

La presente Tesis Doctoral, Titulada: "RECEPTORES DE ESTROGENOS EN CELULAS INTACTAS", corresponde a la Defensa dada por D. Juan Villalba Moreno el 21 de Marzo de 1986, ante el Tribunal compuesto por:

Presidente: Prof. Dr. D. Juan de Dios López Gonzales
Catedrático de Química Inorgánica de la UNED
(Madrid)

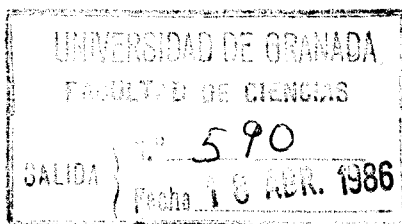
Vocales: Prof. Dr. D. Cristobal Valenzuela Calahorro.
Catedrático de Química Inorgánica de la Universidad de Extremadura.

Prof. Dr. D. Antonio Garcia Rodriguez.
Catedrático de Química Inorgánica de la Universidad de Granada


Prof. Dra. D^a M^a Dolores Suarez Ortega.
Catedrático de Bioquímica de la Universidad de Granada.

Secretarios: Prof. Dr. D. Pedro Luis Mado Alarcon
Prof. Titular de Química Física de la Universidad de Granada.

Obteniendo la Calificación de APTO CUM LAUDE



Granada 11 de Abril de 1986


Fdo. Juan Villalba Moreno

TESIS DOCTORAL

RECEPTORES DE ESTROGENOS EN CELULAS INTACTAS

JUAN VILLALBA MORENO

R. 31.584

1-58

FACULTAD DE CIENCIAS. UNIVERSIDAD DE GRANADA

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA
GRANADA
N.º Documento <u>613365630</u>
N.º Caja <u>15306161</u>

BIBLIOTECA
FACULTAD DE CIENCIAS
GRANADA
Estante <u>1</u>
Tabla
N.ºm. <u>58</u>

Memoria que presenta para aspirar
al grado de Doctor en Ciencias
Químicas.

D. JUAN VILLALBA MORENO

Juan Villalba Moreno

GRANADA, FEBRERO de 1.986

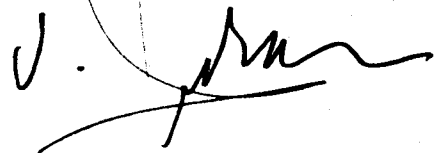
D. VICENTE PEDRAZA MURIEL, CATEDRATICO Y JEFE DEL DEPARTAMENTO DE RADIOLOGIA Y MEDICINA FISICA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA.

CERTIFICA:

Que D. Juan Villalba Moreno, Licenciado en Ciencias Químicas, ha realizado bajo mi dirección en el Laboratorio del Departamento de Radiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada el presente trabajo de Tesis Doctoral titulado: - "RECEPTORES DE ESTROGENOS EN CELULAS INTACTAS".

Revisado el mismo lo encuentro conforme para ser sometido a juicio por el Tribunal correspondiente.

Lo que certifico a petición del interesado para que conste donde convenga, en Granada a diez de Febrero de mil novecientos ochenta y seis.




DR. D. MARIANO RUIZ DE ALMODOVAR, PROFESOR TITULAR DE RADIOLOGIA Y MEDICINA FISICA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA -
UNIVERSIDAD DE GRANADA.

CERTIFICA:

Que D. Juan Villalba Moreno, Licenciado en Ciencias Químicas, ha realizado bajo mi dirección en el Laboratorio del Departamento de Radiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada el presente trabajo de Tesis Doctoral titulado: -
"RECEPTORES DE ESTROGENOS EN CELULAS INTACTAS".

Revisado el mismo lo encuentro conforme para ser sometido a juicio por el Tribunal correspondiente.

Lo que certifico a petición del interesado para que conste donde convenga, en Granada a diez de Febrero de mil novecientos ochenta y seis.



Fdo. Mariano Ruiz de Almodóvar Rivera



UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE QUIMICA FISICA

MANUEL CORTIJO MERIDA, Catedrático-Director del Departamento de Química Física de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada, informa, en relación con la memoria presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias por D. JUAN VILLALBA MORENO, titulada "Receptores de estrogénos en células intactas" y realizada en el Departamento de Radiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada, lo siguiente:

Que acepta ser ponente de la mencionada Tesis Doctoral.

Que examinada dicha Tesis encuentra reúne las condiciones exigidas, en cuanto a forma, entidad y contenido para ser defendida, en la Facultad de Ciencias Químicas, ante el tribunal que se designe.

Y para que conste y surta efectos donde proceda expido el presente informe en Granada a 20 de Febrero de 1986.

Manuel Cortijo Mérida
Catedrático de Química Física

Mi agradecimiento:

Al Prof. Dr. D. Vicente Pedraza Muriel, cuyo constante aliento, dirección, consejos y ayuda ha hecho posible la realización de este trabajo.

Al Prof. Dr. D. J. Mariano Ruiz de Almodovar Rivera, por su acertada dirección y abnegada dedicación a este trabajo le presto mi más sincero agradecimiento.

Al Prof. Dr. D. Nicolas Olea Serrano por su constante consejos y ayuda incondicional.

A los Drs D. José María López Ruiz y D^a Rosario del Moral por su valiosa colaboración.

A D^a Concepción Martín Sánchez por su ayuda técnica en el mantenimiento de la Infraestructura necesaria para la realización de este trabajo así como a todos los miembros del Servicio de Medicina Nuclear sin cuyo apoyo y estímulo hubiera sido más difícil su realización.

Al Prof. Dr. D. Manuel Cortijo Mérida. Catedrático y Jefe de Departamento de Química Física de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada, Ponente de esta Tesis.

A la S^a Rosa María Lachica por su eficaz asistencia técnica.

A Sensi

A Juanito

A mis padres

I N D I C E

	Pagi
1. INTRODUCCION	1
1.1. CANCER DE MAMA, GENERALIDADES	1
1.2. PRINCIPIOS DE LA TERAPEUTICA HORMONAL EN - CANCER DE MAMA.....	1
1.3. TERAPEUTICA HORMONAL ADITIVA	1
1.3.1. Andr6genos y Estr6genos	1
1.3.2. Antiestr6genos	1
1.4. TERAPEUTICA HORMONAL ADYUVANTE	2
1.5. SELECCION DE PACIENTES PARA EL TRATAMIENTO HORMONAL	2
1.5.1. La determinaci3n de Receptores Hormo nales	2
1.5.2. Formas Moleculares del Receptor de - Estr6genos	2
1.5.3. Activaci3n del Complejo Receptor Es- tr6geno	2
1.5.4. Interacci3n del Complejo RE con el - DNA	2
1.5.5. Efecto del Estradiol sobre la s3nte- sis del RNA	2
1.5.6. Efecto del Estradiol sobre la s3nte- sis de Proteinas espec3ficas.....	31
1.6. UTILIDAD CLINICA DE LOS RECEPTORES DE ESTRO GENOS EN CANCER DE MAMA.....	33
1.6.1. Frecuencia de presentaci3n de RE y - RP en c3ncer de mama	35
1.6.2. Influencia de la edad y del estado - menstrual sobre la presencia y nivel de concentraci3n de RE y RPg.....	37
1.6.3. RE/RPg y estad3o de la enfermedad...	38
1.6.4. RE en el tumor primario. Subgrupo de pacientes en riesgo y respuesta endo crina ulterior.....	39
1.6.5. Concentraci3n de RE y Respuesta tera p3utica	41

