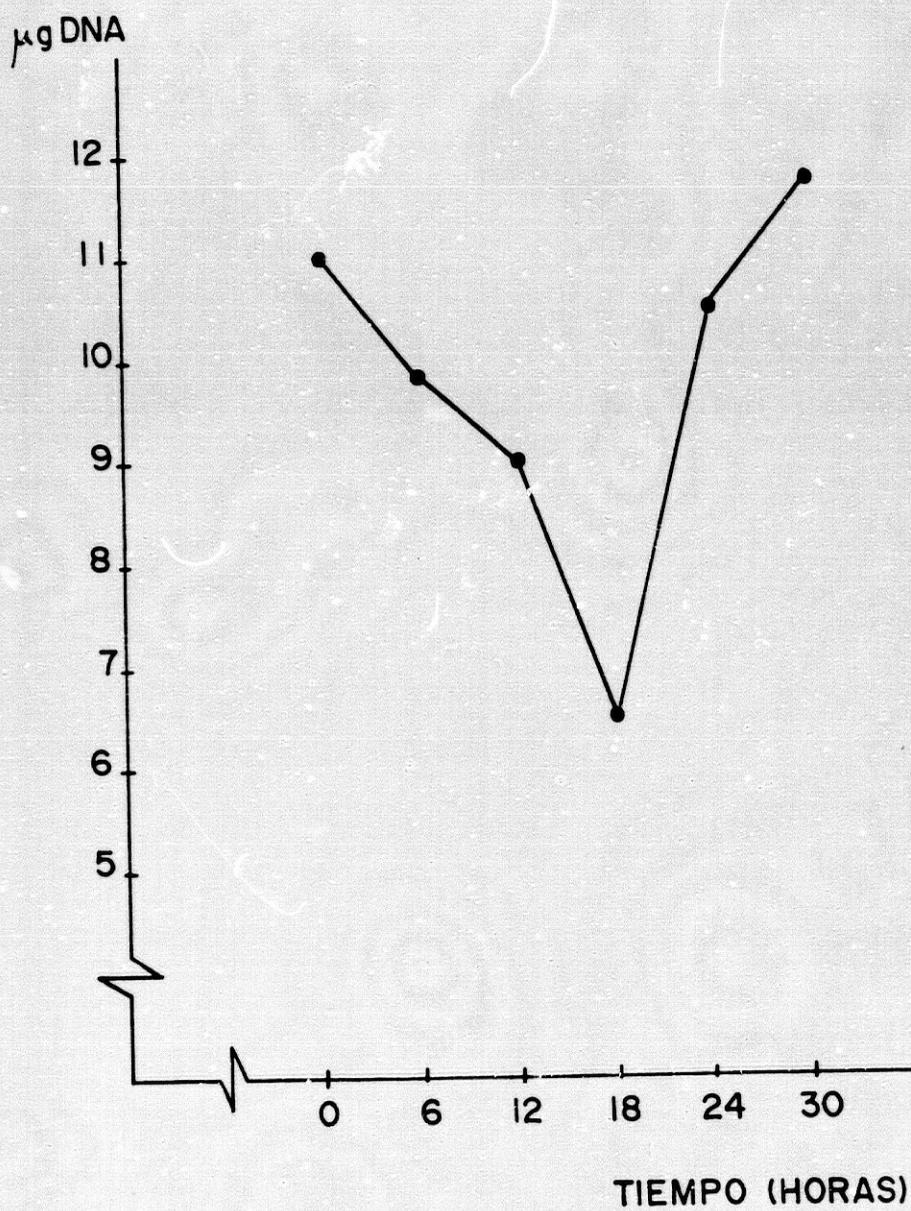


FIG.- 4.48

RECEPTORES HORMONALES Y CICLO CELULAR. LINEA CELULAR EVSA-T

RESCATE: MEM + FCS

TIEMPO DE RESCATE: 0 HORAS

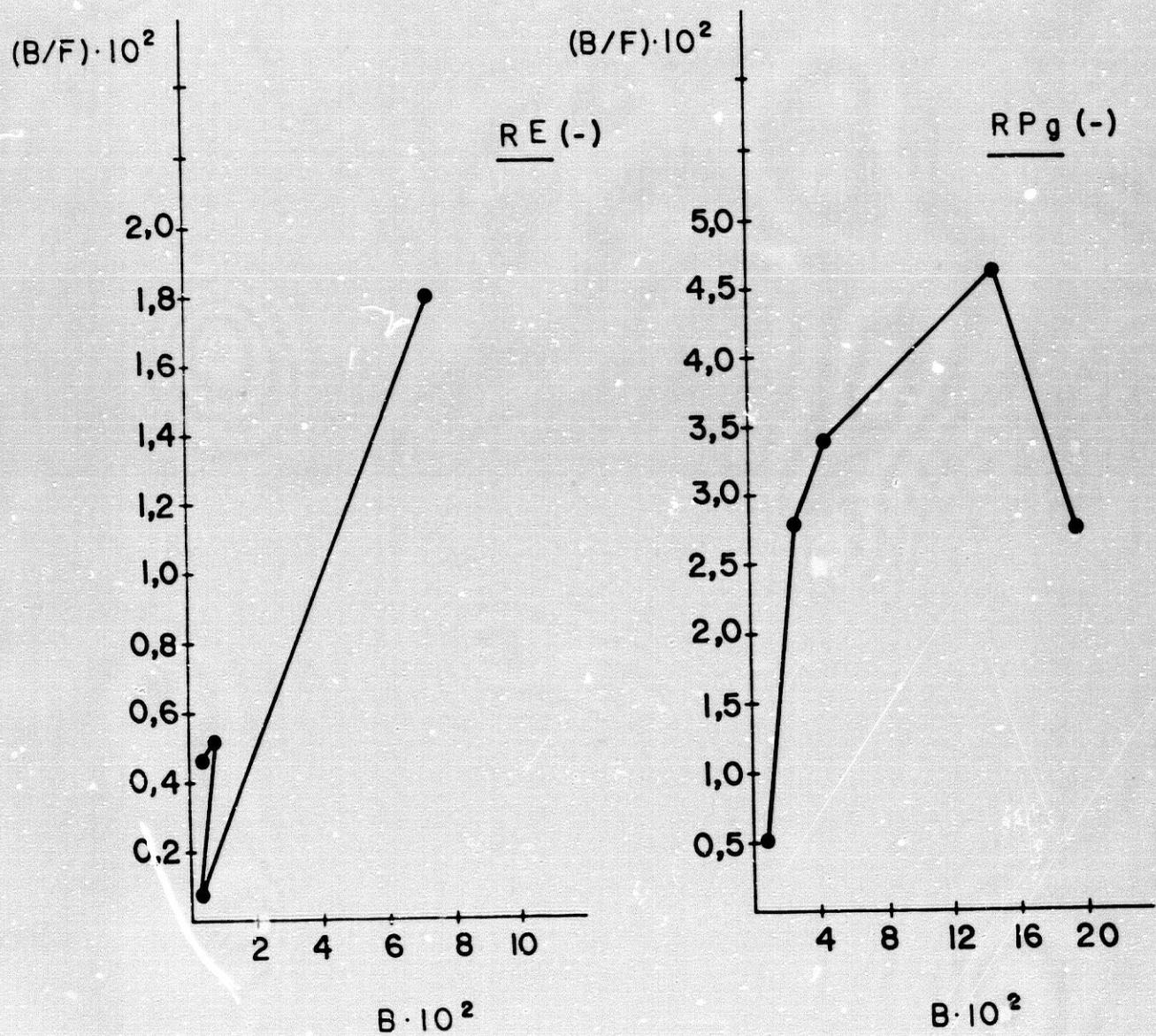


FIG.- 4.49.

RECEPTORES HORMONALES
Y CICLO CELULAR. LINEA CELULAR EVSA-T

RESCATE: MEM + FCS

TIEMPO DE RESCATE: 6 HORAS

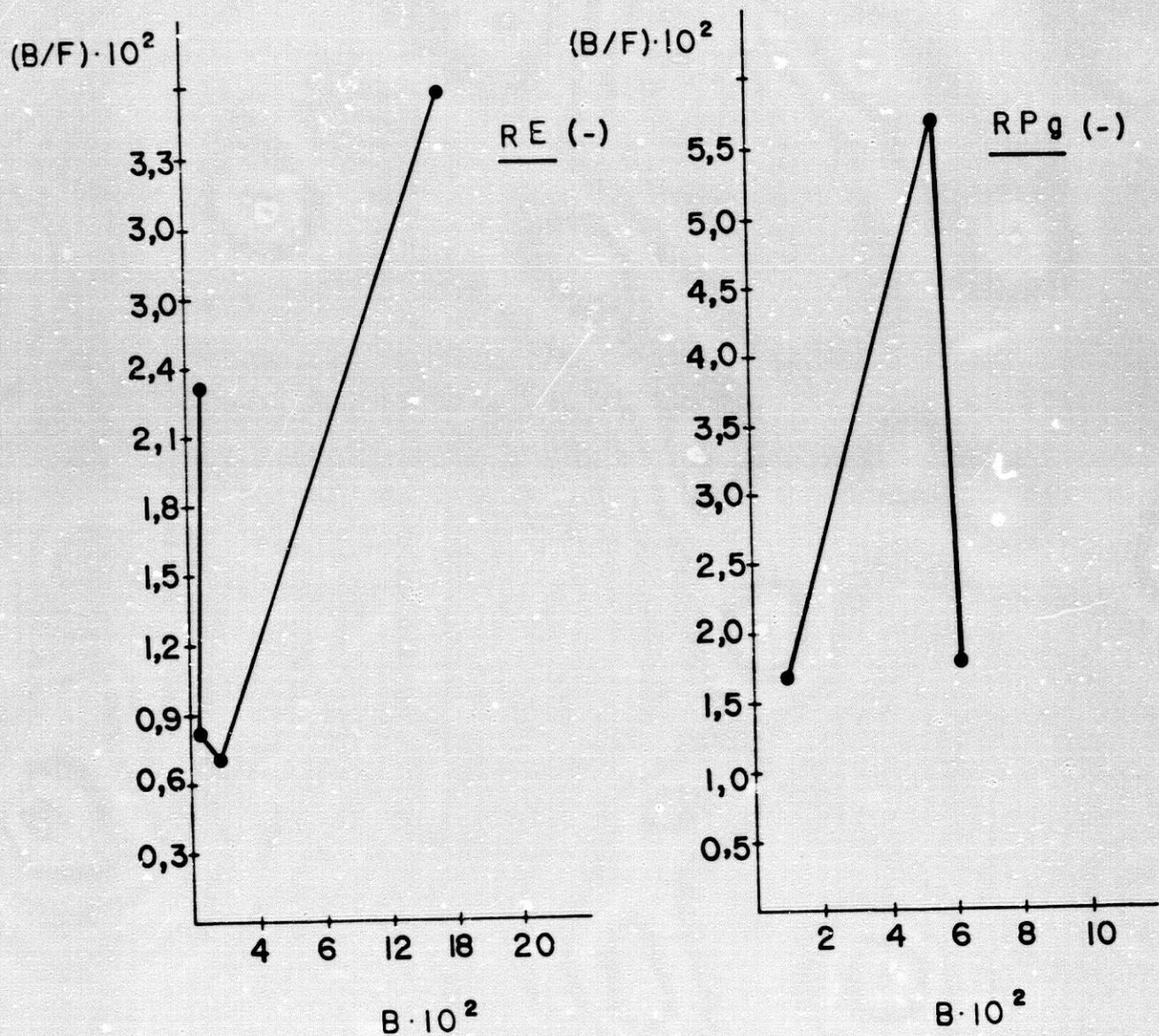


FIG.- 4. 50.

RECEPTORES HORMONALES
Y CICLO CELULAR. LINEA CELULAR EVSA-T

RESCATE: MEM + FCS

TIEMPO DE RESCATE: 12 HORAS

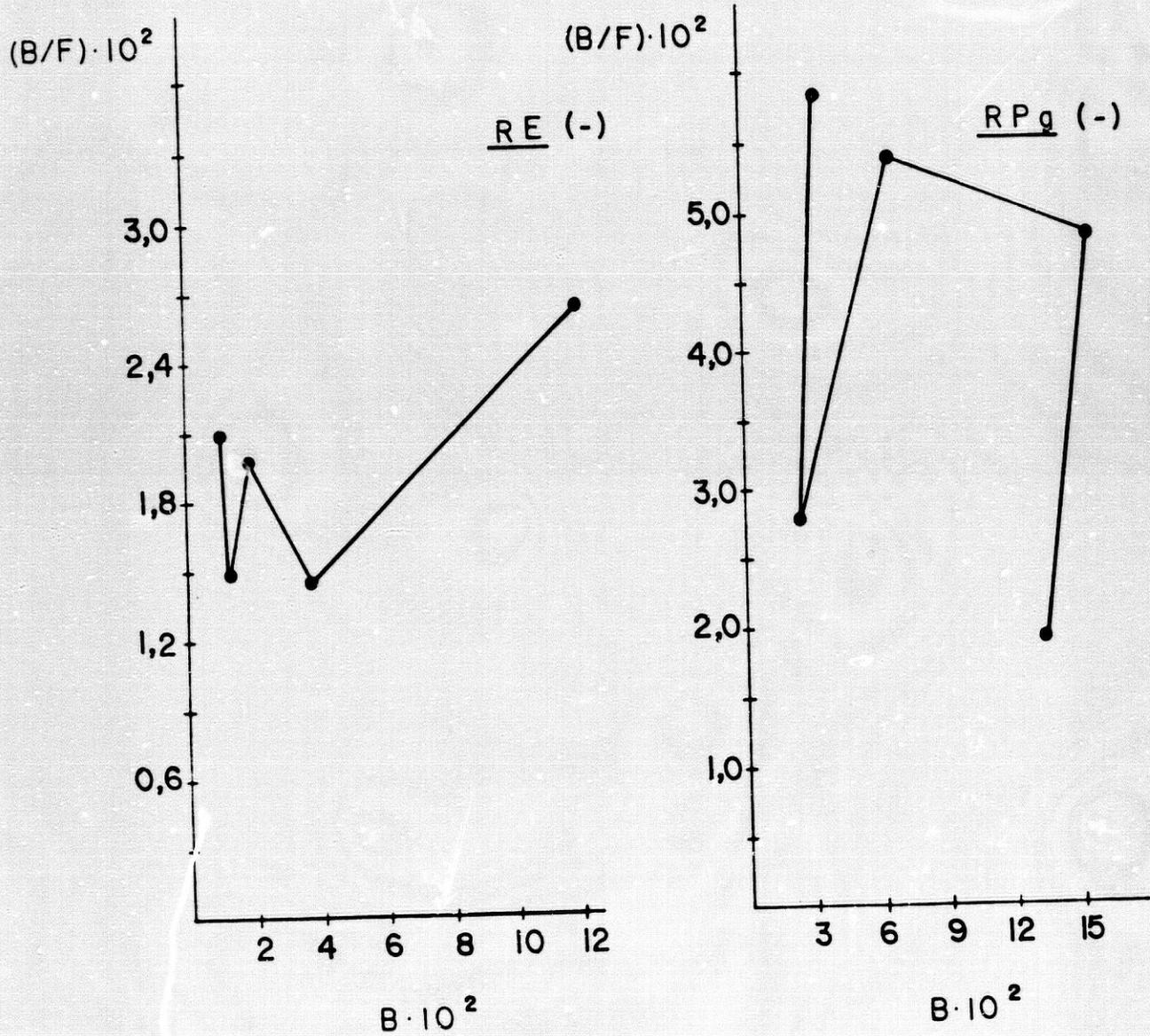


FIG. - 4.51.