	Págin
1.6.6. RPg y respuesta endocrina.....	4
1.6.7. RE y pronóstico en cáncer de mama.....	4
1.7. EL METODO DE ENSAYO CLASICO. GENERALIDADES...	4
1.7.1. Limitaciones de los procedimientos analíticos de cuatificación de receptores estrogénicos.....	4
1.7.1.1. La degradación del receptor..	4
1.7.1.2. Reproductividad del ensayo...	4
1.8. PROCEDIMIENTOS ALTERNATIVOS PARA LA CUANTIFICACION DE RECEPTORES DE ESTROGENOS.....	5
1.8.1. El receptor nuclear.....	5
1.9. LA LOCALIZACION INTRACELULAR DEL RECEPTOR....	5
1.10.OBJETIVOS.....	5
II. MATERIAL Y METODOS	6
2.1. INSTRUMENTACION	6
2.1.1. Espectrómetro de centelleo líquido...	6
2.1.2. Ultracentrífuga.....	6
2.1.3. Espectrofotómetro	6
2.1.4. Centrífuga refrigerada.....	6
2.1.5. Cámara frigorífica.....	6
2.1.6. Congeladores.....	6
2.1.7. Ph metro.....	6
2.1.8. Homogeneizador.....	6
2.1.9. Otro material.....	6
2.2. REACTIVOS.....	6
2.2.1. Hormonas radiactivas.....	6
2.2.2. Hormonas no radiactivas.	6
2.2.3. Medios de cultivo celular.....	6
2.2.4. Soluciones tampón.....	6
2.2.5. Enzimas.....	6
2.2.6. Cocktel de centelleo.....	6
2.2.7. Material biológico	6
2.3. METODOS.....	7

	Págica
2.3.1. Obtención del citosol.....	70
2.3.2. Obtención de la suspensión celular.,	71
2.3.3. Separación de células.....	72
2.3.4. Análisis de proteínas.....	73
2.3.5. Análisis de DNA.....	74
2.3.6. Ensayo de receptores estrogénicos...	75
2.3.6.1. Receptores de estrógenos en citosol.....	75
2.3.6.2. Tratamiento de datos.....	76
2.3.6.3. Análisis saturante simple...	83
2.3.6.4. Estudios de la especificidad del enlace.....	85
2.3.6.5. Análisis de receptores estro génicos sobre células intac- tas.....	86
2.3.7. Cinética de la captación de $17\beta E_2$ - por las células uterinas.....	89
2.3.8. Estudio de la termolabilidad del RE - en citosol y en células intactas.....	90
 III. RESULTADOS	 92
3.1. Separación de células.....	92
3.2. Ensayo de RE en citosol.....	96
3.3. Cinética de la captación intracelular del estradiol.....	105
3.3.1. Cinética de entrada del estradiol - a la célula uterina. Efecto de la concentración del $17\beta E_2$	108
3.3.2. Cinética de entrada del estradiol en la célula uterina. Efecto de la tem peratura	114
3.4. LINEALIDAD DE LA CAPTACION DEL 17β ESTRA-- DIOL- 3H	117

	Página
3.5. ESTABILIDAD TERMICA DEL RECEPTOR DE ESTROGENOS.....	119
3.6. ESTUDIO DE LA ESPECIFICIDAD DEL ENLACE RECEPTOR-ESTRADIOL.....	121
3.7. EL CONTROL NEGATIVO DEL ENSAYO.....	127
3.8. ENSAYO DE RE SOBRE CELULAS OBTENIDAS POR CENTRIFUGACION EN GRADIENTE DE PERCOLL.....	137
3.9. ENSAYO DE RECEPTORES ESTROGENICOS SOBRE CELULAS INTACTAS DE CANCER DE MAMA	141
IV. DISCUSION.....	151
4.1. SEPARACION DE CELULAS EN GRADIENTE DE PERCOLL.....	151
4.2. REPRODUCTIBILIDAD DEL ENSAYO EN CITOSOL.....	155
4.3. CINETICA DE LA CAPTACION INTRACELULAR DEL ESTRADIOL.....	173
4.4. CINETICA DE ENTRADA DEL ESTRADIOL EN LA CELULA.....	178
4.5. EL ENSAYO DE RE EN CELULAS INTACTAS...	199
4.5.1. Linealidad de la Captación de $^{17}\beta$ E ₂	199
4.5.2. Degradación del receptor.....	199
4.5.3. Especificidad del enlace.....	205
4.5.4. Comparación entre el ensayo RE en citosol y el ensayo en células intactas.....	222
4.5.5. El control negativo del ensayo..	230
4.5.6. Ensayo sobre células separadas por centrifugación en Percoll...	232
4.5.7. Ensayo de receptores de estrógenos en cáncer de mama humano....	232

V. CONCLUSIONES	234
VI. BIBLIOGRAFIA	237

I. INTRODUCCION

1. INTRODUCCION

1.1. CANCER DE MAMA. GENERALIDADES

El cáncer de mama es, en la actualidad, el tumor maligno de mayor incidencia en el sexo femenino y la primera causa de muerte en la mujer (23) (63). Según datos del Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos parece probable hoy que una de cada catorce mujeres pueda desarrollar un cáncer de mama clínico a lo largo de su vida (2) (5). Si se tiene en cuenta, además, que el 46% de las mujeres que presentan cáncer de mama, acaban muriendo por esta enfermedad y que desde el punto de vista etiológico, la vida en países industrializados, en su más amplio sentido representa -por encima de los elementos causales genéticos, hormonales o raciales- la mayor amenaza para la aparición de cáncer de mama en una mujer de edad avanzada, resulta fácil entender la importancia médica y social del problema.

Las cifras de supervivencia a largo plazo (5 o más años) han experimentado por otra parte en los últimos cincuenta años, sólo leves modificaciones (10% de incremento máximo según datos de Cutler (45) y, ello, más que a la eficacia de las distintas modalidades de tratamiento utilizadas, se debe a los esfuerzos realizados en el diagnóstico precoz de la enfermedad. Esta situación, distinta de la que ofrecen otras neoplasias tumorales (leucemias, linfomas, tumores testiculares, etc) en las que se han conseguido avances terapéuticos significativos, junto con un leve pero sostenido incremento en la incidencia anual de nuevos casos -55 nuevos casos/100.000 mujeres/año en el cuatrienio 1.940-1.944, frente a 72 nuevos casos/100.000 mujeres/año entre 1.965-1.969, (45

mantienen, en todos los círculos médicos una viva inquietud y un esfuerzo sostenido en busca de las causas y las soluciones de tan grave enfermedad.

Hoy la doctrina terapéutica generalizada en cáncer de mama hace uso de una combinación racional de medidas locales (cirugía e irradiación) y generales (quimioterapia y hormonoterapia) (2). Bajo la óptica del tratamiento combinado, la terapéutica hormonal del cáncer mamario se lleva a efecto - bien en forma coadyuvante a las medidas locales, bien con intención paliativa en situaciones de enfermedad avanzada. Su empleo descansa en el papel que el sistema endocrino juega -- tanto en el desarrollo de la glándula mamaria normal, como en el mantenimiento de las neoplasias derivadas de ella.

1.2. PRINCIPIOS DE LA TERAPEUTICA HORMONAL EN CANCER DE MAMA

Se entiende por cáncer endocrino relacionado aquella neoplasia que, con independencia de su naturaleza, exige de determinados requerimientos hormonales para su crecimiento o funcionalismo, o bien, posee la propiedad de segregar hormonas o productos químicos de acción hormonal. Dentro de esta particular variedad de tumores se incluyen gran número de neoplasias que se presentan espontáneamente en la especie humana (Ca. de mama, útero, próstata, ovario, testículo, glándulas adrenales, tiróides, paratiróides, algunas leucemias, etc) y que surgen sobre tejidos directa o indirectamente dependientes de la acción de las hormonas adenohipofisarias.

El reconocimiento de tales neoplasias como entidades -- clínicas especiales es importante, dado que en su tratamiento resulta ineludible la utilización de medidas modificadoras -- del ambiente hormonal en el que se desenvuelve el tumor (ciru

gía ablativa, hormonoterapia, drogas con efecto antihormonal, etc).

Desde un punto de vista terminológico es conveniente, - en cánceres endocrino-relacionados, distinguir las siguientes nociones (237):

a) HORMONODEPENDENCIA, concepto bajo el cual se infiere una relación directa entre cierto tumor y la hormona u hormonas producidas por una determinada glándula. Un cáncer de mama que regresa tras ovariectomía decimos que es ovario-dependiente y si regresa tras adrenalectomía le llamamos adrenal-dependiente. En ocasiones el término hormono-dependiente es equívoco: si afirmamos, por ejemplo, que el cáncer de mama es estrógeno-dependiente sólo decimos parte de la verdad porque otras hormonas como la prolactina y la progesterona y sus derivados pueden ejercer un efecto positivo sobre el desarrollo y crecimiento del tumor.

b) HORMONORESPUESTA, denominación que hace referencia a los cambios objetivables en un determinado tumor como consecuencia de la acción de dosis farmacológicamente activas de cierta hormona (p. ej., reducción del tamaño de las metástasis viscerales o de partes blandas en enfermas post-menopáusicas, tratadas con andrógenos, antiestrógenos o esferóides administrados a altas dosis).

c) HORMONOSENSIBILIDAD, término bajo el cual se engloban los dos anteriores, aunque se encuentra más próximo al segundo por lo que a efectos terapéuticos se refiere.

El cáncer de mama es un tumor particularmente dependiente de los estrógenos. Efectivamente en 1.896 Beatson (6) sugirió que los cambios proliferativos presentes en ciertos tumores de mama eran análogos a los que se producen en la lac--

tancia y en la gestación y pensó que estos cambios se encontraban bajo la influencia de los ovarios. Sobre esta base recomendó, en dos pacientes afectas de cáncer de mama, la ovariectomía, y comprobó con asombro, el desarrollo de una notable mejoría en el curso evolutivo de la enfermedad. Desde entonces, la ovariectomía, adrenalectomía y, en ciertos casos, la hipofisectomía se han venido utilizando empíricamente en el tratamiento de enfermas con cáncer metastatizado.

Además de la cirugía, en el tratamiento de los tumores hormonosensibles se utilizan sustancias farmacológicas, hormonales o no. En su introducción clínica ha destacado particularmente Nathason (176) quién a partir de la observación empírica de que varios hidrocarburos semisintéticos de estructura semejante a la del colesterol, intervenían en el proceso de formación de las hormonas esteroideas, pudo relacionar la incidencia del cáncer de mama con los cambios hormonales fisiológicos de la mujer y discutir con buenos argumentos la terapia hormonal establecida sobre bases farmacológicas.

Estrógenos y andrógenos se han utilizado indistintamente desde entonces, como elementos básicos de la terapéutica. Establecida la hipótesis de que el estímulo para el crecimiento tumoral radicaba en los estrógenos se propuso la terapéutica androgénica como medida lógica para el control de las situaciones clínicas de la enfermedad metastásica abierta (38, 39, 40, 237). Por otra parte, a causa del gran número de efectos colaterales indeseables derivados de la administración prolongada de andrógenos (Hirsutismo, cambios en la voz, incremento de la libido, etc), el desarrollo de preparados hormonales, que conservando intacta su acción antitumoral, indujesen el menor número de efectos secundarios posibles, ha dado origen a la introducción clínica de agentes hormonales que como la 2- α -metildihidrotestosterona y la 2- α -metil-17 β hidroxi-5- α -androstendiona (100), reúnen junto a un débil poder virilizante, un elevado nivel de eficacia terapéutica.

Sorprendentemente los estrógenos, en circunstancias particulares -enfermas post-menopáusicas mayores de 65 años- sirven, paradójicamente, a los propósitos de control tumoral, a pesar de su reconocida influencia en edades más precoces, sobre el desarrollo neoplásico. Sobre idénticos principios descansa la utilización clínica de antagonistas de los estrógenos, sustancias cuya molécula compite con el esteroide estrógeno, proceder que conlleva a la anulación de la función estrogénica. Es así como los estudios iniciales referentes a la actividad antitumoral de la Nafoxidina (91), Endocbmfeno (89) y Tamoxifeno (238), administrados a elevadas dosis han conducido al hallazgo de una importante tasa de respuestas positivas, no inferior a la obtenida con la estrogenoterapia o la androgenoterapia convencionales en enfermas con cáncer de mama diseminado.

1.3. TERAPEUTICA HORMONAL ADITIVA

1.3.1. Andrógenos y Estrógenos

Reservada para pacientes postmenopáusicas portadoras de cáncer de mama avanzado, la administración de preparados hormonales de estrógenos o andrógenos se ha revelado eficaz en el tratamiento de la enfermedad. El establecimiento de la acción antineoplásica de las citadas hormonas, la definición de la dosis óptima y el hallazgo de compuestos con efectos secundarios mínimos ha sido objeto de investigación durante los últimos 25 años (22,73, 74, 115, 222, 245). El efecto antitumoral de la terapéutica hormonal no es rápido y, por ello, una evidencia clara de destrucción tumoral puede no ponerse de manifiesto hasta pasadas varias semanas de iniciado el tr

tamiento. La respuesta es, por otra parte de carácter general [El tumor primario, los nódulos cutáneos, los linfáticos afectados y las metástasis pulmonares pueden llegar a "desaparecer" las lesiones osteolíticas a recalificarse; el hígado a reducir su tamaño, etc. Como consecuencia de tales cambios la supervivencia de las pacientes y su calidad de vida pueden verse notablemente incrementadas.

En términos cuantitativos la frecuencia de respuestas positivas no es sin embargo, muy acusada y oscila del 21% para los andrógenos al 36% para los estrógenos (116). Conclusiones importantes de los estudios realizados son las siguientes

a) El máximo nivel de regresión tumoral se observa en pacientes con periodo postmenopáusico igual o superior a 4 años (41)

b) La aparición de respuesta positiva se asoció significativamente con una supervivencia más prolongada (41).

c) Las pacientes tratadas con dietilestilbestrol vivieron más y mejor que las que recibieron propionato de testosterona que fueron, ambos, los preparados hormonales de mayor utilización.

El bajo índice de respuesta observado en los grupos de pacientes tratadas con andrógenos, indujo a la búsqueda de nuevas hormonas y al desarrollo de estudios randomizados para la correcta comparación estadística de los resultados obtenidos. Así, en 1.958 Kennedy (114) introdujo en clínica la Fluoximestrona, andrógeno cuya administración oral pareció, en principio asociarse con elevados índices de regresión. Algunos años después un estudio comparativo y randomizado llevado a efecto por el Cooperative Breast Cancer Group (38) no encor

tró diferencias significativas entre la Fluoximestrona y el Propionato de Testosterona y mostró, en concordancia con hechos ya conocidos, una clara superioridad respecto de ambos del dietilestilbestrol.

El mecanismo de acción de la remisión tumoral hormono--inducida es desconocido, habiéndose formulado diversas hipótesis (117): i) acción directa sobre las células tumorales; ii) hiperplasia del estroma e incremento consiguiente de la reacción normal contra la presencia del tumor; iii) modificación del estado inmunológico de las pacientes (expresado morfológicamente por infiltración de linfocitos y células plasmáticas) iv) Supresión de algún factor de crecimiento tumoral.

1.3.2. Antiestrógenos

Los antiestrógenos fueron introducidos en clínica en 1.971 por Cole (36). Muy poco tiempo después numerosas comunicaciones científicas confirmaron su valor real en el tratamiento del carcinoma de mama metastatizado (37,238) donde el porcentaje de respuestas positivas puede alcanzar al 60% de los casos. La mayor eficacia clínica la poseen tres preparados: Tamoxifen, Nafoxidina y Clomifeno (144). En particular el Tamoxifen ha recibido especial atención conociéndose, hoy día las consecuencias clínicas de su empleo y, parcialmente, su mecanismo de acción.

En términos clínicos cuando el Tamoxifen se utiliza como primera medida terapéutica en cáncer de mama avanzado es posible demostrar la aparición de remisión tumoral objetiva en un 30-50% de los casos, siendo la regresión completa, aproximadamente, en la tercera parte de los mismos (217).

Cuando se utiliza como forma secundaria de terapia la respuesta objetiva es menor (20-25%). Aunque la duración media de la respuesta oscila en grandes series de pacientes, entre 9 y 15 meses, remisiones de duración 4 veces superior (3-4 años) no son infrecuentes y casi dos tercios de las pacientes presentan sistemáticamente, una importante mejoría subjetiva (217). Características clínicas de la acción del Tamoxifen son finalmente las siguientes: a) Elevada probabilidad de respuesta - una vez desaparecida la eficacia de otras formas de tratamiento hormonal; b) influencia positiva de la edad en el tipo de respuesta (mejor y más prolongada cuanto mayor es el periodo de postmenopausia; c) Máximo efecto sobre las metástasis de tejidos blandos y mínima acción en pacientes con fenotipo tumoral RE(-).