RECEPTORES HORMONALES
Y CICLO CELULAR. LINEA CELULAR EVSA-T

RESCATE: MEM + FCS

TIEMPO DE RESCATE: 18 HORAS

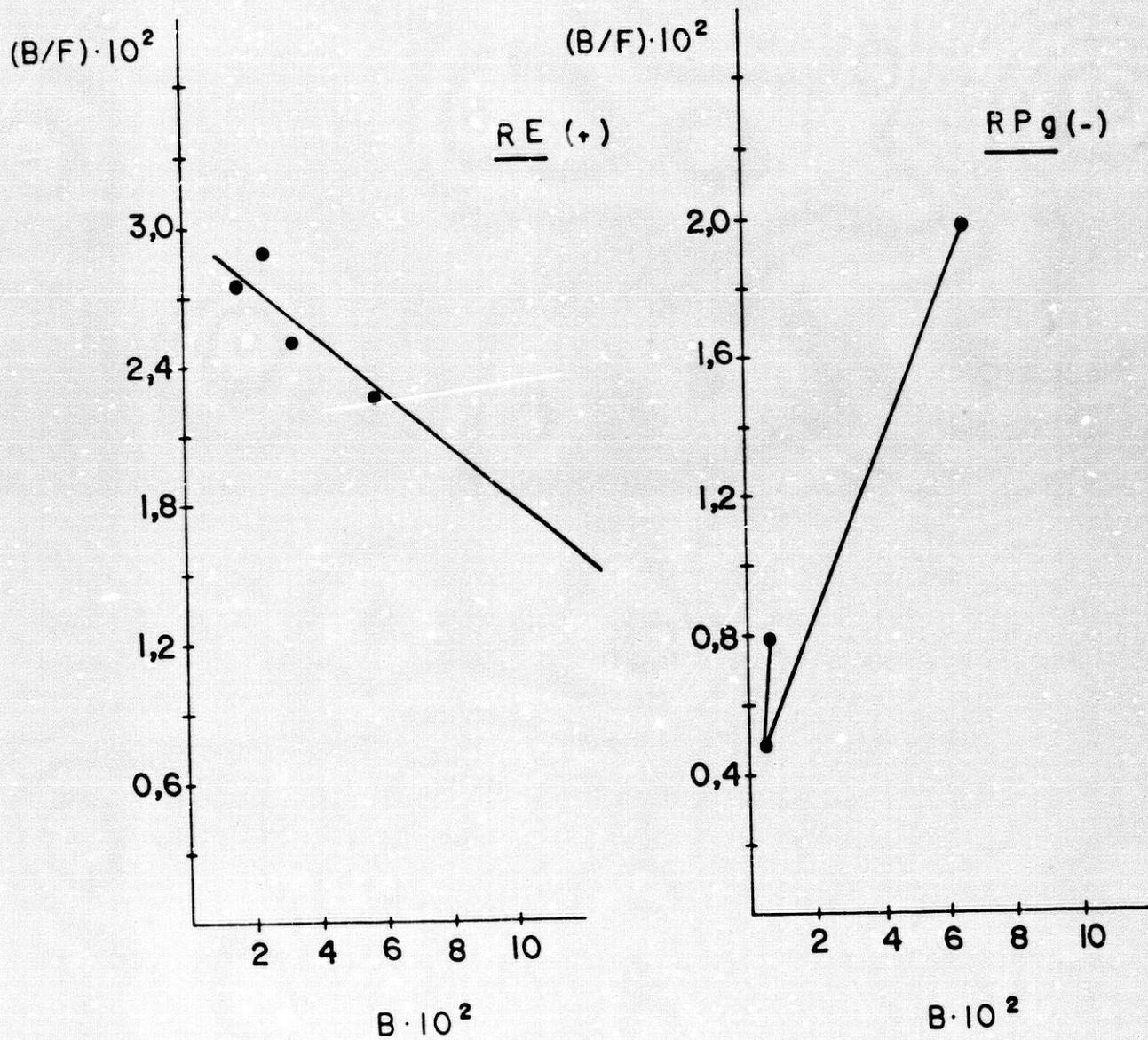


FIG.- 4.52.

RECEPTORES HORMONALES

Y CICLO CELULAR. LINEA CELULAR EVSA-T

RESCATE: MEM + FCS

TIEMPO DE RESCATÉ: 24 HORAS

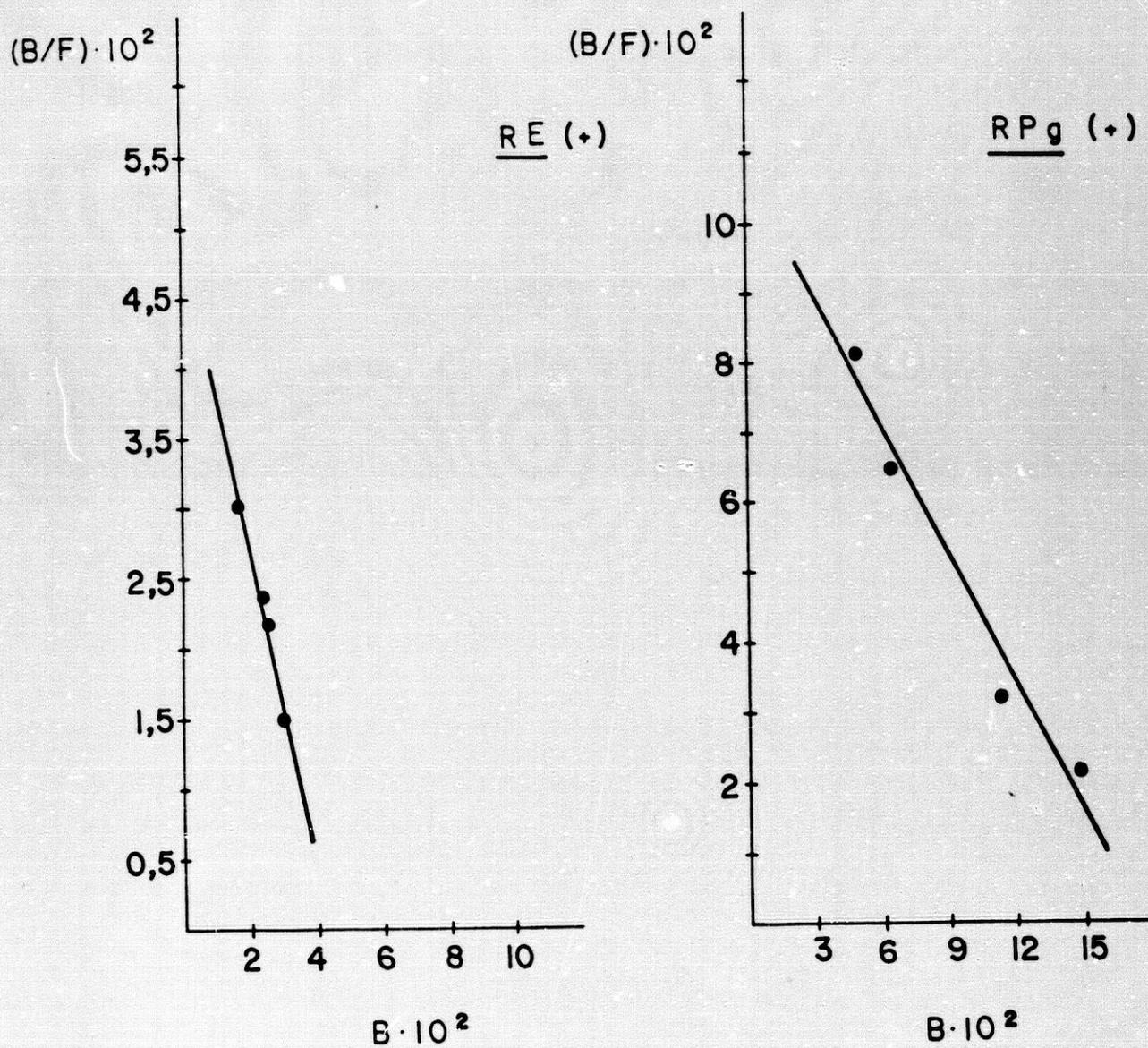


FIG.- 4.53

RECEPTORES HORMONALES
Y CICLO CELULAR. LINEA CELULAR EVSA-T

RESCATE: MEM + FCS

TIEMPO DE RESCATE: 30 HORAS

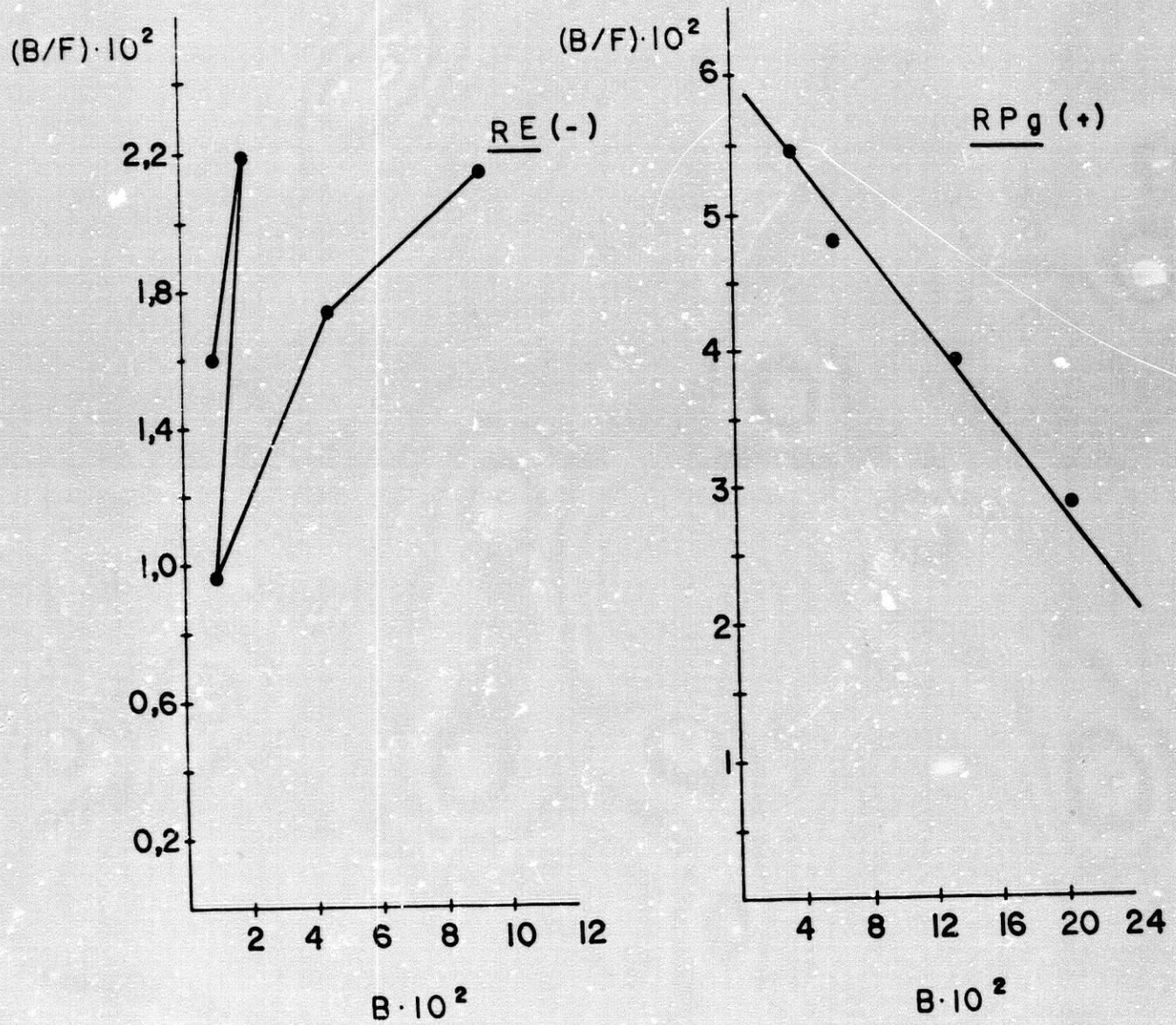


FIG.- 4.54.

pecto a la del receptor de estrógenos, hecho que responde al estado de nuestros conocimientos sobre la naturaleza del RPg como producto de la acción estrogénica en células hormonosensibles. La Figura 4.55 muestra en forma gráfica la evolución de los niveles de RE y RPg (en fmol/ μ g de DNA) en función del tiempo transcurrido tras el rescate. El resultado obtenido supone sin duda alguna una confirmación a nuestra hipótesis final.

Queda, sin embargo, por demostrar si en células EVSA-I no sometidas a enlentecimiento metabólico y sincronización por depleción de FCS, la aplicación del ensayo de RE en células intactas ofrece un resultado distinto. Para efectuar esta comparación hemos llevado a cabo un experimento paralelo en el que células privadas de FCS durante 24 horas se incubaron, a las 24 horas del rescate, con nueve concentraciones distintas de estradiol (7×10^{-9} a 3×10^{-10} M) en presencia y ausencia de 500 veces de exceso de competidor frío. El resultado del ensayo se comparó con el obtenido sobre un grupo celular cultivado en las mismas condiciones pero en el que no se eliminó en ningún momento el FCS. Las Figuras 4.56 y 4.57 demuestran claramente la positividad del RE en el primer caso (depleción de suero para modificar el ritmo de crecimiento del cultivo) y la negatividad del segundo.

EVOLUCION DE LOS NIVELES DE RECEPTORES HORMONALES EN CULTIVOS DE CELULAS EVSA-T SINCRONIZADAS

RESCATE : MEM + FCS

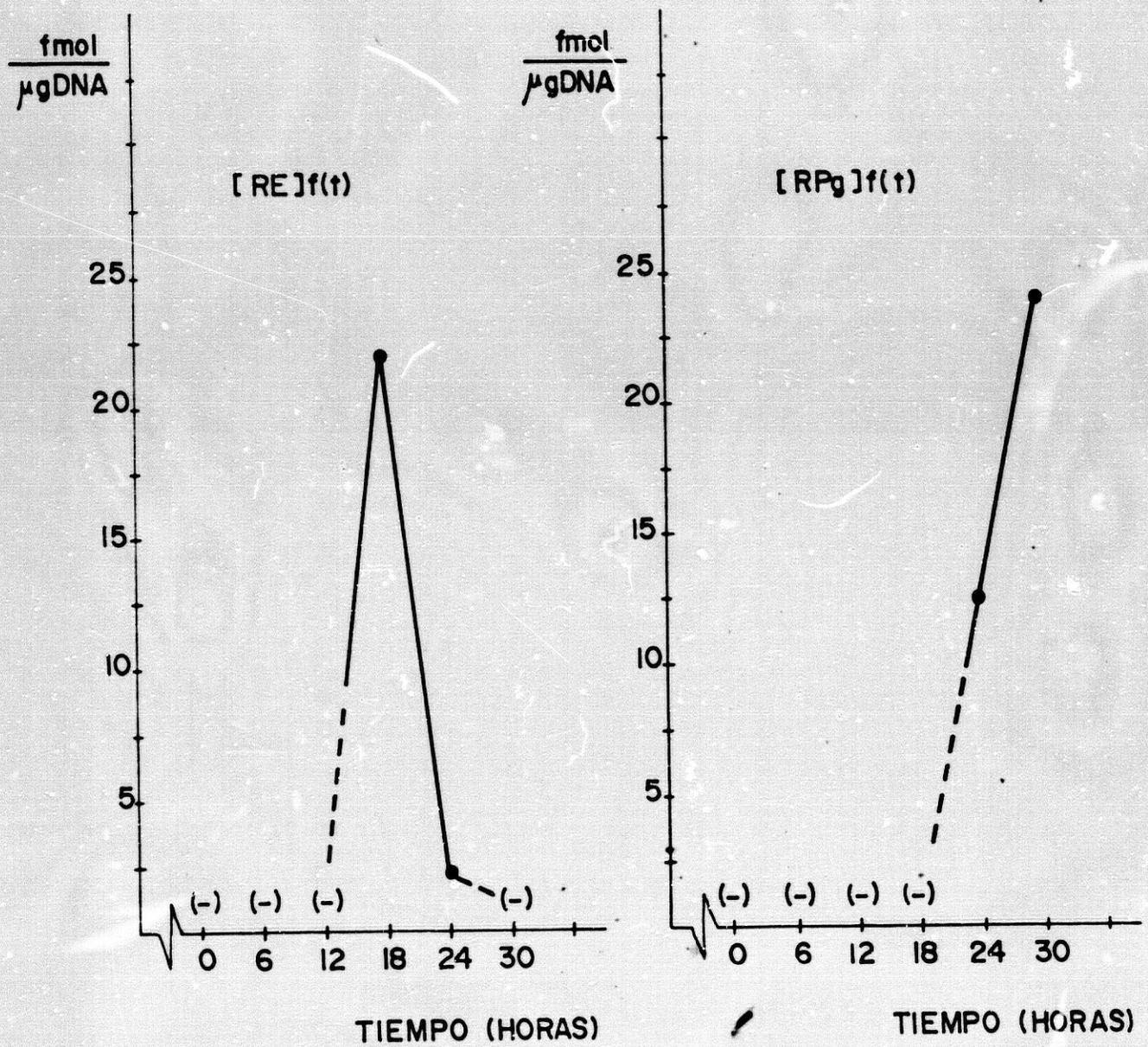


FIG.- 4.55

REPRESENTACION DE SCATCHARD DE LOS
DATOS DE ENLACE DE ESTRADIOL EN
CELULAS EVSA-T
PARCIALMENTE SINCRONIZADAS

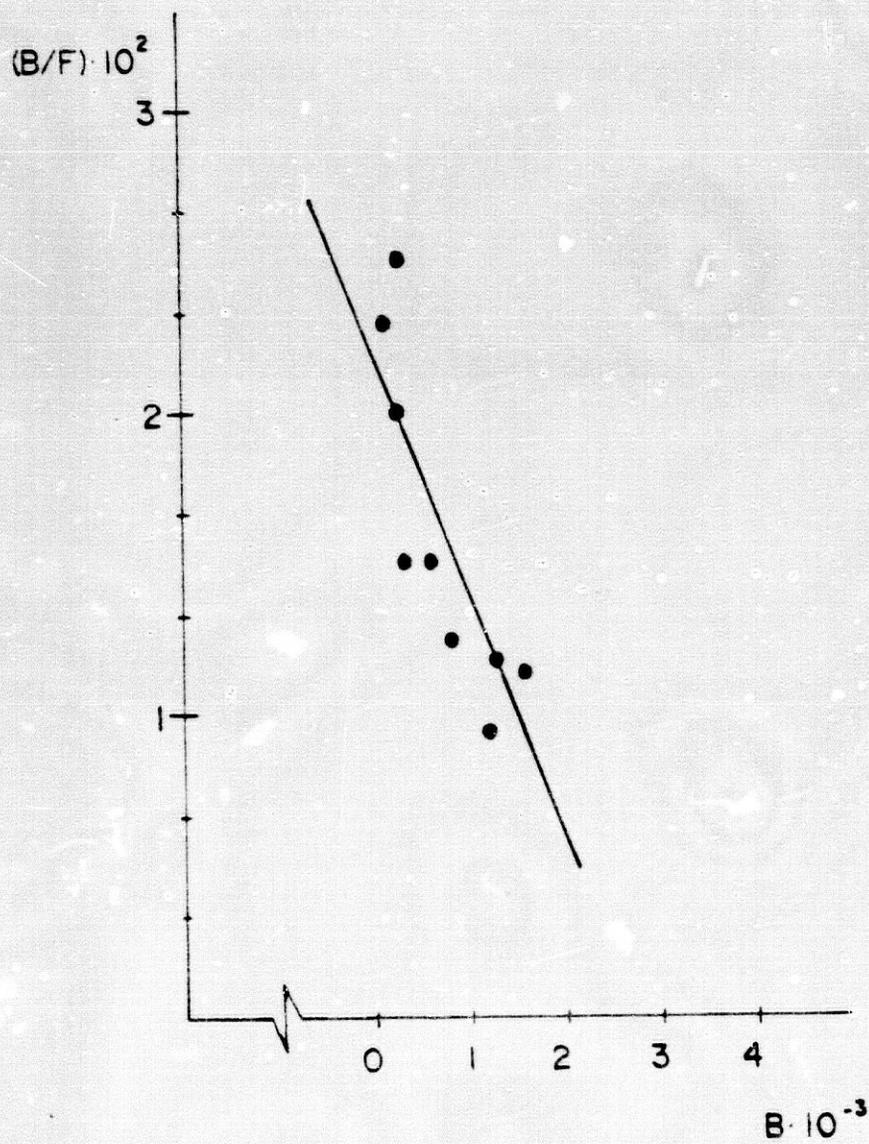


FIG - 4.56.

REPRESENTACION DE SCATCHARD DE LOS
DATOS DE ENLACE DE ESTRADIOL EN
CELULAS EVSA - T ASINCRONICAS

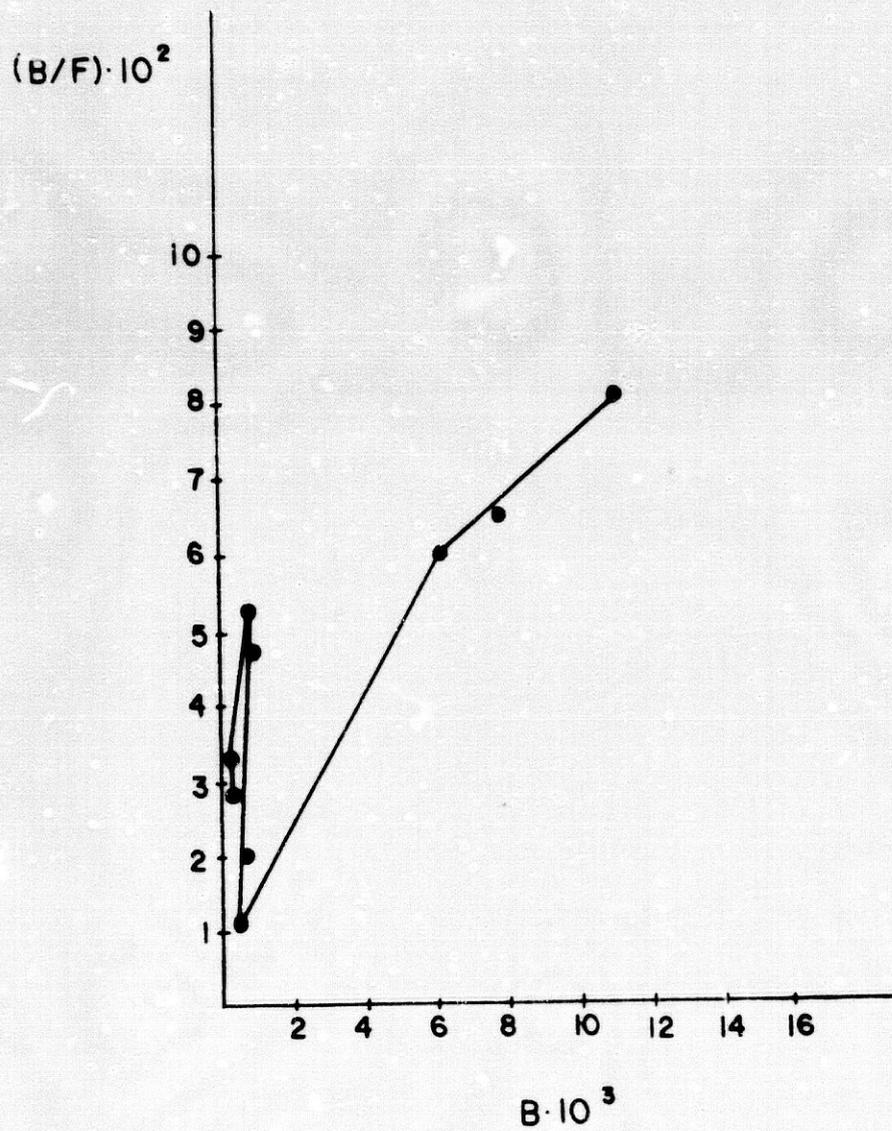


FIG.- 4.57.

REPRESENTACION DE HILL DE LOS DATOS DE ENLACE DE ESTRADIOL EN CELULAS EVSA-T PARCIALMENTE SINCRONIZADAS.

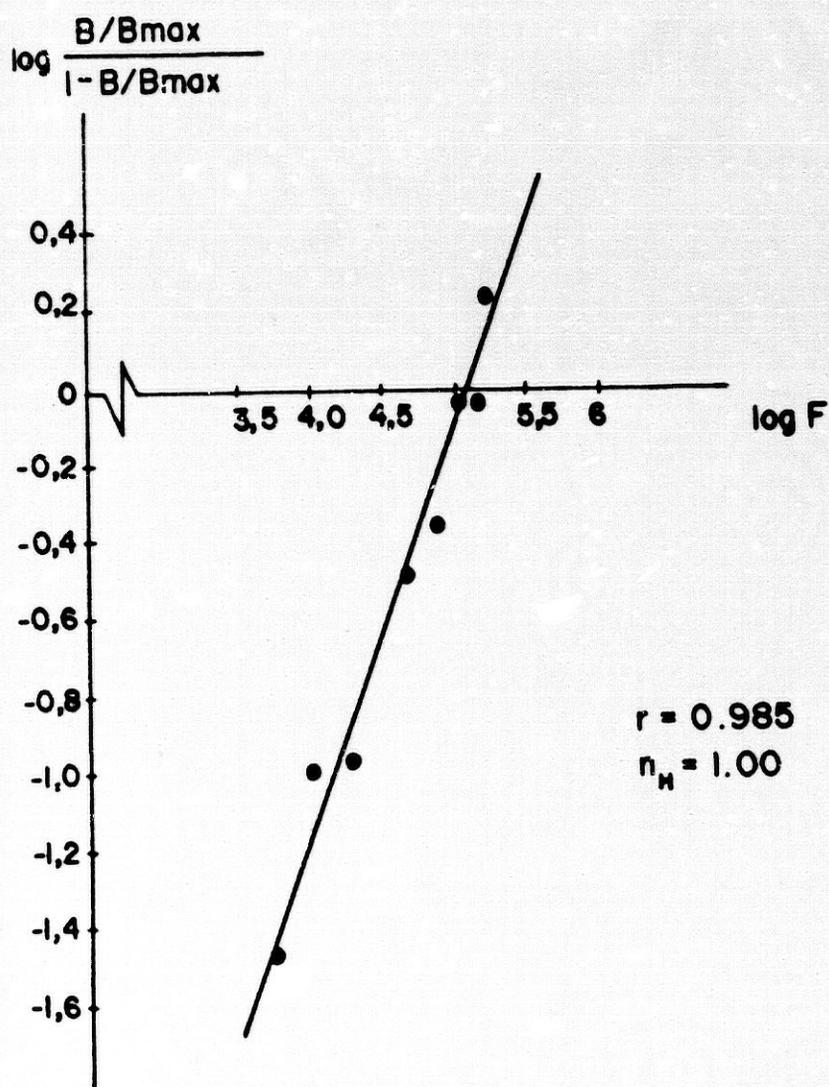


FIG.- 4.58

La tasa de receptor de estrógenos a las 24 horas del cambio de medio resultó ser de 14,3 fmol/ μ g DNA y la constante de asociación entre ligando y hormona $6,5 \times 10^{-9}$ M/l.

Por último el análisis de los datos de enlace de acuerdo con la transformación de Hill (68) (Fig. 4.58) permite demostrar que existe un único sitio de enlace entre la proteína y el receptor (o muchos sitios, todos ellos equivalentes desde el punto de vista del enlace químico). En efecto, la representación de Hill es perfectamente lineal y el valor de la pendiente, $n_H = 1,00$, descarta la existencia de fenómenos de cooperatividad positiva o negativas para el proceso de enlace entre hormona y receptor.

CONCLUSIONES

V. CONCLUSIONES.

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

1. ELEMENTOS DE PRONOSTICO GENERAL EN CANCER DE MAMA.

1.1.- Las cifras de probabilidad de supervivencia global (82%) y supervivencia libre de enfermedad (63%) obtenidas en las 109 enfermas de cáncer de mama objeto de estudio, tres años después de finalizado el tratamiento, son francamente satisfactorias y permiten sugerir la curación definitiva de la enfermedad en una cierta fracción de pacientes.

1.2.- El tamaño tumoral y el fenotipo del receptor estrogénico se han presentado, en la serie de pacientes analizada, como indicadores de pronóstico de valor fundamental. La probabilidad de supervivencia global (P_s) y supervivencia libre de enfermedad (P_{sl}) han ofrecido, en efecto, valores significativamente inferiores en pacientes RE- y enfermas con tumores de diámetro superior

a 5 cm, respecto de aquellas que exhibieron el fenotipo RE+ o presentaron tumores de diámetro inferior a 5 cm. El hecho, en particular, de que en pacientes RE- el diámetro tumoral y el estado axilar N+ no guarden entre sí relación alguna indica que en tales pacientes el proceso de diseminación es independiente del tamaño del tumor. Ello confiere al fenotipo RE- un valor pronóstico crucial.

1.3.- La influencia pronóstica ejercida por uno y otro factor (tamaño tumoral y fenotipo de receptor) puede considerarse independiente entre sí, toda vez que no ha sido posible demostrar la existencia de una relación de dependencia u orden causal entre dichos factores.

1.4.- La presencia de tumor en los linfáticos de la axila no ha supuesto efecto deletéreo alguno sobre la probabilidad de supervivencia global respecto de la prevista para la situación N-. Este hecho, que contradice abiertamente una noción ampliamente compartida, tiene a nuestro juicio tres tipos distintos de explicación: a) algunos de los casos considerados N- han podido ser falsos N- (disección axilar insuficiente); b) el control de las recidivas ha podido revelarse eficaz; c) el tiempo transcurrido (3 años) es, quizás, insuficiente para la aparición de diferencias significativas.