1.4. TERAPEUTICA HORMONAL ADYUVANTE

El importante papel que la terapéutica endocrina juega en el cáncer de mama avanzado, la existencia objetiva de remisiones tumorales y el elevado índice de respuestas observadas han conducido a la búsqueda de criterios útiles para la definición de categorías de pacientes de cáncer de mama con enfermedad residual subclínica probable que pudieran beneficiarse de la manipulación hormonal. En 1.968 se inició en Manchester por Cole y col (31) el primer ensayo clínico encaminado a determinar el valor de la castración profiláctica, como medida adjunta a la cirugía, para el control de enfermas afectas de cáncer operable de mama. Este ensayo en el que entraron sólo pacientes premenopáusicas -con o sin invasión de los linfáticos axilares- demostró la eficacia de la combinación terapéutica al incrementarse notoriamente, en el grupo de pacientes así tratadas, el intervalo libre de enfermedad, pero no pudo

ponerse de manifiesto que la supervivencia a largo plazo (5-10 años) de las pacientes castradas fuese superior a la de las no castradas. Desde entonces diferentes estudios realizados al respecto han mostrado resultados contradictorios. Así Nissen-Meyer y col (177) en el curso de un ensayo clínico - prospectivo de irradiación ovárica profiláctica, estimaron haber conseguido ambos objetivos, mientras que Ravdin y col (3) no encontraron diferencias significativas en la supervivencia a 3-5 años. Importante es, sin embargo, el hecho señalado por Nissen-Meyer (107) y otros (168) de que la administración de prednisona a pacientes castradas eleva significativamente el nivel de supervivencia de las pacientes de cáncer de mama respecto al observado en grupos de enfermas sometidas a cirugía o a cirugía más castración. Probablemente la prednisona produce este efecto por vía de supresión de los estrógenos de origen adrenal (168).

Es importante destacar que la combinación cirugía más irradiación ovárica (castración) más prednisona, en paciente premenopáusicas con linfáticos axilares histológicamente positivos resulta tan efectiva como la combinación cirugía más Quimioterapia (monoquimioterapia en régimen CMF) (62, 13). La importancia de esta observación reside en el destacado papel que la terapia hormonal adyuvante puede jugar, como medida complementaria o alternativa a la quimioterapia, en el tratamiento del cáncer de mama operado. Desde el punto de vista de la morbilidad la terapéutica hormonal es, evidentemente, menos agresiva que la quimioterapia y su coste económico es por otra parte muy inferior. La similitud de resultados ofrecidos por ambos esquemas terapéuticos otorga, quizás, a la utilización de la hormonoterapia como procedimiento adyuvante de las medidas locales (Cirugía y Radioterapia) un papel pre dominante.

1.5. SELECCION DE PACIENTES PARA EL TRATAMIENTO HORMONAL

La respuesta clínica a los variados tipos de manipulación hormonal anteriormente descritos, dista mucho de ser general. En efecto, sólo una cierta fracción de pacientes de cáncer de mama -variable en función de la acción hormonal instaurada- presenta una mejoría evidente de su proceso neoplásico, por ello la identificación previa de los subgrupos de enfermos con respuesta positiva de tratamiento hormonal reviste considerable importancia.

1.5.1. La Determinación de Receptores Hormonales

El mecanismo de la acción hormonal en cáncer de mama y el empirismo subyacente tanto en la selección de pacientes -- (18) como en la elección de la manipulación endocrina, comenzaron a desaparecer en la década 1.960-1.970 con la introducción clínica de los métodos de detección y medida de Receptores Hormonales. Una de las etapas iniciales para el desarrollo de tales métodos fué la síntesis de derivados radiactivos de moléculas estrogénicas con elevada actividad específica (80,107). Folca y col (65), encontraron correlación entre acúmulo de Hexetrol-³H en el tumor mamario y respuesta al tratamiento hormonal ablativo, de forma que si el tumor, antes de la cirugía, es capaz de concentrar la molécula marcada, inyectada I.V., la eficacia del tratamiento hormonal es muy elevada; por otra parte, en ausencia de acúmulo de Hexetrol-³H, la probabilidad de respuesta positiva es nula.

Jensen y col (106) iniciaron una nueva aproximación al conocimiento de los mecanismos de acción hormonal, demostrando en animales de experimentación el preferencial enlace de

la molécula de estradiol tritiado, sobre útero y vagina. Este acúmulo de la hormona no se producía en tejidos no blancos de la acción estrogénica. En 1.966 Toft y Gorski (233) aislaron y caracterizaron parcialmente, del tejido uterino de la rata una sustancia de elevado peso molecular y coeficiente de sedimentación del orden de 9,5 S, cuyas propiedades físico-químicas y de reactividad con enzimas proteolíticas resultaban indicativas de la naturaleza protéica de la macromolécula, que, por otra parte enlaza específicamente el 17β Estradiol- ^3H a concentraciones fisiológicas de la hormona estrogénica y el enlace Hormona-Proteína se inhibe en presencia de Dietilestilbestrol; inhibición que resulta sólo parcial cuando se utiliza como competidor el 17α Estradiol. La macromolécula receptora parece, entonces, ser capaz de distinguir entre los estereoisómeros del estradiol.

Extensas investigaciones realizadas por Jensen y col (108) demuestran que tanto "in vivo" como "in vitro", los tejidos blancos de la acción estrogénica poseen un componente único denominado "Receptor". El enlace reversible entre la hormona y el receptor, sin que exista transformación química de la molécula esteroidea, parece ser la primera etapa del proceso uterotrópico. La interacción del estradiol con los tejidos blancos incluye dos fenómenos distintos: captación y retención. El último proceso puede ser saturado "in vivo" si la hormona administrada excede los niveles fisiológicos (109). Jensen (110) postula que la captación del estradiol por la célula blanco se realiza por la macromolécula Receptora de coeficiente de sedimentación 9,5 S, una vez que el 17β E_2 penetra en la célula por difusión pasiva. Este complejo R-E transfiere la hormona al núcleo mediante un proceso, dependiente de la temperatura, que consume receptor 9,5 S. La formación del complejo R-E nuclear de coeficiente de sedimentación 5 S puede ser el resultado de la ruptura de la molécula 9,5S. Po-

siblemente la proteína extranuclear sea sólo un "transportador" del E_2 al núcleo y la célula responda a la acción hormonal por un mecanismo independiente de la molécula citoplasmática. El hallazgo de receptores citoplasmáticos de estrógenos en el tejido tumoral de pacientes afectas de cáncer de mama - fué inmediato (101) y permitió especular desde entonces con la hormonodependencia de tales cánceres. Los últimos años han presenciado un desarrollo vertiginoso de los métodos de medida de receptores así como la aparición de innumerables publicaciones (108, 159, 160, 20) referentes unas veces a la utilización de los RE en la predicción de la respuesta tumoral a una determinada manipulación hormonal y otras al diseño de estrategias terapéuticas diversas encaminadas al control de la enfermedad neoplásica maligna de la mama. Consecuencia de tales estudios ha sido la noción de respuesta improbable a cualquier tipo de terapia endocrina en ausencia de receptores, la predicción de respuestas favorables en un determinado porcentaje de casos receptor-positivo (55-60% aproximadamente) y la aparición consiguiente de un método racional de selección de pacientes para tratamiento hormonal.

En cáncer de mama la importancia de la detección y cuantificación de los receptores estrogénicos radica en los siguientes hechos (108, 154):

a) La presencia o ausencia de receptores citoplasmáticos de estrógenos en el homogeneizado de un tumor es esencial para diferenciar la hormonodependencia u hormonoindependencia del tumor en cuestión.

b) El fenotipo (RE(+)) o RE(-)) del tumor analizado ha resultado ser de valor predictivo en la respuesta ulterior a la manipulación hormonal a que han sido sometidas las pacientes afectas.

c) En alguna medida el fenotipo del receptor y sobre todo su nivel de concentración intratumoral es, o puede ser, reflejo de diferencias de comportamiento de los distintos clones celulares que lo componen. El reconocimiento de este hecho ha tenido importantes consecuencias terapéuticas y ha permitido por un lado, estratificar a las pacientes afectas de cáncer de mama avanzado en subgrupos diferentes de acuerdo con la naturaleza del arma terapéutica empleada (ovariectomía, antiestrógenos, quimioterapia, quimio más hormonoterapia, etc) y por otro, conferir con eficacia inesperada a la hormonoterapia el papel de tratamiento adyuvante en cáncer localizado (169).