1.5.- La probabilidad de supervivencia libre de síntomas si se ha visto, en cambio, significativamente afectada por la invasión tumoral de los linfáticos de la axila. Como entre el diámetro tumoral y el estado axilar N-/N+ no se ha objetivado relación de dependencia alguna y tampoco se ha podido establecer una asociación significativa entre fenotipo tumoral RE+/RE- y "status" axilar cabe concluir que la influencia pronóstica de éste es independiente, también, de la de los otros dos factores.

1.6.- La independencia, en el orden pronóstico, de los factores tamaño tumoral, fenotipo del receptor y estado axilar no es, sin embargo, absoluta. Varios hechos confieren consistencia a esta afirmación: a) en pacientes RE+ la probabilidad de la invasión axilar crece, significativamente, con el diámetro tumoral; b) en pacientes con tumores de diámetro superior a 5 cm la probabilidad de existencia de un acusado grado de invasión axilar ($N \geq 4$) es mayor, en términos estadísticos, que la existente en tumores de menor diámetro; c) del mismo modo, en pacientes RE-, la probabilidad de afectación axilar (N+) es superior a la observada en el subgrupo de pacientes con fenotipo RE+. Las diferencias estadísticas encontradas han sido significativas.

1.7.- El grado de diferenciación tumoral ejerce, asimismo, un importante papel como elemento de pronóstico general en cáncer de mama. Los resultados de nuestro estudio demuestran, en efecto, que los valores de P_s y P_{st} son clara y significativamente menores en pacientes grado III que en enfermas con tumores grado I/II. La asociación estadísticamente significativa, existente entre grado III y diámetro tumoral superior a 5 cm impide atribuir, no obstante, al grado el carácter de variable pronóstica independiente.

1.8.- La inexistencia de relación entre grado histológico y fenotipo de receptor en las enfermas de nuestra serie es un hecho para el que, teniendo en cuenta la coincidencia de opiniones y los datos publicados en contra, no tenemos explicación convincente.

1.9.- Determinados datos de observación relativos a los aspectos hormonales del cáncer de mama han podido ser confirmados en el curso de la investigación realizada. Destacan entre ellos: a) la mayor frecuencia de las asociaciones RE+/Postmenopausia, RE-/Premenopausia; b) la relación de dependencia existente entre los fenotipos RE+/RPg+; c) el mejor pronóstico, establecido en términos de P_s y P_{st} , de las pacientes RE+/RPg+ respecto del que ofrecen las enfermas portadoras de tumores RE-/RPg-.

2. ACTIVIDAD PROLIFERATIVA CELULAR Y HORMONODEPENDENCIA TUMORAL.

2.1.- La cinética de proliferación de los elementos celulares de la población hormonodependiente MCF-7, cultivados en monocapa y en situación de sincronización total o parcial inducida por hidroxitamoxifeno, resulta influida positivamente por la acción del estradiol. Experimentalmente hemos podido demostrar que los mecanismos a través de los cuales se ejerce este efecto son, fundamentalmente, dos: a) el reclutamiento de células quiescentes de la población; b) el acortamiento del tiempo de ciclo celular consecutivo a la progresión sincronizada de una gran parte de los componentes celulares de la población.

2.2.- La presencia en los cultivos celulares MCF-7 de factores promotores del crecimiento celular distintos del estradiol (EGF en nuestro caso) no modifica sensiblemente la actividad proliferativa de la población. Eventualmente y durante periodos de tiempo muy precisos el EGF puede potenciar la acción del estradiol endógeno integrante del medio de cultivo utilizado para el "rescate" de las células.

2.3.- El ensayo de receptores hormonales sobre células intactas aplicado a los elementos en la población

MCF-7 ha permitido demostrar que la concentración intracelular de receptor de estrógenos y progesterona no permanece constante sino que experimenta cambios a lo largo del ciclo mitótico celular.

2.4.- Entre la actividad proliferativa de la población y la concentración intracelular del receptor parece existir una relación recíproca. En efecto, la concentración de receptor para estradiol alcanza un valor máximo en situaciones caracterizadas por una cinética de proliferación celular lenta y, precisamente, en la fase del ciclo celular (G₀-G₁) de cuya prolongación se deriva tal enlentecimiento, y cae a valores mínimos, con oscilaciones discretas, cuando las células progresan en el ciclo divisorio.

2.5.- En ausencia de estradiol y en la fase de síntesis (S) del ciclo celular el estado de equilibrio probablemente existente entre los procesos de síntesis y degradación del receptor estrogénico se resuelve claramente a favor de los primeros. Cabe concluir, por ello, que el estradiol modula la síntesis de su propio receptor en una forma inversamente dependiente de su concentración.

2.6.- La concentración intracelular del receptor de progesterona encuentra, igualmente, una cierta depen-

dencia respecto del ciclo celular. Su valor máximo se expresa en G₁ y en las fases final de S y G₂-M, donde debe cumplir una cierta función metabólica. Como en las citadas fases la concentración del receptor estrogénico es mínima la conclusión parece evidente: la síntesis del receptor de progesterona "consume" receptor de estrógenos.

2.7.- La presencia en los cultivos celulares de factores de crecimiento no estrogénicos (EGF) modifica las condiciones de síntesis y degradación de los receptores de estrógenos y progesterona. El cambio más significativo para el receptor de estrógenos consiste en una aceleración, sin alteraciones cuantitativas, de ambos procesos. La síntesis del receptor de progesterona parece, en cambio, quedar inhibida por la acción del citado factor.

2.8.- El fenómeno que liga la expresión cuantitativa del fenotipo del receptor hormonal con la actividad proliferativa celular parece ser, por otra parte, de orden general. Sólo así puede explicarse, efectivamente, que cambios en la cinética de proliferación de células hormonoindpendientes (EVSA-T) puedan estar asociadas con la presencia en los cultivos, de receptor de estradiol y progesterona que modifican su concentración

en forma inversa a la velocidad de crecimiento del cultivo.

2.9. - Si esto es realmente así, es decir, si el receptor estrogénico (y por extensión el de progesterona) alcanza su expresión máxima durante los periodos de lentecimiento del ciclo mitótico resulta posible concluir que quiescencia celular y fenotipo RE+ deben encontrarse estrechamente relacionados. ¿Equivale ello a decir que los cánceres de mama RE+ deben contener, mayoritariamente, clones celulares dotados de escaso poder de multiplicación celular?. La respuesta a esta pregunta -nuestros propios resultados lo confirman- es, hasta el momento, contradictoria.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- 1.- AAMDAL, S.; BORMER, O.; JORGENSEN, O. y col. (1984).
Estrogen receptors and long term prognosis in breast cancer.
Cancer, 53: 2525-2529.
- 2.- ACKER H.; CARLSSON, J.; DURAND, R. y col. (1.984).
Spheroids in Cancer Research. Methods and Perspectives.
Acker H, Carlsson J, Durand R, Sutherland R.M. Eds.
Springer Verlag. New York.
- 3.- ALANKO, A.; HEINONEN, E.; SCHEININ, T. y col. (1984).
Estrogen and progesterone receptors and disease free interval in primary breast cancer.
Br. J. Cancer, 50: 667-672.
- 4.- ALANKO, A.; HEINONEN, E.; SCHEININ, T. y col. (1985).
Significance of estrogen and progesterone receptors, disease free interval and site of first metastasis on survival of breast cancer patients.
Cancer, 56: 1696-1700.
- 5.- AMERICAN CANCER SOCIETY. (1.980).
Cancer facts and figures.
American Cancer Society.

- 6.- AMERICAN CANCER SOCIETY. (1.986).
Cancer facts and figures.
American Cancer Society.
- 7.- ANDRY, G.; MATTHEIEM, W.; SUCIU, S. y col. (1.984).
Estrogen receptor and distribution of prognostic factor in
primary breast cancer. En "Clinical Interest of Steroid
Hormone Receptors in Breast Cancer".
Leclercq G, Toma S, Paridaens R, Heuson J.C. Eds. Springer-
Verlag. Berlin. pp: 141-144.
- 8.- ANTONIADES, K.; SPECTOR, H. (1.979).
Correlation of estrogen receptor levels with histology and
cytomorphology in human cancer.
Am J. Clin. Pathol., 71: 497-503.
- 9.- ATKINS, H.; HAYWARD, L. y col. (1.972).
Treatment of early breast cancer. A report after ten years
of a clinical trial.
Brit. Med. J., 20: 423-425.
- 10.- ATKINSON, E.N.; BROWN, B.W.; MONTAGUE, E.D. (1.986).
Tumor volume, nodal status and metastasis in breast cancer
in women.
J.N.C.I., 76: 171-178.
- 11.- BAKER, R.R.; MONTAGUE, A.C.W.; CHILDS, J.W. (1.979).
A comparison of modified radical mastectomy to radical
mastectomy in the treatment of operable breast cancer.
Ann. Surg., 189: 553-559.
- 12.- BARNES, D. y SATO, G. (1.979).
Growth of a human mammary tumor cell line in a serum-free
medium.
Nature, 281: 388-389.

13. - BARRACK, E.R. (1.983).
The nuclear matrix of the prostate contains acceptor sites for androgen receptors.
Endocrinology, 113: 430-432.
14. - BARRACK, E.R.; COFFEY, D.S. (1.980).
The specific binding of estrogens and androgens to the nuclear matrix of sex hormone responsive tissues.
J. Biol. Chem., 225: 7265-7275.
15. - BEAHRS, O.H. (1.984).
Staging of cancer of the breast as a guide to therapy.
Cancer, 53: 592-594.
16. - BERG, J.W.; ROBBINS, G.F. (1.977).
Selection of treatment regimens for women with potentially curable breast carcinoma.
Ann. Surg., 2: 86-91.
17. - BISHOP, H.M.; BLAMEY, R.W.; ELSTON, L.W. y col. (1.979).
Relationship of estrogen receptor status to survival in breast cancer.
Lancet, 2: 283-284.
18. - BLACK, M.M.; BARCLAY, T.H.C.; HANKEY, B.F. (1.975).
Prognosis in breast cancer utilizing histologic characteristics of the primary tumor.
Cancer, 36: 2048-2055.
19. - BLACK, M.M.; HANKEY, B.F.; BARCLAY, T.H.C. (1.982).
Intra-stage prognostic heterogeneity: Implications for adjuvant chemotherapy of breast cancers.
J. Nat. Cancer Inst., 68: 445-447.

- 20.- BLOOM, H.J.G.; RICHARDSON, W.W. (1.975).
Histological grading and prognosis in breast cancer. Study
of 1.409 cases of which 359 have been followed for 15
years.
Br. J. Cancer, 11: 359-377.
- 21.- BLOOM, H.; RICHARDSON, M.; HARRIS, B. (1.962).
Natural history of untreated breast cancer (1.804-1.933):
Comparison of untrated and treated cases according to his-
tological grade of malignary.
Br. Med. J., 2: 213-221.
- 22.- BONADONNA, G.; BRUSAMOLINO, E.; VALAGUSSA, P. (1.976).
Combination chemotherapy as an adjuvant treatment in
operable breast cancer.
N. Eng. J. Med., 294: 405-410.
- 23.- BONADONNA, G.; DI FRONZO, G.; TANCINI, G. y col. (1.984).
Relationship between estrogen receptors and CMF adjuvant
chemotherapy. En "Clinical Interest of Steroid Hormone
Receptors in Breast Cancer".
Leclercq G, Toma S, Paridaens R, Heuson J.C. Eds. Springer-
Verlag. Berlin. pp: 205-209.
- 24.- BONADONNA, G.; VALAGUSSA, P. (1.983).
Chemotherapy of breast cancer: current views and results.
Radiation Oncology Biol. Phys., 9: 279-297.
- 25.- BONADONNA, G.; VALAGUSSA, P. (1.984).
Contribution of prognostic factors to adjuvant chemotherapy
in breast cancer. En "Recent Results in Cancer Research".
Senn, H.J. Ed. Springer-Verlag. Berlin. pp: 431-437.

- 26.- BONADONNA, G.; VALAGUSSA, P.; ROSSI, A. y col. (1.981).
Multimodal therapy with CMF in resectable breast cancer with positive axillary nodes. The Milan Institute experience. En "Adjuvant Therapy of Cancer III." Salmon S.E. Jones S.E. Eds. Grune and Stratton. New York. pp: 435-444.
- 27.- BONADONNA, G.; VALAGUSSA, P.; ROSSI, A. y col. (1.982).
Multimodal therapy with CMF in resectable breast cancer with positive axillary nodes. The Milan Institute experience.
Rec. Results Cancer Res., 80: 149-156.
- 28.- BONNEY, R.C.; REED, M.J.; JAMES, V.H. (1.985).
Kinetic studies of estradiol 17 β -hidroxy steroid dehydrogenase in MCF-7 mammary cancer cells.
J. Steroid. Biochem., 23: 1079-1081.
- 29.- BRADFORD, M. (1.976).
A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding.
Anal. Biochem., 72: 248-254.
- 30.- BRINCKER, H.; MOURIDSEN, H.T.; ANDERSEN, K.W. (1.983).
Adjuvant chemotherapy with cyclophosphamide or CMF in premenopausal women with stage II breast cancer.
Breast Cancer Res. Treat., 3: 91-95.
- 31.- BRINKLEY, D.; HAYBITTLE, J.L. (1.971).
Treatment of stage II carcinoma of the female breast.
Lancet, 2: 1086.
- 32.- BRINKLEY, D.; HAYBITTLE, J.L. (1.975).
The curability of breast cancer.
Lancet, 1: 95-97.

- 33.- BRODER, L.E.; TORMEY, D.C. (1.974).
Combination chemotherapy of carcinoma of the breast.
Cancer Treat. Rev., 1: 183-203.
- 34.- BROOKS, S.C.; HANSEN, B.R.; SAUNDERS, D.E. y col. (1.984).
Effect of growth on the estrogen receptors levels in MCF-7
cells.
Cancer Res., 44: 3724-3729.
- 35.- BROOKS, S.C.; LOCKE, E.P.; SOULE, H.D. (1.973).
Estrogens receptor in a human cell line (MCF-7) from breast
carcinoma.
J. Biol. Chem., 248: 6521-6523.
- 36.- BRUCE, J. (1.971).
Operable cancer of the breast. A controlled clinical
trial.
Cancer, 28: 1443.
- 37.- BRUCE, W.R.; VAN DER GAAG, H. (1.963).
A quantitative assay for the number of murine lymphoma
cells capable of proliferation in vivo.
Nature, 199: 79-80.
- 38.- BUICK, R.M. (1.984).
The cell renewal hierarchy in ovarian cancer. En "Human
Tumor Cloning".
Salmon, S.E., Trent J.M. Eds. Grune and Shatton. Tucson.
pp: 703-713.
- 39.- BULBROOK, R.D.; GREWOOD, F.C.; HAYWARD, J.L. (1.960).
Selection of breast cancer patients for adrenalectomy or
hypophysectomy by determination of urinary 17-hidroxi-
corticosteroids and ethiocolanalone.
Lancet, 1: 1154-1161.

- 40.- BURTON, K. (1.956).
A study of the conditions and mechanism of the diphenilamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid.
Biochem. J., 62: 315-323.
- 41.- BUTLER, W.B.; KELSEY, W.H. y GORAN, N. (1.981).
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.
- 42.- CAIRNS, J. (1.975):
Mutation selection and the material history of cancer.
Nature, 255: 197-200.
- 43.- THE CANCER RESEARCH CAMPAIGN (1.976).
Management of early cancer of the breast. Report on an international multicentre trial.
Brit. Med. J., 1: 1035.
- 44.- CANELLOS, G.P.; DE VITA, V.T.; LENNARD GOLD, G. y col. (1.974).
Cyclical combination chemotherapy for advanced breast carcinoma.
Br. Med. J., 1: 218-220.
- 45.- CARDA APARICI, P.; GARCIA-BLANCO SALCEDA, P.; CASTEJON CASTAN, L.M. y GRANDAS ALONSO, I. (1.984).
Registro hospitalario de cáncer de mama en 1.977.
Rev. Esp. Oncología, 31: 457-464.
- 46.- CARTER, A.C. (1.977).
Diethylstilbestrol: Recommended dosages for different categories of breast cancer patients. Report of the cooperative breast cancer group.
J.A.M.A., 237: 2079-2085.

- 47.- CARTER, S.K. (1.974).
The chemical therapy of breast cancer.
Semin. Oncol., 1: 131-143.
- 48.- CARTER, S.K.; LIVINGSTON, R. (1.982).
Principles of cancer chemotherapy. En "Principles of
Cancer Treatment".
Carter S.K., Livingston R.B. Eds. McGraw-Hill Book
Company. New York. pp: 95-110.
- 49.- CATO, A.C.B.; GEISSE, S.; WENZ, M. y col. (1.984)
The nucleotide sequences recognized by the glucocorticoid
receptor in the rabbit uteroglobin gene region are located
far upstream from the initiation of transcription.
E.M.B.O. J., 3: 2771-2778.
- 50.- CLARK, R.M. (1.981).
Breast Cancer: 20 years of conservative treatment. En
"Diagnosis and Treatment of Cancer".
Lewinson E.F., Montague A.C.W. Eds. Williams Wilkins.
Baltimore.
- 51.- CLARK, R.M. (1.983).
Alternatives to mastectomy: The Princess Margaret Hospital.
En "Conservative Management of Breast Cancer".
Harris J.R., Hellman S., Silen W. Eds. J.B. Lippincott.
Philadelphia.
- 52.- CLARK, J.H.; ANDERSON, J.N. y PECK, E.J. (1.973).
Estrogen receptor-antiestrogen complex: Atypical binding by
uterine nuclei and effects on uterine growth.
Steroids, 22: 707-717.

- 53.- CLARK, J.H.; HARDIN, J.W.; McCORMACK, S.A. y col. (1.978).
Mechanism of action of estrogen antagonist: Relationship to
estrogen receptor binding and hyperestrogenization. En
"Progress in Cancer Research and Therapy."
Mcguire W.L. Ed. Raven Press. New York. pp: 116-120.
- 54.- CLARK, J.H.; HARDIN, J.W.; UPCHURCH, S. y col. (1.978).
Heterogeneity of estrogen binding sites in the cytosol of
the rat uterus.
J. Biol. Chem., 253: 7630-7634.
- 55.- CLARK, G.M.; McGUIRE, W.L.; HUBAY, C.A. y col. (1.983).
Progesterone receptors as a prognostic factor in stage II
breast cancer.
N. Engl. J. Med., 309: 1343-1347.
- 56.- COLE, M.P. (1.968).
Suppression of ovarian function, in primary breast cancer.
En "Prognostic Factors in Breast Cancer".
Forrest A.P.M., Kunkler P.B. Eds. Livingstone. Edinburgh.
pp: 146-156.
- 57.- COMPTON, J.G.; SCHRADER, W.T. y O'MALLEY, B.W. (1.983).
DNA sequence preference of the progesterone receptor.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 80: 16-20.
- 58.- CONTESSO, G.; DELARUE, J.C.; MAY-LEVIN, F. y col. (1.983).
A critical summary. En "Clinical Interest of Steroid h-
mone Receptors in Breast Cancer."
Leclercq G, Toma S, Paridaens R, Heuson J.C. Eds. Springer-
Verlag. Berlin. pp: 176-177.

- 59.- CONTESSO, G.; MAY-LEVIN, F.; DELARUE, J. y col. (1.984).
Inflammatory tumors of the human breast: Determination of
estrogen and progesterone receptors. En "Clinical Interest
of Steroid Hormone Receptors in Breast Cancer."
Leclercq G, Toma S, Paridaens R, Heuson J.C. Eds. Springer-
Verlag. Berlin. pp: 157-162.
- 60.- COOKE, T.; GEORGE, D.; SHIELDS, R. (1.979).
Estrogen receptors and prognosis in early breast cancer.
Lancet, 1: 995-997.
- 61.- COOPER, R.G.; HOLLAND, J.F.; GLIDEWELL, O. (1.979).
Adjuvant chemotherapy of breast cancer.
Cancer, 44: 793-798.
- 62.- CROTON, R.; COOKE, T.; HOLT, S. y col. (1.981).
Estrogen receptors and survival in early breast cancer.
Br. Med. J., 283: 1289-1291.
- 63.- CUTLER, S.J.; CHRISTINE, B.; BARCLAY, T.H.C. (1.971).
Increasing incidence and decreasing mortality rates for
breast cancer.
Cancer, 28: 1376-1380.
- 64.- CHEN, T.L. y FELDMAN, D. (1.981).
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.
- 65.- CHU, F.C.H. (1.982).
Adjuvant radiotherapy of breast cancer. En "Controversies
in Oncology".
Wiernik P.H. Ed. John Wiley Sons. New York.

- 66.- CHU, F.C.H.; LIN, F.J.; KIM, J.H. y col. (1.976).
Locally recurrent carcinoma of the breast. Results of radiation therapy.
Cancer, 32: 2677-2681.
- 67.- CHU, F.; LUCAS, J.C.; FARROW, J.H.; NICKSON, J.T. (1.967).
Does prophylactic radiation therapy given for cancer of the breast predispose to metastasis?
Am. J. Roentgenol., 99: 944-987.
- 68.- DAHLQUIST, F.W. (1.978).
The meaning of Scatchard and Hill plots. En "Enzyme Structure".
Nielsen & Reynolds. Eds. Academic Press. New York. cap: 13.
- 69.- DEVLEESCHOUWER, N. (1.983).
Evaluation de l'activité antitumorale des molécules se liant au récepteur d'oestrogène dans les tumeurs mammaires.
Thèse du Grade de Docteur. Université Libre de Bruxelles.
- 70.- DEVLEESCHOUWER, N.; OLEA, N.; LECLERQ, G. y col. (1.986).
Induction of progesterone receptor in an estrogen, progesterone receptor-negative breast cancer cell line.
J. Steroid. Biochem. 24: 365-368.
- 71.- DOUGLAS, W.H.J. y DELL'ORCO, R.T. (1.979).
Physical aspects of a tissue culture laboratory. En "Cell Culture. Methods in Enzymology." Vol. LVIII.
Jakoly W.B., Pastan I.H. Eds. Academic Press. New York. pp: 3-17.
- 72.- ECKERT, R.L.; MULLICK, A.; RORKE, E. y col. (1.984).
Estrogen receptor synthesis and turnover in MCF-7 breast cancer cells measured by a density shift technique.
Endocrinology, 114: 629-637.

- 73.- EDLAND, R.W. y col. (1.969).
Postoperative irradiation in breast cancer. Evaluation of
291 cases treated at the University of Wisconsin Medical
Center from 1.952 through 1.961.
Radiology, 93: 1969.
- 74.- ENGEL, L.W.; YOUNG, N.A. (1.978).
Human breast carcinoma cells in continuous culture: a
review.
Cancer Res., 38: 4327-4339.
- 75.- ENGEL, L.W.; YOUNG, N.A.; FRALKA, T.S. y col. (1.978).
Human breast carcinoma cells in continuous culture:
Establishment and characteristics of three new lines.
Cancer Res., 38: 3352-3359.
- 76.- EXPOSITO, J. (1.984).
Caracterización bioquímica y métodos de estudio de los
receptores de estrogénos. Ensayos experimentales y
aplicaciones clínicas.
Tesis doctoral. Facultad de Medicina. Universidad de
Granada.
- 77.- EXPOSITO, J.; OLEA, N.; RUIZ DE ALMODOVAR, M. y col. (1.984).
Estudio de las formas moleculares del receptor de
estrógeno. Aplicaciones clínicas.
Rev. Esp. Med. Nuclear, 3: 233-246.
- 78.- FIALKOW, P.J. (1.982).
Cell lineages in hematopoietic neoplasia studied with
glucose-6-deshidrogenase cell markers.
J. Cell Physiol. (suppl.), 11: 37-43.

- 79.- FISHER, B. (1.984).
The clinical scientific basic of adjuvant chemotherapy in breast cancer. En "Recent Results in Cancer Research". Senn M.J. Ed. Springer-Verlag. Berlin. pp: 102-107.
- 80.- FISHER, B.; BAUER, N.; WICKERHAM, L. y col. (1.983).
Relation of numbers of positive axillary nodes to the prognosis of patients with primary breast cancer. An NSABP update.
Cancer, 52: 1551-1557.
- 81.- FISHER, B.; CARBONE, P.; ECONOMON, S.G. y col. (1.975).
L-Phenylalanine mustard (L-PAM) in the management of primary breast cancer.
N. Eng. J. Med., 292: 117-122.
- 82.- FISHER, B.; MONTAGUE, E.D. y col. (1.977).
Comparison of radical mastectomy with alternative treatments for primary breast cancer. A first report of results from a prospective randomized clinical trial.
Cancer, 39: 2827-2834.
- 83.- FISHER, B.; REDMOND, C. (1.977).
Studies of the National Surgical Adjuvant Breast Project. En "Adjuvant Therapy of Cancer".
Salmon S.E., Jones S.E. Eds. Elsevier. North Holland. Amsterdam.
- 84.- FISHER, B.; REDMOND, C.; BROWN, A. (1.983).
Influence of tumor estrogen and progesterone receptor levels on the response to tamoxifen and chemotherapy in primary breast cancer.
J. Clin. Oncol., 1: 227-241.

- 85 - FISHER, B.; REDMOND, C.; LIV, H. y col. (1.980).
Collaborating NSABP investigators: Correlation of estrogen receptor and pathologic characteristics of invasive breast cancer.
Cancer Res., 45: 349-353.
86. - FISHER, B.; REDMOND, C.; WOLMARK, N.; WIELAND, H. S. (1.981).
Disease-free survival at intervals during and following completion of adjuvant chemotherapy: The NSABP experience from three breast cancer protocols.
Cancer, 48: 1273-1280.
87. - FISHER, B.; SLACK, N.; KATRYCH, D. y col. (1.975).
Ten year follow-up results of patients with carcinoma of the breast in a cooperative clinical trial evaluating surgical adjuvant chemotherapy.
Surgical Gynecol. Obstet., 140: 528-534.
88. - FITZPATRICK, S.; LaCHANCE, M. y SCHULTZ, G. (1.984).
Characterization of epidermal growth factor receptor and action on human breast cancer cell in culture.
Cancer Res., 44: 3442-3447.
89. - FLETCHER, G.H. (1,971).
Control by irradiation of peripheral lymphatic disease in breast cancer.
Am. J. Roentgenol., 111: 115.
90. - FLEICHER, G.H. (1,972).
Local results of irradiation in the primary management of localized breast cancer.
Cancer, 29: 545-552.
91. - FLETCHER, G.H. (1,976).
Reflections on breast cancer.
Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., 1: 769.

- 92.- FOLCA, F.J.; GLASCOCK, R.F.; IRVINE, W.T. (1.961).
Studies with tritium labelled hexoestrol in advanced breast cancer.
Lancet, 2: 796-803.
- 93.- FORREST, A.P.M. (1.970).
A controlled clinical trial of conservative treatment for early cancer.
Proc. Roy. Soc. Med., 63: 107.
- 94.- FORREST, A.P.M. (1.980).
Conservative management of breast cancer. A review of British controlled trials
Ann. Roy. Coll. Surg. Engl., 62: 41.
- 95.- FREIFELD, M.L.; FEIL, P.D.; BARDIN, C.W. (1.974).
The in vivo regulation of the progesterone receptor in Guinea pig uterus: Dependence on estrogen and progesterone.
Steroids, 23: 93-103.
- 96.- FRESHNEY, R.I. (1.983).
The culture environment. Media and supplements. En "Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique".
Liss, A.R. Ed. New York. pp: 67-77.
- 97.- GANAPATHI, R.; REITER, W.; KRISHAN, A. (1.982).
Intracellular adriamycin levels and cytotoxicity in adriamycin-sensitive and adriamycin-resistant P-388 mouse leukemia cells.
J. Natl. Cancer., 68: 1027-1032.
- 98.- GARINSKI, P.V.; DONEGAN, W.L. (1.980).
Estrogen receptors and breast cancer: Prognostic and therapeutic implications.
Surg., 88: 386-393.

- 99.- GENTILI, C.; SANFILIPPO, O.; SILVESTRINI, P. (1.981).
Cell proliferation in relation to clinical features and relapse in breast cancer.
Cancer, 48: 974-979.
- 100.- GLICKSMAN, A.S. (1.982).
Does Adjuvant Radiotherapy improve the outcome of breast cancer treatment? In "Controversies in Oncology".
Wernik P.H. Ed. John Wiley Sons. New York.
- 101.- GLUCKSBERG, H.; RIVKIN, S.E.; RASMUSSEN, S. (1.982).
Combination chemotherapy (CMFVP) versus L-phenylalanine mustard (L-PAM) for operable breast cancer with positive axillary nodes.
Cancer, 50: 423-434.
- 102.- GOLDENBERG, L.S. (1.973).
Androgen therapy for advanced breast cancer in women: A report of the Cooperative Breast Cancer Group.
J.A.M.A., 223: 1267-1274.
- 103.- GOLDIE, J.E.; GOLDMAN, A.J. (1.979).
A mathematic model for relating the drug sensitivity of tumors to their spontaneous mutation rate.
Cancer Treat. Rep., 63: 1727-1733.
- 104.- GOLDIE, J.E.; GOLDMAN, A.J. (1.983).
Quantitative model for multiple levels of drug resistance in clinical tumors.
Cancer Treat. Rep., 67: 923-931.

- 105.- GREEN, M.D.; WHYBOURNE, A.M., TAYLOR, I.W. y col. (1.981).
Effects of antiestrogens on the growth and cell cycle kinetics of cultured human mammary carcinoma cells. En "Non Steroidal Antiestrogens."
Sutherland R.L., Jordan V.C. Eds. Academic Press. Sydney. pp: 319-412.
- 106.- GREENE, G.L. y PRESS, M.F. (1.986).
Steroid receptor structure (including monoclonal antibodies and new methods of determination). Structure and dynamics of the estrogen receptor.
J. Steroid. Biochem., 24: 1-7.
- 107.- GREENWOOD, M. (1.926).
The natural duration of cancer
Reports on Public Health and Medical Subjects. His Majesty's Stationery Office.
- 108.- GRIFFITHS, K.; BLAMEY, R.W.; CAMPBELL, F.C. y col. (1.983).
The prognostic value of steroid receptors in early breast cancer.
Rev. Endocrine Related Cancer (suppl.), 13: 33-38.
- 109.- HALL, T.C. (1.977).
Prediction of responses to therapy mechanisms of resistance.
Semin. Oncol., 4: 193-197.
- 110.- HALSTED, W.S. (1.907).
The results of radical operations for the cure of cancer of the breast.
Ann. Surg., 46: 19.