1.5.2. Formas Moleculares del Receptor de Estrógenos

Los métodos habitualmente utilizados para la determinación del peso molecular, estructura, y conformación del receptor, son la filtración en gel y la ultracentrifugación en gradiente de sucrosa. En sus trabajos Toft y Gorski (75,233) demostraron a este respecto que el estrógeno radiactivo se enlazaba sistemáticamente en una reacción de elevada afinidad con una especie protéica de 8-9,5S de coeficiente de sedimentación, aunque cantidades más pequeñas de E_2 aparecen siempre ligadas a una fracción de 4-5 unidades Swedberg. Posteriormente se puso de manifiesto que la elevación de la temperatura del ensayo, o la extracción de receptores nucleares en ClK 0,3M, conduce a la identificación de una única especie molecular de coeficiente 4-5S, sin que pudiese demostrarse la presencia de la forma 8S característica.

La identificación de dos formas moleculares de receptor tuvo consecuencias clínicas inmediatas. En efecto, en 1.972

Wittliff y col (126) comenzaron a utilizar de manera rutinaria la ultracentrifugación en gradiente de densidad de sucrosa para la medida de la concentración de receptores de estrógenos en homogeneizados de tejido tumoral mamario humano y observaron dos hechos significativos: a) En algunos especímenes tumorales sólo se aprecian formas moleculares de bajo coeficiente de sedimentación, mientras que en otros se presentan las formas 8S y 4S. b) La hormona marcada resulta desplazada del complejo R-E en presencia de DES, tanto de la forma molecular 8S como de la 4S.

Wittliff supuso entonces que de la dimerización ($4S + 4S \rightarrow 8S$) surgía la forma activa -8S- dotada de capacidad de translocación nuclear y responsable, por ello, de la acción hormonal (126). Dividió, entonces a sus pacientes de cáncer de mama en dos grupos: RE (+) y RE(-) y consideró como RE(+) sólo aquellos casos en los que se consiguió demostrar la presencia de la especie molecular 8S (asociada o no a la forma 4S) y comprobó que en tales pacientes el porcentaje de respuestas positivas a la manipulación hormonal ascendía al 75%, cifra claramente superior al convencional 60% de respuestas positivas admitido generalmente (20).

Los resultados de Wittliff no se han visto confirmados en la experiencia de otros autores. Para Tizler y col (227) por ejemplo la presencia, en los ensayos, de una u otra forma molecular resulta ser función del tiempo de incubación del estrógeno marcado con el homogeneizado tumoral en estudio. Parecidas conclusiones se derivan de las experiencias de Chamness y McGuire (27) y de todo ello se deduce que el establecimiento de una relación entre forma molecular del receptor y respuesta clínica es un problema erizado de dificultades en cuyo análisis debe quedar previamente clarificada la relación existente entre la forma molecular del receptor y las condiciones físico-químicas de realización del en-

sayo. En este sentido, trabajos anteriores realizados en nuestro Departamento (58,59) nos han permitido establecer que en función de las condiciones en que se realiza el ensayo (tiempo de incubación, presencia de inhibidores enzimáticos o modificaciones en la fuerza iónica del medio) es posible identificar especies moleculares diversas y se ha descrito que la macromolécula receptora está constituida por ocho subunidades o protómeros que se asocian formando dímeros, tetrámeros (forma de coeficiente de sedimentación 4S) y octómeros (forma de coeficiente de sedimentación 8S). El cálculo de los pesos moleculares aparentes de estas proteínas (30, 60, 100 y 200 - Kdalton) y los coeficientes de asimetría (f/f_0) encontrados justifican esta hipótesis.

Aunque los aspectos moleculares de la interacción entre esteroides y receptores permanecen aún oscuros, los progresos en caracterización de la estructura cristalina de ciertas proteínas plasmáticas purificadas a las que los esteroides se enlazan con alta afinidad, permiten suponer que una metodología similar podría ser aplicada al estudio de las interacciones Receptor-estrógeno. Se piensa (49) que el esteroide se une al receptor a través de dos enlaces por puentes de hidrógeno y por fuerzas de Van der Waals que estabilizan el complejo. La energía de enlace (aproximadamente 12 Kcal/mol) se reparte de manera aproximadamente igual entre ambos tipos de interacciones. La flexibilidad de la proteína, es probablemente limitada y el enlace R-E induce ciertos cambios en la conformación protéica quizás a través de interacciones sucesivas a partir de una configuración inicial. La influencia que, sobre la afinidad del enlace, tiene el cambio de radicales introducidos en la estructura básica de los esteroides, sugiere que el enlace se establece por varios puntos, de acuerdo con un modelo biofísico intermedio entre el de la llave-cerradura y el de cremallera.

1.5.3. Activación del Complejo Receptor-Estrógeno

El modelo de acción hormonal en doble escalón de Jen (110) supone que el enlace del estradiol a la estrofilina, induce la conversión de ésta a una forma activa capaz de translocarse al núcleo en cuyo interior el complejo RE activado se asocia a la cromatina y, de alguna forma, desencadena la síntesis de diversos tipos de RNA que son característicos de tejidos hormono-dependientes. Con este proceso se inicia una compleja serie de reacciones cuya expresión final es la acción trófica tisular. Este modelo sostiene que las moléculas del receptor estrogénico no enlazadas a la hormona se encuentran "exclusivamente" en el compartimento citoplasmático y que pasan al interior del núcleo cuando, en presencia de estradiol, se produce el proceso de activación y translocación de la estrofilina. De ello se deduce que la formación del receptor nuclear es absolutamente dependiente de la presencia de ambos: estradiol y estrofilina. Este mecanismo parece ser clave en la acción hormonal de los esteroides.

1.5.4. Interacción del Complejo RE con el DNA

La hipótesis de la unión entre la cromatina nuclear y el complejo RE está soportada por dos experiencias básicas: 1) La acción de las Deoxiribonucleasas sobre los núcleos de las células uterinas impide la formación del complejo nuclear estradiol-receptor (172) y 2) El estradiol enlazado en los núcleos de las células del útero puede ser liberado mediante tratamiento con deoxiribonucleasa (87). En general el enlace entre el RE y el DNA no parece depender del origen del DNA (23) aunque se ha sugerido que la forma molecular 4S del RE muestra un enlace preferencial con el DNA extraído de la ra

comparado con el DNA procedente de otros organismos (248). Ya Yamamoto y Alberts han demostrado que el enlace nuclear del receptor 4S se asocia con su conversión a una forma 5S por adquisición de una subunidad adicional (249).

Por otra parte el RE del citosol de útero de rata se -- enlaza en mucha más extensión a la cromatina uterina que a la extraída del hígado, bazo, pulmón o riñón. El enlace es saturable a altas concentraciones de RE (215). Cuando los estudios del enlace se efectúan en presencia de cromatina libre de histonas tanto la especificidad como el número de "sitios" de enlace se conservan (215). Las histonas, por tanto, no forman parte del aceptor para el RE y no existen evidencias de que proteínas no-histonas de la cromatina puedan constituir componentes primarios de los sitios aceptores para el receptor nuclear. Estas moléculas protéicas (no-histonas) parecen ser reguladoras de ciertas funciones genéticas específicas (216) y los estrógenos, si bien no inducen cambios cualitativos ni cuantitativos en las histonas, incrementan los niveles de proteínas cromosómicas no-histonas durante los precoces estadios de la diferenciación, para decrecer durante los estadios finales de la maduración (34).

1.5.5. Efecto del Estradiol sobre la Síntesis del RNA

La estimulación de la síntesis de RNA en el núcleo de células uterinas puede observarse a partir de los 10 minutos de la inyección intraperitoneal de estradiol (170). El análisis del RNA sintetizado puede efectuarse utilizando precursores marcados y separando por ultracentrifugación en gradiente de densidad el RNA nativo o desnaturalizado para evitar estados de agregación (127). El alto peso molecular de las especies RNA identificadas y su heterogeneidad permite postular que

las moléculas marcadas corresponden, efectivamente, a RNA nuclear. Este precoz incremento en la síntesis del RNA resulta bloqueado por la actinomicina D pero no por la cicloheximidina lo que sugiere que la continuada síntesis de proteínas no es necesaria para este efecto inicial del estrógeno (170).

Además de la estimulación precoz de RNA nuclear pocas horas después de la administración del estrógeno la síntesis de ribosomas 45S, 32S, 28S, 18S y 5S, muestra también un incremento (151,128) y se induce la síntesis de mRNA (128). Se ha demostrado, por otra parte, que los estrógenos inducen la síntesis de nuevas secuencias de RNA que no es posible identificar en células no estimuladas (30).

Las experiencias de Gorski (79) son demostrativas de la inducción por el $17\beta E_2$, del enzima Polimerasa I-dependiente del Mg en células del útero de rata inmadura. Esta estimulación se sigue del incremento en los niveles de Polimerasa II las 12-24 horas de la administración de estradiol, estimulación que ha resultado ser bifásica (71) con un primer pico a los 30 minutos de la inyección de $17\beta E_2$ y un segundo incremento de actividad cuando el tiempo entre inyección y detección sobrepasa las 12 horas. En contraste, el aumento de la Polimerasa I es monofásico y ocurre entre los 30-60 minutos. Hallazgos similares han sido encontrados por otros autores utilizando como tejido blanco de la acción estrogénica útero de conejo (15) y oviducto de pollo (44).

1.5.6. Efecto del Estradiol sobre la Síntesis de Proteínas Específicas.

Las hormonas sexuales esteroideas influyen sobre el crecimiento y la diferenciación de sus respectivos órganos blancos y se sabe que modulan el metabolismo de varios enzimas y de distintas proteínas estructurales (69,189).

Nobides y Gorski demostraron por electroforesis en gel la presencia de una banda de proteína específica denominada "proteína inducida" (P I) en el citosol de útero de rata y cuya síntesis estaba mediada por la acción del estrógeno (178). Experiencias tanto "in vivo" como "in vitro" ponen de manifiesto que la inducción de la síntesis ocurre a los 30-40 minutos de la administración de la hormona (112,212) y que puede ser bloqueada por la cicloheximina (178). La actinomicina D bloquea la inducción de la síntesis incluso a concentraciones del inhibidor que sólo tienen efectos mínimos sobre el resto de los procesos de síntesis proteica (48). La proteína inducida ha sido purificada y se ha demostrado que es un polipeptido de peso molecular aproximado 45.000 dalton (123). No se conoce cual es la función específica de esta molécula. Existen fuertes evidencias de que la inducción estrogénica de la proteína está mediada por la síntesis de su mRNA y que la velocidad de acumulación de este mensajero es el factor limitante del proceso de activación (24) y de ello puede pensarse que las hormonas esteroideas actúan predominantemente a nivel transcripcional.

Particular interés presenta el hecho de que el receptor de progesterona en las células uterinas sufre un notable incremento que se inicia a las 4-12 horas de la administración de estradiol y que tras cuatro días de tratamiento hormonal, los niveles de receptor de progesterona (RPG), cuantificados en c

tosol uterino llegan a ser 10 veces superiores a los que se encuentran en animales castrados (66). Cuando la administración de estrógenos se interrumpe, los niveles de RPg disminuyen lentamente con una vida media del orden de 3 días (66).

La identificación del receptor de estrógenos (RE) citoplasmático en cáncer de mama humano (102,103) y la posterior demostración en este mismo tumor de la presencia del RPg (97) ha llevado a proponer que este último receptor, cuya síntesis está controlada por los estrógenos pueda servir como un marcador de la acción estrogénica en cáncer de mama (98). Así, la presencia de RPg en un tumor podría indicar que la secuencia completa que incluye el enlace de $17\beta E_2$ al receptor citoplasmático, el movimiento del complejo RE hasta el núcleo, su enlace a la cromatina y la estimulación de productos finales es un camino metabólico cuya integridad puede suponerse para el tumor en cuestión (96).

En la línea celular establecida MCF-7 (213) el tratamiento durante 4 ó 5 días con $17\beta E_2$ (0,001 a 100 nM) ocasiona un incremento comprendido entre 3 y 6 veces respecto a los niveles basales de RPg. La respuesta del RPg al estradiol es dosis dependiente (96) y puede ser suprimida por la presencia en el medio de cultivo de antiestrógenos. Resultados similares han sido descritos por Allegra y col (1) utilizando la línea celular ZR-75-1 (55), demostrando además que concentraciones no fisiológicas de E_2 (10^{-6} Mo 10^{-11} M) no inducen la síntesis del receptor de progesterona.

En el momento actual no existe ningún test que pueda predecir de manera exacta, la eficacia de la terapia hormonal en cáncer de mama. La identificación de proteínas inducidas por acción de los estrógenos-peroxidasa (152), glicoproteína de 46.000 dalton (24), fosfoprotein-fosfatasa (165), IP (166),

múltiples proteínas inducidas por los estrógenos en la línea celular MCF-7 (165,240) y la posibilidad de que tales sustancias puedan servir como marcadores de la acción estrogénica y derivado de ello, de la hormonodependencia del cáncer de mama confiere a estas investigaciones extraordinario interés. La complejidad de la respuesta a la acción estrogénica en los modelos de tejidos o células blanco utilizadas y el hecho de que sean múltiples las proteínas cuya síntesis se induce por el estradiol, ha hecho pensar (165) que el análisis de una sola de ellas como criterio de la hormono-dependencia tumoral puede resultar engañoso. Por otra parte, el que alguna de estas proteínas inducidas, en la línea celular MCF-7, bajo la acción de los estrógenos estimulen la propia proliferación celular en el medio de cultivo (235) sugiere una función biológica para la IP cuyas implicaciones están aún por conocer.

1.6. UTILIDAD CLINICA DE LOS RECEPTORES DE ESTROGENOS EN CANCER DE MAMA

Durante los últimos diez años la doctrina terapéutica del cáncer de mama ha cambiado sustancialmente y sin temor a equivocación puede afirmarse hoy que este cambio se ha debido fundamentalmente al desarrollo y amplio uso de los ensayos de determinación de receptores (163,141) y al establecimiento de su valor predictivo respecto a la dependencia hormonal de determinado grupo de tumores (33, 90, 122). Hoy día se sabe que en aquellos tumores en los que no es posible detectar la presencia de receptores de estrógenos la probabilidad de respuesta a la terapéutica hormonal es prácticamente nula, mientras que los tumores RE (+) ofrecen variables, pero positivos tipos de respuesta a la terapia endocrina en una alta proporción de casos (90, 122). El empirismo que, durante muchos años -estado menopáusico, intervalo libre de enfermedad, respuesta a -

la manipulación endocrina previa, localización de la lesión metastásica dominante, etc- ha presidido la elección del tratamiento hormonal de las enfermas de cáncer de mama, ha dejado paso hoy a un procedimiento objetivo y racional, que permite a los médicos seleccionar para las enfermas, un esquema terapéutico específico. Quizás por ello, la determinación del fenotipo tumoral, en términos de receptor, haya alcanzado en la actualidad, tan enorme difusión. Así, más que preguntarnos hoy por la frecuencia de presentación del receptor, su relación con el estado menstrual de las pacientes y la probabilidad de respuesta ulterior al tratamiento hormonal, hemos de dar contestación a preguntas de mayor envergadura. A título de ejemplo se pueden enunciar las siguientes:

a) ¿Cual es el valor de un ensayo de receptores realizado en el tiempo de la mastectomía para predecir la respuesta tumoral al tratamiento endocrino llevado a cabo meses o años después ante el desarrollo de una situación clínicamente metastásica?

b) ¿En qué medida, en pacientes de alto riesgo de existencia de enfermedad microscópica distal (N axilar por ejemplo) el resultado de un ensayo de receptores realizado sobre un fragmento de la pieza quirúrgica de mastectomía puede sentar la indicación de hormonoterapia a título adyuvante?

c) ¿Es importante, y se derivan consecuencias clínicas apreciables de ello, el nivel de concentración de receptor estimado en los ensayos?

d) ¿Cual es el papel del receptor de progesterona en la dependencia endocrina del tumor?. ¿ Tiene valor su perfil cuantitativo en la selección de pacientes para tratamiento hormonal?

e) ¿Es el fenotipo tumoral RE(+) o RE(-), en sí mismo considerado, un factor de pronóstico independiente de los otros?

f) ¿Correlaciona la presencia y concentración del receptor con el curso progresivo de la enfermedad en las pacientes que metastatizan?

g) ¿Cómo pueden mejorarse los índices de respuesta positiva al tratamiento endocrino?.