- 111.- HAM, R.G.; McKEEHAN, W.L. (1.979).
Media and growth requirements. En "Cell Culture. Methods in Enzimology".
Jakoly W.B., Pastan I.H. Eds. Academic Press. New York. pp: 44-93.
- 112.- HAMBURGER, A.W. (1.981).
Use of in vitro tests in predictive cancer chemotherapy.
J. Natl. Cancer Int., 66: 981-988.
- 113.- HAMBURGER, A.W.; SALMON, S.E. (1.977).
Primary bioassay of human tumor stem cell.
Science, 197: 461-463.
- 114.- HAMBURGER, A.W.; SALMON, S.E.; KIM, M.B. y col. (1.978).
Direct cloning of human ovarian carcinoma cells in agar.
Cancer Res., 38: 3438-3444.
- 115.- HANDLEY, R.S. (1.976).
The conservative radical mastectomy of Patey: 10 year results in 425 patients.
Breast Dis. Breast, 2: 16-19.
- 116.- HARRIS, J.R.; HELLMAN, S. (1.983).
The results of primary radiation therapy for early breast cancer at the Joint Center Breast Cancer.
Harris J.R., Hellman S., Silen W. Eds. J.B. Lippincott. Philadelphia.
- 117.- HARRIS, J.R.; LEVENE, M.B.; HELLMAN, S. (1.981).
Primary radiation therapy for early breast cancer: The experience of the Joint Center for Radiation Therapy. En "Diagnosis and Treatment of Cancer".
Lewinson E.F., Montague A.C.W. Eds. Williams Wilkins. Baltimore.

- 118.- HARVEIT, F.; MAARTMANN-MOE, H.; STOA, K.F. y col. (1.980).
Early recurrence in estrogen receptor negative breast
carcinomas.
Acta Chir. Scand., 146: 93-95
- 119.- HAYWARD, J.L. (1.977).
The Guy's trial of treatment of early breast cancer.
World J. Surg., 1: 314-316.
- 120.- HELLMAN, S.; HARRIS, J.R.; LEVENE, M.B. (1.980).
Radiation therapy of early carcinoma of the breast without
mastectomy.
Cancer, 46: 988-994.
- 121.- HENDERSON, D.; CANELLOS, P. (1.980).
Cancer of the breast the past decade. First of two parts.
N. Engl. J. Med., 302: 17-30.
- 122.- HERMAN, R.E.; STEIGER, E. (1.978).
Modified radical mastectomy.
Surg. Clin. North Am., 58: 743-754.
- 123.- HEUSER, L.; SPRATT, J.; FOLK, H. y col. (1.979).
Growth rates of primary breast cancer.
Cancer, 43: 1888-1894.
- 124.- HOKANSON, J.A.; BROWN, B.W.; THOMPSON, J.R. et al (1.986).
Mathematical model for human myeloma relating growth
kinetics and drug resistance.
Cell. Tissue Kinet., 19: 1-10.
- 125.- HORAN HAND, P.; NUTI, M.; COLCHER, D. y col. (1.983).
Definition of antigenic heterogeneity and modulation among
human mammary carcinoma cell populations using monoclonal
antibodies to tumor associated antigens.
Cancer Res., 43: 728-735.

- 126.- HORWITZ, K.B.; COSTLOW, M. y McGUIRE, W.L. (1.975).
A human breast cancer cell line with estrogen, androgen,
progesterone and glucocorticoid receptors.
Steroids, 26: 785-795.
- 127.- HORWITZ, K.B.; McGUIRE, W.L. (1.978).
Nuclear mechanisms of estrogen action: Effects of estradiol
and antiestrogens on estrogens receptors and nuclear
receptor processing.
J. Biol. Chem., 253: 8185-8191.
- 128.- HORWITZ, K.B.; McGUIRE, W.L. (1.978).
Estrogen control of progesterone receptor in human breast
cancer: Correlation with nuclear processing of estrogen
receptor.
J. Biol. Chem., 253: 2223-2228.
- 129.- HORWITZ, K.B.; ZAVA, D.T.; THILAGAR, A.K. y col. (1.978).
Steroid receptor analysis of nine human breast cancer cell
lines.
Cancer Res., 38: 2434-2437.
- 130.- HOST, H.; BRENNHOVD, J.O. (1.977).
The effect of postoperative radiotherapy in breast cancer.
Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., 2: 1061-1067.
- 131.- HOWELL, A.; BARNES, D.M.; HARLAND, R.W.L. y col. (1.984).
Steroid hormone receptors and survival after first relapse
in breast cancer.
Lancet, 1: 588-591.
- 132.- HUBAY, C.A.; PEARSON, O.H.; MANNI, A. y col. (1.985).
Adjuvant endocrine therapy, cytotoxic chemotherapy and
immunotherapy in stage II breast cancer: 6 years results.
J. Steroid. Biochem., 23: 1147-1150.

- 133.- JAKESZ, R.; SMITH, C.A.; AITKEN, S. y col. (1.984).
Influence of cell proliferation and cell cycle phase on
expression of estrogen receptor in MCF-7 breast cancer
cells.
Cancer Res., 44: 619-625.
- 134.- JENSEN, E.V.; JACOBSON, H.I. (1.962).
Basic guides to mechanism of estrogen action.
Recent. Prog. Horm. Res., 18: 387-393.
- 135.- JENSEN, E.V.; JACOBSON, H.I.; FLESHER, J.V. y col. (1.966).
Estrogen receptors in target tissues. En "Steroid Dina-
mics."
Nakao T, Pincus G., Tait J.F. Eds. Academic Press. New
York. pp: 133.
- 136.- JENSEN, E.V.; De SOMBRE, E.R.; JUNGBLUT, P.N. (1.967).
Estrogen receptors in hormone-responsive tissue and tumors.
En "Endogenous Factors Influencing Host-tumor Balance".
Wisler R.W., Dao T.L., Wood S. Eds. University of Chicago
Press. Chicago. Illinois. pp: 15-30.
- 137.- JENSEN, E.V.; SUZUKI, T.; KAWASHIMA, T. y col. (1.968).
A two step mechanism for the interaction of estradiol with
rat uterus.
Biochem., 59: 632-638.
- 138.- JONES, S.E.; SALMON, S.E.; ALLEN, H. y col. (1.982).
Adjuvant treatment of node positive breast cancer with
adriamycin-cyclophosphamide with o without radiation
therapy: interim results of an ongoing clinical trial.
Recent. Results. Cancer Res., 80: 162-169.

- 139.- JOST, J.P.; GEISER, M. y SELDRAN, M. (1.985).
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.
- 140.- JOUVE, M.; PALANGIE, T.; DORVAL, T. y col. (1.986).
Cancer du sein: Evolution de la concentration en récepteurs hormonaux sous chimiothérapie cytotoxique.
Bull. Cancer (Paris), 73: 271-278.
- 141.- JOZAN, S.; GAY, G.; MARQUES, B. y col. (1.985).
Estradiol is effective in stimulating ³H-thymidine incorporation but not on proliferation of breast cancer cultured cells.
Cell Tissue Kinet., 18: 457-464.
- 142.- KAAE, S.; JOHANSEN, H. (1.952).
Breast cancer. Five year results of two random series of simple mastectomy with postoperative irradiation versus extended radical mastectomy.
Am. J. Roentgenol., 87: 82.
- 143.- KAAE, S.; JOHANSEN, H. (1.968).
Simple versus radical mastectomy in primary breast cancer. En "Prognostic Factors in Breast Cancer".
Forrest A.P.M., Kunkler P.B. Eds. Livingstone. Edinburgh.
- 144.- KAAE, S.; JOHANSEN, H. (1.969).
Simple mastectomy plus postoperative irradiation by the method of McWhirter for mammary carcinoma.
Ann. Surg., 6: 895.
- 145.- KAPLAN, E.L. y MEIER, P. (1.958).
Nonparametric estimation from incomplete observations.
J. Am. Statistics. Assoc., 53: 457-481.

- 146.- KARTNER, N.; RIORDAN, J.R.; LING, V. (1.983).
Cell surface P-glicoprotein associated with multidrug
resistence in mammalian cell lines.
Science, 13: 1283-1285.
- 147.- KATZENELLENBOGEN, E.S. (1.980).
Dynamics of steroid hormone receptor action.
Ann. Rev. Physiol., 42: 17-24.
- 148.- KENNEDY, B.J. (1.965).
Diethylstilbestrol versus testosterone propionate therapy in
advanced breast cancer.
Surg. Gynecol. Obstet., 120: 1246-1251.
- 149.- KERBEL, R.S.; FROST, P.; LITESH, R. y col. (1.984).
Possible epigenetic mechanisms of tumor progression.
J. Cell. Physiol., 3: 87-97.
- 150.- KERN, W.H. (1.979).
Morphologic and clinical aspects of estrogen receptors in
carcinoma of the breast.
Surg. Gynecol. Obstet., 148: 240-242.
- 151.- KIANG, D.T.; FRENNING, D.H.; GOLMAN, A.I. y col. (1.978).
Estrogen receptor and responses to chemotherapy and
hormonal therapy in advanced breast cancer.
N. Engl. J. Med., 299: 1330-1334.
- 152.- KING, W.J. y GREENE, G.L. (1.984).
Monoclonal antibodies localize estrogen receptor in the
nuclei of target cells.
Nature, 307: 745-747.

- 153.- FINNE, D.W.; ASHIKARI, R.; BUTLER, A. y col. (1.981).
Estrogen receptor protein in breast cancer as predictor of recurrence.
Cancer, 47: 2364-2367.
- 154.- KNIGHT, W.A.; LIVINGSTON, R.B.; GREGORY, E.J. y col. (1.977).
Estrogen receptors as an independent prognostic factor for early recurrence in breast cancer.
Cancer Res., 37: 4669-4671.
- 155.- KOSCIELNY, S.; TUBIANA, M.; LE, M.G. y col. (1.984).
Breast cancer: Relationship between the size of primary tumor and the probability of metastatic dissemination.
Br. J. Cancer, 49: 709-715.
- 156.- KOSCIELNY, S.; TUBIANA, M.; VALLERON, A.J. (1.985).
A simulation model of the natural history of human breast cancer.
Br. J. Cancer, 52: 515-524.
- 157.- KOYAMA, H.; WADA, T.; TAKAHASHI, Y. y col. (1.980).
Surgical adjuvant chemotherapy with mitomycin C and cyclophosphamide in Japanese patients with breast cancer.
Cancer, 46: 2373-2379.
- 158.- LAGIOS, M.D. (1.983).
Estrogen Receptors. Significance and current status. En "Frontiers of Radiation Therapy and Oncology".
Vaeth J.M. Ed. Karger. Basel.
- 159.- LARA JIMENEZ, P. (1.987).
Radioterapia en cáncer de mama.
Tesis doctoral. Facultad de Medicina. Universidad de Granada. Trabajo en curso.

- 160.- De LENA, M.; BRAMBILLA, C.; MORABITO, A. y col. (1.975).
Adriamycin plus vincristine compared to and combined with cyclophosphamide, methotrexate and 5-fluoruracil for advanced breast cancer.
Cancer, 35: 1108-1115.
- 161.- LESSER, M.L.; ROSEN, P.P.; SENIE, R.T. y col. (1.981).
Estrogen and progesterone receptors in breast carcinoma correlation with epidemiology and pathology.
Cancer 48: 299-309.
- 162.- LEVINE, P.H.; TABBANE, F.; MULLZ, L.R. y col. (1.984).
Hormone receptors in rapidly progressing breast cancer.
Cancer, 54: 3012-3016.
- 163.- LIKKESFELDT, A.; LARSEN, J.; CHRISTENSEN, I. y col. (1.984).
Effects of the antiestrogen tamoxifen on the cell cycle kinetics of the human breast cancer cell line MCF-7.
Br. J. Cancer, 49: 717-722.
- 164.- LINEWEAVER, H.; BURK, D. (1.934).
The determination of enzyme dissociation constants.
J. Am. Chem. Soc. 56: 658-666.
- 165.- LING, I. y LIAO, S. (1.974).
Association of the uterine 17- β -estradiol-receptor complex with ribonucleoprotein in vitro and in vivo.
J. Biol. Chem., 249: 4671-4678.
- 166.- LIPPMAN, M.E. (1.985).
Tratamiento sistémico adyuvante en el cáncer de mama. En "Avances en Oncología 1985".
De Vita V., Hellman S., Rosenberg S.A. Eds. Espaxs. Barcelona. pp: 309-330.

- 167.- LIPPMAN, M.E.; ALLEGRA, J.C.; THOMPSON, E.B. y col. (1.978).
The relation between estrogen receptors and response rate to cytotoxic chemotherapy in metastatic breast cancer.
N. Engl. J. Med., 298: 1223-1228.
- 168.- LIPPMAN, M.; BOLAN, G.; HUFF, K. (1.976).
The effects of estrogens and antiestrogens on hormone-responsive human breast cancer cells in culture.
Cancer Res., 36: 4595-4601.
- 169.- LIPPMAN, M.; BOLAN, G.; HUFF, K. (1.976).
The effects of glucocorticoids and progesterone on hormone responsive human breast cancer in long term tissue culture.
Cancer Res., 36: 4602-4609.
- 170.- LIPPMAN, M.; BOLAN, G.; HUFF, K. (1.976).
Interaction of antiestrogens with human breast cancer in long term tissue culture.
Cancer Treat. Rep., 60: 1421-1430.
- 171.- LIPPMAN, M.; BOLAN, G.; HUFF, K. (1.976).
The effects of androgens and antiestrogens on hormone responsive human breast cancer in long term tissue culture.
Cancer Res., 36: 4610-4618.
- 172.- LIPPMAN, M.; DICKSON, R.; BATES, S. y col. (1.986).
Autocrine and paracrine growth regulation of human breast cancer.
Breast Cancer Res. and Treat., 7: 59-70.
- 173.- LIPPMAN, M.E.; DICKSON, R.B.; KASID, A. y col. (1.986).
Autocrine and paracrine growth regulation of human breast cancer.
J. Steroid. Biochem., 24: 147-154.

- 174.- LIPPMAN, M.E.; OSBORNE, C.K.; KNAZEK, R. y col. (1.977).
In vitro model systems for the study of hormone dependent breast cancer.
N. Engl. J. Med., 296: 154-159.
- 175.- LOPEZ-GONZALEZ, J.D. (1.987).
Factores determinantes y mecanismos de liberación de TPA en líneas tumorales experimentales de cáncer de mama.
Tesis Doctoral. Facultad de Medicina. Universidad de Granada.
- 176.- LURIA, S.E.; DELBRUCK, M. (1.943).
Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance.
Genetics, 28: 491-511.
- 177.- MADDOX, W.A.; CARPENTER, J.T.; LAWS, H.L. y col. (1.983).
A randomized prospective trial of radical (Halsted) mastectomy versus modified radical mastectomy in 311 breast cancer patients.
Ann. Surg., 198: 207-212.
- 178.- MASON, B.H. (1.983).
Progesterone and estrogen receptor as prognostic variables in breast cancer.
Cancer Res., 43: 2985-2991.
- 179.- MAURIAC, L.; WAFFLART, J.; TROJANI, M. y col. (1.983).
Les cancers du sein inflammatoires : Corrélation entre anatomopathologie et dosage des récepteurs stéroïdiens.
Bull. Cancer (Paris), 70: 160-164.
- 180.- MAYNARD, P.V.; BLAMEY, R.W.; ELSTON, C.W. y col. (1.978).
Estrogen receptor assay in primary breast cancer and early recurrence of the disease.
Cancer Res., 38: 4292-4295.

- 181.- MAYNARD, P.V.; DAVIES, C.J.; BLAMEY, R.W. y col. (1.978).
Relationship between estrogen receptor and histological grade in human primary breast tumors.
Br. J. Cancer, 38: 745-748.
- 182.- McGUIRE, W.L. (1.978).
Hormone receptors: Their role in predicting prognosis and response to endocrine therapy.
Semin. Oncol. 5: 428-433.
- 183.- McGUIRE, W.L. (1.978).
Steroid receptors in human breast cancer. En "Hormones Receptors and Breast Cancer".
McGuire W.L. Ed. Raven Press. New York. pp: 41-43.
- 184.- McGUIRE, W.L. (1.980).
Steroid hormone receptors in breast cancer: Treatment strategy.
Recent. Prog. Hormone Res., 36: 135-156.
- 185.- McGUIRE, W.L.; CARBONE, P.P. y VOLLMER, E.P.. (1.975).
Estrogen Receptors in Human Breast Cancer.
McGuire W.L., Carbone P.P., Vollmer E.P. Eds. Raven Press.
New York. pp: 1-284.
- 186.- MEAKIN, J.W. y col. (1.977).
Ovarian irradiation and prednisone following surgery for carcinoma of the breast. En "Adjuvant Therapy of Cancer".
Salmon S.E., Jones S.E. Eds. North Holland, Amsterdam.
- 187.- MEAKIN, J.W. (1.980).
Adjuvant endocrine therapy of breast cancer. En "Recent Results in Cancer Research".
Springer Verlag. Berlin. pp: 178.

188. - MEYER, J.S.; FRIEDMAN, E.; McGRAVE, M.M. y col. (1.983).
Prediction of early course of breast carcinoma by thymidine
labelling.
Cancer, 51: 1879-1886.
189. - MEYER, J.S.; HIXON, B. (1.979).
Advanced stage and early relapse of breast carcinoma
associated with high thymidine labelling indices.
Cancer Res., 39: 4042-4047.
190. - MEYER, J.S. y LEE, J.Y. (1.980).
Relationships of S-phase fraction of breast carcinoma in
relapse to duration of remission, estrogen receptor
content, therapeutic responsiveness and duration of
survival.
Cancer Res., 40: 1890-1896.
191. - MEYER, J.S.; RAMANATH, B.; STEVENS, S.C. y col. (1.977).
Low incidence of estrogen receptor in breast carcinoma with
rapid rates of cellular replication.
Cancer, 40: 2290-2298.
192. - MILLER, M.A. y KATZENELLENBOGEN, B.S. (1.983).
Characterization and quantitation of antiestrogen binding
sites in estrogen receptor positive and negative human
breast cancer cell lines.
Cancer Res., 43: 309.
193. - MONTAGUE, E.D. (1.977).
The integration of radiotherapy in the treatment of breast
cancer. "Refresher course".
The Radiological Society of North America. Chicago.

- 194.- MONTAGUE, E.D.; FLETCHER, G.H. (1.980).
The curative value of irradiation in the treatment of non disseminated breast cancer.
Cancer, 46: 995.
- 195.- MONTAGUE, E.D.; GUTIERREZ, A.E.; BARKER, J.L. y col. (1.979).
Conservative surgery and irradiation for the treatment of favorable breast cancer.
Cancer, 43: 1058-1061.
- 196.- MONTAGUE, E.D.; PAULUS, D.D.; SCHELL, S.R. (1.982)
Selection and follow-up of patients for conservation. En "Frontiers of Radiation Therapy and Oncology".
Montague E.D., Shell S.R., Romsdahl M.M. Eds. Karger. Basel.
- 197.- MONTAGUE, E.D.; ROMSDAHL, M.M.; SCHELL, S.R.; AMES, F.C. (1.983).
Conservation surgery and irradiation in clinically favorable breast cancer. The M.D. Anderson Experience. En "Conservative Management of breast cancer".
Harris J.R., Hellman S., Silen W. Eds. J.B. Lippincott. Philadelphia.
- 198.- MOON, T.H. (1.981).
The development of a natural history data base for breast cancer. En "Adjuvant Therapy of cancer".
Salmon S.E., Jones S.E. Eds. Grune and Stratton. New York. pp: 471-484.
- 199.- MORAN, R.E.; BLACK, M.M.; ALPERT, L. y col. (1.984).
Correlation of cell-cycle kinetics, hormone receptors, histopathology and nodal status in human breast cancer.
Cancer, 54: 1586-1590.

- 200.- MORRISON, J.M.; HOWELL, A.; GRIEVE, R.J. y col. (1.981).
The West Midlands Oncology Association trials of adjuvant chemotherapy for operable breast cancer. En "Adjuvant Therapy of Cancer III".
Salmon S.E., Jones S.E. Eds. Grune and Stratton. New York.
pp: 403-410.
- 201.- MUELLER, C.B.; JEFFRIES, W. (1.975).
Cancer of the breast. Its outcome as measured by the rate of dying and causes of death.
Ann. Surg., 182: 334-341.
- 202.- MUSTAKALLIO, S. (1.954).
Treatment of breast cancer by tumor extirpation and roentgen therapy instead of radical operation.
J. Fac. Radiol., 6: 23-26.
- 203.- MUSTAKALLIO, S. (1.972).
Conservative treatment of breast cancer Review of 25 years follow-up.
Clin. Radiol., 23: 110-116.
- 204.- NENCI, I. (1.981).
Estrogen receptor cytochemistry in human breast cancer: Status and prospects.
Cancer, 48: 2674-2686.
- 205.- NENCI, I. (1.985).
Expression and modulation of estrogen receptors in human breast cancer.
J. Steroid. Biochem., 23: 1093-1096.
- 206.- NISSEN-MEYER, R. (1.964).
Prophylactic endocrine treatment of carcinoma of the breast.
Clin. Radiol., 15: 152-159.

- 207.- NOMURA, Y.; TASHIRO, H. y SHINOZUKA, K. (1.985).
Changes of steroid hormone receptor content by chemotherapy
and/or endocrine therapy in advanced breast cancer.
Cancer, 55: 546-551.
- 208.- OLEA, N.; DEVLEESCHOUWER, N.; LECLERCQ, G. y col. (1.985).
Assay for estrogen and progesterone receptors of breast
cancer cell lines in monolayer culture.
Eur. J. Cancer Clin. Oncol., 21: 965-973.
- 209.- OLEA, N.; VILLALOBOS, M.; THOMAS, J. y col. (1.987).
Cinética de proliferación en cultivos celulares MCF-7.II.
Sincronización y reclutamiento celular hormonalmente
inducidos.
Rev. Esp. Fisiol., 43: 18-68.
- 210.- OLSON, J.E.; TAYLOR, S.G.; KALISH, L.A. (1.982).
A randomized comparison of observation v.s. CMFP v.s. CMFPT
adjuvant chemohormonotherapy of node positive postmenopau-
sal breast cancer. An E.C.O.G. trial.
Breast Cancer Res. Treat., 3: Abstr. 1.
- 211.- OSBORNE, C.K.; HAMILTON, B. y NOVER, M. (1.982).
Receptor binding and processing of epidermal growth factors
by human breast cancer cells.
J. Clin. Endocrinol. Metabcl., 55: 86-93.
- 212.- OSBORNE, C.K.; HAMILTON, B.; TITUS, G. y col. (1.980).
Epidermal growth factor stimulation of human breast cancer
cells in culture.
Cancer Res., 40: 23-61.

- 213.- PARDEE, A.B. (1.982).
Principles of cancer biology: Cell biology and biochemistry of cancer. En "Cancer Principles and Practice of Oncology".
De Vita V., Hellman S., Rosenberg S.A. Eds. Lippincott Company. Philadelphia. pp: 59-72.
- 214.- PATERSON, R.; RUSSELL, M.H. (1.959).
Clinical trials in malignant disease. III. Evaluation of postoperative radiotherapy.
J. Fac. Radiol. (Lond.), 10: 175.
- 215.- PATEY, D.H.; DRYSON, W.K. (1.948).
The prognosis of carcinoma of the breast in relation to the type of operation performed.
Br. J. Cancer, 2: 7-13.
- 216.- PAYVAR, F.; De FRANCO, D.; FIRESTONE, G.L. y col. (1.983).
Sequence specific binding of glucocorticoid receptor to MTV DNA at sites within and upstream of the transcribed region.
Cell., 35: 381-392.
- 217.- PEDRAZA, V.; GARCIA, J.L.; RUIZ de ALMODOVAR, M. y col. (1.985).
Tratamiento radioterápico del cáncer de mama.
Ponencia a la XVIII Reunión Nacional de Ginecólogos Españoles.
- 218.- PETERS, M.V. (1.977)).
Wedge resection with or without radiation in early breast cancer.
Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., 2: 1151-1156.

- 219.- PETERSON, J.A.; CERIANI, R.L.; BLANK, E.W. y col. (1.983).
Comparison of rates of phenotypic variability in surface antigen expression in normal and cancerous human breast epithelial cells.
Cancer Res., 43: 4291-4296.
- 220.- PRESS, M.F. y GREENE, G.L. (1.984).
An immunocytochemical method for demonstrating estrogen receptor in human uterus using monoclonal antibodies to human estrophilin.
Lab. Invest., 50: 480-486.
- 221.- PRESS, M.F.; NOUSEK-GOEBL, N.A. y GREENE, G.L. (1.985).
Immunelectron microscopic localization of estrogen receptor with monoclonal estrophilin antibodies.
J. Histochem. Cytochem., 33: 915-924.
- 222.- PROSNITZ, L.R.; GOLDENBERG, I.S.; PACKARD, R.A. y col. (1.977).
Radiation therapy as initial treatment for early stage cancer of the breast without mastectomy.
Cancer, 39: 917-923.
- 223.- PUCA, G.A.; SICA, V. y NOLA, E. (1.974).
Identification of high affinity nuclear acceptor site for estrogen receptor of calf uterus.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 71: 979-983.
- 224.- RAO, G.S. (1.980).
Mode of entry of steroid and thyroid hormones into cells.
Mod. Cel. Endocrinol., 21: 97-108.
- 225.- RAVDIN, R.G.; LEWISON, E.F.; SLACK, N.M. (1.970).
Results of a clinical trial concerning the prophylactic oophorectomy for breast cancer.
Surg. Gynecol. Obstet., 131: 1055-1062.

- 226.- REMINGTON, R.D. y SHORK, M.A. (1.974).
Demografia y estadística del estado civil. En "Estadística Biométrica y Sanitaria."
Prentice-Hall International. Englewood Cliffs. New Jersey.
pp: 297-321.
- 227.- RICH, M.A.; PURMANSKI, P.; BROOKS, S.C. (1.978).
Prognostic value of estrogen receptors determinations in patients with breast cancer.
Cancer Res., 38: 4296-4298.
- 228.- RISSANEN, P.M. (1.969).
A comparison of conservative and radical surgery combined with radiotherapy in the treatment of stage I carcinoma of the breast.
Brit. J. Radiol., 42: 423.
- 229.- ROBERTS, A.N.; HAHNEL, R. (1.981).
Estrogen receptor assay and morphology of breast cancer.
Pathology, 13: 317-325
- 230.- ROBINSON, G.N.; VAN HEERDEN, J.A.; PAYNE, W.S. y col. (1.976).
The primary surgical treatment of carcinoma of the breast: A changing trend toward modified radical mastectomy.
Mayo Clin. Proc., 51: 433-442.
- 231.- RUBENS, R.D. (1.982).
Adjuvant chemotherapy for stage II breast cancer. International Conference on Advances. En "Adjuvant Therapy of Cancer".
Abstract, June 1.982.
- 232.- RUBENS, R.D.; HAYWARD, J.L.; KNIGHT, R.K. y col. (1.983).
A controlled trial of adjuvant chemotherapy for breast cancer using melphalan.
Lancet, 1: 839-843.

- 233.- RUDLAND, P.S.; HUGHES, C.M.; TWISTON DAVIES, A.C. y col. (1.983).
Immunocytochemical demonstration of hormonally regulable casein in tumors produced by a rat mammary stem cell line.
Cancer Res., 43: 3305-3309.
- 234.- SAEZ, S. y CHOUVET, C. (1.984).
Influence of endogenous hormone levels on tumor estradiol and progesterone receptors. En "Clinical Interest of Steroid Hormone Receptors in Breast Cancer."
Leclercq G, Toma S, Paridaens R, Heuson J.C. Eds. Springer-Verlag, Berlin. pp: 150-156.
- 235.- SAEZ, S.; MARTIN, P.M. y CHOUVET, C.D. (1.978).
Estradiol and progesterone receptors levels in human breast adenocarcinoma in relation to plasma estrogen and progesterone levels.
Cancer Res., 38: 3468-3473.
- 236.- SAGER, R. (1.985).
U.I.C.C. study group in basic and research: Genomic changes and the origin of neoplasie.
Int. J. Cancer., 35: 1-4.
- 237.- SALMON, S.E.; HAMBURGER, A.W.; SOEKALEN, V. y col. (1.978).
Quantitation of differential sensitivity of human tumor stem cells to anticancer drugs.
N. Engl. J. Med., 298: 1321-1327.
- 238.- SALOMON, D.S.; ZWIEBEL, J.A.; BANC, M. y col. (1.984).
Presence of transforming growth factors in human breast cancer cells.
Cancer Res., 44: 4069-4077.
- 239.- SAMAN, N.A.; BUZDAR, A.V.; ALDINGER, K.A. y col. (1.981).
Estrogen receptor as a prognostic factor in breast cancer.
Cancer, 47: 554-560.

- 240.- SARRAZIN, D.; FONTAINE, F.; LASSER, P. y col. (1.978).
Le traitement conservateur du cancer du sein.
Rev. Prat., 28: 963.
- 241.- SARRAZIN, D.; FONTAINE, M.F.; LE, M.G.; ARRIAGADA, R. (1.983).
Conservative treatment versus mastectomy in T₁ or small T₂
Breast Cancer. A randomized Clinical Trial. En
"Conservative Treatment of Breast Cancer".
Harri. J.R., Hellman S., Silen W. Eds. J.B. Lippincott.
Philadelphia. pp: 101-111.
- 242.- SARRAZIN, D.; LE, M.; TUBIANA, M. y col. (1.982).
Radiotherapeutic studies on breast cancer at Villejuif.
Cancer Bull. (Houston), 34: 242-249.
- 243.- SCAEFF, R.W. y TORLONI, H. (1.968).
Types histologiques de tumeurs du sein.
Classification histologique internationale des tumeurs.
Numero 2, O.M.S. Geneve.
- 244.- SCATCHARD, G. (1.949).
The attraction of proteins for small molecules and ions.
Ann. N.Y. Acad. Sci., 51: 660-672.
- 245.- SCHIMID, F.A.; HUTCHINSON, D.J.; OTTER, G.M. (1.976).
Development of resistance to combinations of six
antimetabolites in mice with L-1210 leukemia.
Cancer Treat. Rep., 60: 23-27.
- 246.- SCHIMKE, R.T.; HILL, A.; JONSTON, R.N. (1.985).
Methotrexate resistance and gene amplification: an
experimental model for the generation of cellular
heterogeneity.
Br. J. Cancer, 51: 459-465.