Utilizando los resultados de experiencia propia de nuestro grupo de trabajo (50, 58, 150) y a la luz de los datos existentes en la literatura sobre el tema trataremos de exponer aquí el estado actual de opinión acerca de éstas y otras cuestiones relacionadas con los ensayos de determinación de receptores.

1.6.1. Frecuencia de Presentación de RE y RP en Cáncer de Mamma

La frecuencia de presentación de los distintos fenotipos de receptor RE y RP varía según los autores y el centro de trabajo respectivo. Varias razones explican las diferencias publicadas:

a) El método de análisis empleado:

En efecto los niveles de concentración, y en cierta medida, la positividad o negatividad del ensayo en un homogeneizado tumoral cualquiera, están directamente relacionados con el método empleado para su determinación. El más ampliamente utilizado de ellos (absorción del estradiol o la progesterona libre utilizando carbón-dextrano-DCC-), ofrece, por ejemplo, valores más bajos de RE y/o RP que los que se obtienen cuando se utiliza protamina o hidroxapatita como elementos de separación.

ción entre fracción libre y fracción enlazada (121,191). Por otra parte, la incorrecta valoración de los enlaces no específicos del $17\beta E_2-^3H$ a proteínas citoplasmáticas distintas de la receptora puede conducir a resultados anormalmente altos - (60).

b) Expresión del resultado final:

Como quiera que la presencia de RE o RPg en el citosol procedente del homogeneizado tumoral se expresa en términos relativos a proteína total (fmol/mg) la no corrección del resultado final por la cantidad de albúmina presente conduce, necesariamente, a una infraestimación que puede alcanzar según los datos de nuestro laboratorio (58), hasta un 7%. El carácter RE (+) o RE (-) o RPg (+) o RPg (-) depende, por otro lado, del nivel de concentración que se considere mínimo para dar el caso como positivo o negativo. En nuestro grupo de trabajo se ha adoptado, a este respecto, el criterio de dar como RE (+) a todo tumor con una concentración estimada de receptor estrogénico igual o superior a 5 fmol/mg y como RPg (+) a todo tumor con una concentración de receptor de progesterona igual o mayor que 10 fmol/mg.

Tomando como base las anteriores consideraciones los resultados obtenidos en nuestro Departamento, analizando la presencia y nivel de concentración de RE en 94 pacientes afectas de cáncer de mama, en diferentes momentos de su evolución clínica, ofrecen un porcentaje de positividad para RE del 68% cifra similar a la encontrada por otros investigadores (154). El rango de concentraciones observado, que osciló entre 5 y 181 fmol/mg, fué, en cambio, inferior al publicado por otros (142, 204). La explicación a esta diferencia hay que buscarla en la corrección sistemática por la albúmina, que de llevarse a efecto sobre estima la tasa real del receptor en un 5-10% - (60).

Por lo que al receptor de progesterona se refiere, la frecuencia observada del fenotipo RPg (+) fué del 45% y su rango osciló entre 10 y 400 fmol/mg (58).

1.6.2. Influencia de la Edad y del Estado Menstrual sobre la Presencia y Nivel de Concentración de RE y RPg

Clásicamente se considera que, en pacientes postmenopáusicas, la proporción de tumores con RE (+) se incrementa con la edad y lo mismo ocurre, aunque en menor grado, con el RPg (158). Según datos de Saenz y col (198) los picos de máxima incidencia que se situarían entre 50 y 70 años oscilan entre el 66% para RE (+) y 37% para RPg (+). En situación premenopáusica estas cifras caen significativamente, según los datos obtenidos en nuestro departamento (42% para RE (+) y 17% para RPg (+)) (58) o las publicaciones de distintos autores (156,198, 204).

La explicación dada a este fenómeno hace uso de un hecho de observación simple: En pacientes premenopáusicas la elevada tasa de estrógenos circulantes puede conducir a una situación de saturación total o parcial, de los sitios de ligadura del receptor que haría difícil su detección toda vez que no habría lugar al enlace del $17\beta E_2-^3H$ en cuantía significativa como para su identificación. Esta tesis no parece suficiente, sin embargo, para dar una respuesta satisfactoria a dos importantes cuestiones: a) Cuando el ensayo se realiza a 30°C, con propósitos de medir la tasa total de RE ocupado y no ocupado por hormona circulante, las diferencias entre los subgrupos de mujeres pre y postmenopáusicas se mantienen (11, 141, 142). b) Si tales diferencias fuesen debidas sólo al proceso de saturación del receptor por estrógeno circulante endógeno debería existir una proporción de tumores RE (-)

en pacientes premenopáusicas que, en respuesta al tratamiento hormonal, presentasen una remisión objetiva, hecho que dista mucho de la realidad (133).

Saenz y col (198) en el intento de encontrar una interpretación posible a este fenómeno han argumentado que la edad independientemente del estado menstrual, puede ejercer una importante influencia sobre los datos experimentales. En efecto en pacientes postmenopáusicas aunque el contenido tumoral en RE crece desde los 40 hasta los 70 años (80 fmol/mg de media frente a 152 fmol/mg según datos de nuestro grupo (58)), las desviaciones en la concentración de RE difieren considerablemente para idénticos grupos de edad. Por el contrario en pacientes premenopáusicas el contenido en RE se mantiene dentro de un rango menos variable, sin existencia de cambios atribuibles a la edad. Se desconocen por el momento las razones de causalidad del fenómeno descrito.

1.6.3. RE/RPg y Estadío de la Enfermedad

Se ha aceptado generalmente que el carcinoma mamario se hace menos hormono-dependiente durante la progresión de la enfermedad. Esta idea choca sin embargo con dos clases distintas de observaciones experimentales (158, 198): a) en ensayos de determinación de receptores realizados a partir de piezas tumorales obtenidas en el curso de una mastectomía o una excisión biopsia reglada en enfermas de cáncer mamario, estadíos I-II-III, no se han objetivado diferencias significativas tanto en la frecuencia del fenotipo (RE (+)) como en la concentración del receptor. b) de igual modo, en pacientes estadío IV (situación clínica de metástasis, la incidencia y la tasa del receptor no difiere estadísticamente de las encontradas en otros estadíos.

Los resultados de nuestro grupo (58) coinciden estrechamente con las observaciones anteriores: En 67 ocasiones se midió la tasa de receptor estrogénico en el tumor primario y en 27 casos la determinación del receptor se realizó sobre piezas tumorales extraídas de focos metastásicos. La frecuencia de presentación del fenotipo RE (+) fué 67% y 69% en primario y metástasis respectivamente. El fenotipo RPg (+) que se investigó en 35 tumores primarios y 20 áreas de metástasis se presentó en ambas localizaciones sólo en el 42% de los casos. Las concentraciones medias de RE(+) y RPg(+) en primario y metástasis fueron del mismo orden de magnitud. Resulta claro por lo tanto que la progresión loco-regional o metastásica de la enfermedad, no introduce "per se", ningún elemento de disparidad en el contenido tumoral de receptores.

1.6.4. RE en el Tumor Primario. Subgrupo de Pacientes en Riego y Respuesta Endocrina Ulterior

Una cuestión importante en los ensayos de determinación de receptores, viene dada por la hipótesis de si el resultado de ensayos realizados en el tiempo de la mastectomía sigue siendo válido, años más tarde, en caso de desarrollo de metástasis, para predecir la respuesta a un posible tratamiento hormonal. La importancia del hecho en cuestión radica en que menos del 50% de las pacientes con enfermedad avanzada presentan lesiones accesibles para biopsia y ensayo, mientras que en el 100% de las enfermas sometidas a cirugía mamaria la disponibilidad de tejido tumoral para estudio de receptores es real. La objeción teórica a la hipótesis anterior es que el estado RE de un tumor determinado puede cambiar en el periodo de tiempo comprendido entre la cirugía del primario y la aparición de las metástasis, objeción desprovista de base científica por dos órdenes distintas de razones.

a) Por la similitud de resultados obtenidos en cuanto a la presencia de receptor se refiere, entre primario y metástasis en un cierto número de pacientes (apartado 1.6.3.).

b) Por la igual respuesta terapéutica observada al tratamiento endocrino en tumores RE(+) cuando el fenotipo del receptor se determinó, bien sobre tejido tumoral obtenido de la excisión-biopsia del primario o de la de un foco metastásico ulterior según han demostrado concluyentemente McGuire (158) y Block (10).