- 247.- SCHOLL, S.; LIPPMAN, M.E. (1.984).
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.
- 248.- SCHRYVER, A. (1.976).
The Stockholm Breast Cancer Trial: Preliminary report of a randomized concerning the value of preoperative or postoperative radiotherapy in operable disease.
Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., 1: 601-609.
- 249.- SEMIGLAZOV, V.F.; BAVLI, J.L.; MOISEYENKO, V.M. y col. (1.985).
Clinical trial on adjuvant chemotherapy for breast cancer.
Cancer, 57: 1957-1960.
- 250.- SENN, H.J. (1.982).
Current status and indications for adjuvant therapy in breast cancer.
Cancer Chemother. Pharmacol., 8: 139-150.
- 251.- SENN, H.J.; AMGWERD, R.; JUNGI, W.F. (1.982).
Adjuvant chemocimmunotherapy with LMF plus BCG in node negative and node positive breast cancer: intermediate report at 4 years.
Rec. Results. Cancer Res., 80: 177-184.
- 252.- SHAFIE, S. y BROOKS, S.C. (1.977).
Effect of prolactin on growth and the estrogen receptor level of human breast cancer cells. (MCF-7).
Cancer Res., 37: 792-799.
- 253.- SHELDON, P.W.; BEGG, A.C.; FOWLER, J.F. y col. (1.974).
The incidence of lung metastases in C3H mice after treatment of implanted solid tumors with X-rays or surgery.
Br. J. Cancer, 30: 342-348.

254. - SILVESTRINI, R.; DAIDONE, M.G.; BERTUZZI, A. y DI FRONZO, G. (1.984).
Relationship between estrogens receptors and cellular proliferation. En "Clinical Interest of Steroid Hormone Receptors in Breast Cancer."
Leclercq G, Toma S, Paridaens R, Heuson J.C. Eds. Springer-Verlag. Berlin. pp: 163-168.
255. - SINGHAKOWINTA, A.; POTTER, H.G.; BURDOKER, T.R. y col. (1.976).
Estrogen receptor and natural course of breast cancer.
Ann. Surg., 183: 84-88.
256. - SKIPPER, H.E. (1.971).
Kinetics of mamary tumor cell growth and implication for therapy
Cancer, 28: 1479-1499.
257. - SKIPPER, H.E. (1.983).
Stepwise progress in the treatment of disseminated cancer.
Cancer, 51: 1773-1776.
258. - SKIPPER, H.E. (1.983).
The forty year old mutation theory of Luria and Delbruck and its pertinence to cancer chemotherapy. En "Advances in Cancer Research".
Klein G., Weinhouse S. Eds. Academic Press. New York.
pp: 331-363.
259. - SKIPPER, H.E.; SCHABEL, F. (1.982).
Quantitative and cytokinetic studies in experimental tumor systems. En "Cancer Medicine".
Holland J.F., Frei E. Eds. Lea & Febiger. Philadelphia.
pp: 636-648.

- 260.- SKIPPER, H.E.; SIMPSON-HERREN, L. (1.985).
Relación entre la heterogeneidad de la célula madre tumoral
y la respuesta a la quimioterapia. En "Avances en
Oncología. 1.985".
De Vita V., Hellman S., Rosenberg S.A. Eds. Espaxs. Barce-
lona. pp: 91-107.
- 261.- De SOMBRE, E.R.; GREENE, G.L.; KING, W.J. y JENSEN, E.V. (1.984).
Estrogen receptors, antibodies and hormone dependent
cancer. En "Hormones and Cancer".
Gurpide E. Calandra R. Levy C. Soto R.J. Eds. Liss. New
York. pp: 1-24.
- 262.- SOTO, A.M.; SONNESCHEIN, C. (1.985).
The role of estrogens on the proliferation of human breast
tumor cells. (MCF-7).
J. Steroid. Biochem., 23: 87-94.
- 263.- SOULE, H.D.; VAZQUEZ, J.; LONG, A. y col. (1.973).
A human cell line from a pleural effusion derived from a
breast carcinoma.
J. Natl. Cancer Inst., 51: 1409-1416.
- 264.- SPEER, J.F.; PETROSKY, V.E.; RETSKY, M.W. y col. (1.984).
A stochastic numerical model of breast cancer growth that
simulates clinical data.
Cancer Res., 44: 4124-4130.
- 265.- SPELSBERG, T.C.; LITTLEFIELD, B.A.; SEELKE, R. y col. (1.983).
Role of specific chromosomal proteins and DNA sequences in
the nuclear binding sites for steroid receptors.
Recent. Prog. Horm. Res., 39: 463-517.

- 266.- STEEL, G.G. (1.977).
Cell population kinetics in relation to the growth and treatment of cancer. En "Growth Kinetics of Tumors". Clarendon Press Ed. Oxford. pp: 67-72.
- 267.- STEWART, J.F.; RUBENS, R.D.; MILLIS, R.R. y col. (1.983).
Steroid receptors and prognosis in operable (stage I and II) breast cancer.
Eur. J. Cancer Clin. Oncol., 19: 1381-1387.
- 268.- STOKER, M.G.P.; PIGOTT, D. y TAYLOR-PAPADIMITRIOU, J. (1.976).
Response to epidermal growth factor of cultured human mammary epithelial cells from benign tumors.
Nature, 264: 764-767.
- 269.- STRAUS, M.J.; MORAN, R.E. (1.980).
The cell cycle kinetics of human breast cancer.
Cancer, 46: 2634-2639.
- 270.- STRENDER, L.E.; WALLGREN, A. y col. (1.981).
Adjuvant radiotherapy in operable breast cancer: correlation between dose in internal mammary nodes and prognosis.
Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., 7: 1319-1325.
- 271.- SUTHERLAND, R.L.; GREEN, M.; HALL, R. y col. (1.983).
Tamoxifen induces accumulation of MCF-7 human mammary carcinoma cells in the G₀/G₁ phase of the cell cycle.
Eur. J. Cancer Clin. Oncol., 19: 615-621.
- 272.- SUTHERLAND, R.L.; HALL, R.E.; TAYLOR, W. (1.983).
Cell proliferation kinetics of MCF-7 human mammary carcinoma cells in plateau phase cells.
Cancer Res., 43: 3998-4006.

- 273.- SUTHERLAND, R.L. y MURPHY, L.C. (1.980).
The binding of tamoxifen to human mammary carcinoma cytosol.
Eur. J. Cancer., 46: 1141-1143.
- 274.- SUTHERLAND, R.L.; MURPHY, L.C.; FOO, M.S. y col. (1.980).
High affinity antiestrogen binding site distinct from the estrogen receptor.
Nature, 288: 273-275.
- 275.- TAPLEY, N. du V.; FLETCHER, G.H.; MONTAGUE, D.E. (1.976).
Breast. En "Clinical Applications of the Electron Beam".
N. du V. Tapley. Ed. John Wiley Sons. New York. pp: 199-231.
- 276.- TATE, A.C.; GREENE, G.L.; DE SOMBRE, E.R. y col. (1.984).
Differences between estrogen and antiestrogen-estrogen receptor complexes from human breast tumors identified with an antibody raised against the estrogen receptor.
Cancer Res., 44: 1012-1018.
- 277.- TAYLOR, I.W.; HODSON, P.J.; GREEN, M.D. y col. (1.983).
Effects of tamoxifen on cell cycle progression of synchronous MCF-7 human mammary carcinoma cells.
Cancer Res., 43: 4007-4010.
- 278.- TERASIMA, T. y TOLMACH, L.J. (1.961).
Changes in X-ray sensitivity of HeLa cells during the division cycle.
Nature, 190: 1210-1211.
- 279.- TERASIMA, T. y TOLMACH, L.J. (1.963).
Growth and nucleic acid synthesis in synchronously dividing population of HeLa cells.
Exp. Cell. Res., 30: 344-362.

- 280.- T. J.E.; McCULLOCH, E.A. (1.961).
A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells.
Radiat. Res., 14: 213-222.
- 281.- TOFT, D.O. y GORSKI, J. (1.966).
A receptor molecule for estrogens isolation from the rat uterus and preliminary characterization.
Proc. Natl. Acad. Sci., 55: 1574-1579.
- 282.- TOMA, S.; LECLERCQ, G.; LEGROS, R.J. y col. (1.984).
Estrogen receptor variations in neoplastic tissue during the course of disease in patients with recurrent breast cancer. En "Clinical Interest of Steroid Hormone Receptors in Breast Cancer."
Leclercq G, Toma S, Paridaens R, Heuson J.C. Eds. Springer-Verlag, Berlin. pp: 181-185.
- 283.- TOMA, S.; LEONESSA, F. y PARIDAENS, R. (1.985).
The effects of therapy on estrogen receptors in breast cancer.
J. Steroid. Biochem., 23: 1107-1109.
- 284.- TORRES, M. (1.985).
y TPA en cancer de mama y otros tipos de localizaciones. Hallazgos y criterios de utilización.
Tesis doctoral. Facultad de Medicina. Universidad de Granada.
- 285.- TORRES, M.; RUIZ DE ALMODOVAR, J.M.; PEDRAZA, V. (1.986).
Cancer de mama. Masa tumoral residual y locus metastásicos.
Rev. Esp. Oncol., (en prensa).

- 286.- TSURVO, T.; LIDA, H.; TSUKAGOSHI, S. y col. (1.982).
Increased accumulation of vincristine and adriamycin in drug resistant P-388 tumors cells following incubation with calcium antagonists and calmodium inhibitors.
Cancer Res., 42: 4730-4733.
- 287.- TUBIANA, M. (1.986).
The growth and progresion of human tumors: Implications for management strategy.
Radiotherapy and Oncology, 6: 167-184.
- 288.- TUBIANA, M.; ARRIAGADA, R.; SARRAZIN, D. (1.985).
Human cancer natural history. Radiation induced immuno-depression and postoperative radiation therapy.
Int J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., 11: 23-30.
- 289.- TUBIANA, M.; PEJOVIC, T.; RENAUD, A. y col. (1.981).
Kinetic parameters ant the course of the disease in breast cancer.
Cancer, 47: 937-943.
- 290.- TURNER, L. SWINDELL, R.; BELL, W.G.T. y col. (1.981).
Radical versus modified radical mastectomy for breast cancer.
Ann. R. Coll. Surg. Engl., 63: 239-243.
- 291.- VALAGUSSA, P.; BONADONNA, G.; VERONESI, U. (1.978).
Patterns of relapse and survival following radical mastectomy.
Cancer, 41: 1170-1178.
- 292.- VALAGUSSA, P.; DI FRONZO, G.; BIGNAMI, P. y col. (1.981).
Prognostic importance of estrogen receptors to selec node-negative patients for adjuvant chemotherapy. En "Adjuvant Therapy of Cancer."
Salmon S.E., Jones S.E. Eds. Grune and Stratton. New York.

- 293.- VALERIOLE, F. y VIETI, T.J. (1.977).
 Celular kinetics and conceptual basis of chemotherapy. En
 "Clinical Pediatric Oncology".
 Sutton F. Vietti T.J. Ferubach E. Eds. C.V. Macby Company.
 St. Louis. pp: 182-196.
- 294.- VERONESSI, U. (1.978).
 Value of limited surgery for breast cancer.
 Sem. Oncol., 5: 395.
- 295.- VERONESSI, U.; SACOZZI, R.; DEL VECCHIO, M. (1.981).
 Comparing radical mastectomy with quadrantectomy, axillary
 dissection and radiotherapy in patients with small cancers
 of the breast.
 N. Engl. J. Med., 305: 6-11.
- 296.- VERONESSI, U.; DEL VECCHIO, M. y col. (1.983).
 Results of quadrantectomy, axillary dissection and
 radiotherapy (QUART) in T₁ N₀ patients. En "Conservative
 Management of Breast Cancer".
 Harris J.R., Hellman S., Silen W. Eds. J.B. Lippincott.
 Philadelphia. pp: 91-99.
- 297.- VIC, P.; VIGNON, F.; DEROCQ, M. y col. (1.982).
 Effect of estradiol on the ultrastructure of de MCF-7 human
 breast cancer cells in culture.
 Cancer Res., 42: 667-673.
- 298.- VIGNON, F.; DEROCQ, M.; CHAMBON, M. y col. (1.983).
 Les proteines oestrogeno-induites sécrétées par les
 cellules mammaires cancéreuses humaines MCF-7 stimulent
 leur prolifération.
 C.R. Acad. Sc. Paris., 296: 151-156.

- 299.- VIHKO, R.; JANNE, O.; KONTULA, K. y col. (1.980).
Female sex steroid receptor status in primary and metastatic breast carcinoma and its relationship to serum and peptide hormone levels.
Int. J. Cancer, 26: 13-21.
- 300.- VILLALBA, J. (1.986).
Receptores de Estrógenos en Células Intactas.
Tesis doctoral. Facultad de Medicina. Universidad de Granada.
- 301.- VILLALOBOS, M. (1.986).
Modelos tumorales: Estudio de la cinética de proliferación celular en MCF-7 y EVSA-T.
Memoria de Licenciatura. Facultad de Medicina. Universidad de Granada.
- 302.- VILLALOBOS, M.; OLEA, N.; GORGOJO, L. y col. (1.987).
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.
- 303.- De VITA, V.T. (1.982).
The evolution of therapeutic research in cancer.
N. Engl. J. Med., 298: 907-910.
- 304.- WALLGREN, A. (1.977).
A controlled study: preoperative versus postoperative irradiation.
Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., 2: 1167-1169.
- 305.- WALT, A.J.; SINGHAKOWINIA, A.; BROOKS, S.C. y col. (1.976).
The surgical implications of estrophile protein estimations in carcinoma of the breast.
Surgery, 80: 506-512.

- 306 - WEICHSELBAUM, R.R.; HELLMAN, S.; PIRO, A.J. (1.978).
Proliferation kinetics of a human breast cancer cell line
in vitro following treatment with 17 β -estradiol and 1- β -
arabinofuranosyl-cytosine.
Cancer Res., 38: 2339-2342.
- 307 - WELSHONS, W.V.; LIEBERMAN, M.E.; GORSKI, J. (1.984).
Nuclear localization of unoccupied estrogen receptors.
Nature, 307: 747-749.
308. - WINNEKER, R.C. y CLARK, J.H. (1.983).
Estrogenic stimulation of the antiestrogen specific binding
site in rat uterus and liver.
Endocrinology, 112: 1910.
309. - WISE, L.; MASON, A; ACKERMAN, L.C. (1.971).
Local excision and irradiation. Alternative method for
treatment of early mammary cancer.
Ann. Surg., 174: 392.
310. - WOLF, K. (1979).
Laboratory management of cell cultures. En "Cell Culture
Methods in Enzimology". Vol. LVIII.
Jakoly W.B., Pastan J.H. Eds. Academic Press. New York.
pp: 116-119.
311. - ZUBIRI, A. (1.984).
La investigación estadística y epidemiológica en oncología.
Rev. Esp. Oncología, 31: 379-392