Por otra parte, como quiera que la mayor parte de las enfermedades de cáncer de mama con axila histológicamente positiva acaban muriendo por enfermedad metastásica y el tratamiento adyuvante ha venido a demostrar la posibilidad de curación real de un cierto número de tales casos (el razonamiento operante en la introducción de la terapia adyuvante es que en pacientes N(+) la extensión tumoral a los linfáticos axilares es equivalente al hallazgo de micrometástasis distales y que el tratamiento citotóxico, en tal situación puede conducir al éxito), la decisión crucial, hoy día, no es si conviene o no la terapéutica adyuvante a las enfermas N(+) sino qué drogas, durante cuanto tiempo y a qué tipo de pacientes han de ser administradas (195) y si la hormonoterapia puede o no ser utilizada como arma terapéutica adyuvante en pacientes RE(+). Los resultados iniciales así parecen indicarlo puesto que, en la experiencia de McGuire (158), las enfermas N(+)/RE(+) presentan menores índices de recidiva cuando se tratan con una combinación quimio-endocrina que cuando reciben quimioterapia sólo, mientras que las enfermas N(+)/RE(-) no exhiben diferencias en los niveles de recidiva se añada o no la terapéutica antiestrogénica a la quimioterapia.

He aquí, en consecuencia, dos razones fundamentales para justificar la realización del ensayo de receptores al me-

nos en la totalidad de las enfermas de cáncer de mama N(+) axilar.

1.6.5. Concentración de RE y Respuesta Terapéutica

Es evidente que el ensayo RE es más útil cuando el tumor presenta el fenotipo RE(-) que cuando se presenta bajo la forma RE(+). En el primer caso las pacientes rara vez responden al tratamiento endocrino. En el segundo la respuesta positiva no se encuentra garantizada, aproximándose como ya sabemos, al 40% el número de fallos terapéuticos.

Durante mucho tiempo a partir de la hipótesis de que los tumores con alto nivel de receptores estarían constituidos por una elevada proporción de células RE(+), se ha venido especulando con la idea de que la cuantificación del contenido RE en la pieza tumoral podía constituir un elemento discriminante en la predicción de respuesta al tratamiento hormonal. Aunque los resultados conocidos parecen, en algunos casos, contradictorios entre sí, se va abriendo paso en la actualidad, una amplia convergencia de criterios en torno a este importante tema.

En un reciente análisis de casi 200 ensayos clínicos orientados hacia la demostración de los beneficios derivados en la terapia hormonal, McGuire (158) ha encontrado elementos de acuerdo básicos que demuestran, efectivamente, que tumores de mama con niveles de RE indetectables o muy bajos ofrecen una muy escasa respuesta al tratamiento endocrino, mientras que aquellos otros con alto contenido en receptores presentaron índices de respuesta muy elevados. Parece por ello que en cáncer de mama, no sólo el fenotipo del receptor RE(+), sino, sobre todo, su nivel de concentración en el citosol, in

crementan la seguridad de los clínicos en la selección de enfermas para tratamiento endocrino.

1.6.6. RPg y Respuesta Endocrina

Aún con elevados niveles de concentración de receptor no todos los tumores RE(+) ofrecen una respuesta al tratamiento hormonal clínicamente objetivable. La explicación de este fenómeno dista mucho de ser conocida con exactitud. Hace algunos años Horwitz (98) razonó que puesto que la ligadura del receptor con el estrógeno era sólo la primera etapa de un complicado mecanismo bioquímico que conducía a la síntesis de proteína y crecimiento celular posterior de los tumores de mama, quizás la existencia de algún defecto en la etapa final de este proceso podría explicar la inexistencia de respuesta en tumores RE(+) y como quiera que tanto a nivel experimental como en el cáncer de mama humano la síntesis de RPg parece estar sometida al control de los estrógenos, se sugirió la hipótesis de que la presencia de RPg en el homogeneizado de un determinado tumor venía a significar la permanencia intacta del mecanismo de acción de los estrógenos y, por tanto, en tales tumores, el porcentaje de respuesta a la manipulación endocrina debería ser muy elevado.

Así resultó ser, en efecto. Los porcentajes de respuesta positiva al tratamiento endocrino observado en una amplia serie de 1.366 pacientes afectas de cáncer de mama, publicada por McGuire y col (158) fueron del 10%, 55%, 33% y 75% respectivamente para los fenotipos (RE(-), RPg(-)), (RE(+), RPg(-)), (RE(-), RPg(+)) y (RE(+), RPg(+)). La fracción de tumores que contiene, sólo RPg(+) es muy baja -según los datos de nuestro laboratorio del orden del 3% del total de ca-

sos analizados (58)- y difícil de explicar en la actualidad teniendo en cuenta que la síntesis de la proteína RPg se encuentra bajo la dependencia de los estrógenos. De los grupos considerados el más interesante es quizás El RE(+)/RPg (-), en el que, teóricamente, son posibles muy escaso número de respuestas terapéuticas, de acuerdo con la hipótesis de McGuire. Algunas explicaciones para la existencia real de este grupo pueden ser las siguientes: a) Imperfección del ensayo de determinación de RPg (el fenotipo (RE(+), -RPg(-)) sería en consecuencia un negativo falso (198). b) Influencia de los niveles circulantes de progesterona (especialmente en la fase lutea del ciclo menstrual de las enfermas premenopáusicas (198). c) Nivel insuficiente de estrógenos circulantes para estimular la síntesis de RPg en el tumor, aún en condiciones de normalidad del mecanismo bioquímico de la acción estrogénica (posible en enfermas postmenopáusicas). Se ha podido demostrar (125) a este respecto que la determinación del RE antes y después de la terapéutica estrogénica convirtió en RPg(+) a la mayor parte de sus pacientes RPg(-) previas..

La mayor frecuencia de respuestas positivas en el grupo de pacientes (RE(+), RPg(+)) junto con la noción de mejor predicción de respuesta en pacientes con RE(+) con elevada concentración de receptor estrogénico sugiere que la determinación cuantitativa del RE asociada con el ensayo de RPg, constituyen dos piezas esenciales en el establecimiento de la hormonodependencia tumoral del cáncer de mama. Una cuestión no resulta aún es si ambos ensayos son o no necesarios. Puesto que tumores con altos niveles de RE se asocian con mayor frecuencia con RPg(+), podría ocurrir que los dos ensayos estuvieran seleccionando el mismo subgrupo de pacientes. De esta manera un RPg(+) podía ser, simplemente, un marcador de aquellos tumores con RE(+) alto. En cualquier caso, los datos actuales referentes al tema indican -

que el ensayo de RPg supone un importante elemento de decisión para el clínico a la hora de decidir el tratamiento de sus enfermas con cáncer de mama.

1.6.7. RE y Pronóstico en Cáncer de Mama

La primera evidencia del papel como elemento de pronóstico que poseen los receptores estrogénicos en cáncer de mama es reciente. Fué publicada por Knight y col en 1.977 (). En ella quedó demostrado que independientemente del estado axilar, la edad, el tamaño del primario y la localización de éste en la mama, las pacientes con tumores RE(+) recidivan menos que las pacientes con fenotipo tumoral RE(-) y muestran por otra parte, mejores índices de supervivencia global. Posteriormente Maynard (167) y Bishop (9), hicieron notar que el fenotipo RE carecía de valor discriminante en el pronóstico de las enfermas con tumores en estadio I, pero resultaba de valor fundamental en presencia de invasión linfática axilar. En efecto los niveles de supervivencia libre de enfermedad en pacientes postmenopáusicas tratadas sólo quirúrgicamente resultaron ser 89% "VS" 61% (2 - años) y 49% "VS" 15% (3 años). Estudios posteriores han confirmado los anteriores datos. Rich y col (197) por un lado, Capinski y Donegan por otro (68), Samaan y col (199) y Kinne (124) en cuarto lugar, han puesto de manifiesto el peor pronóstico, un mayor nivel de recidiva y una más baja supervivencia en pacientes RE(-), es estadio II sobre todo con 4 o más nódulos axilares positivos.

Maynard y col (167) fueron, por otra parte los primeros en describir la existencia de una estrecha correlación entre el fenotipo del receptor y el grupo de diferenciación

tisular. Su estudio, posteriormente confirmado (197, 118), puso de manifiesto la frecuente asociación existente entre el fenotipo RE(-) y el grado histológico III de diferenciación tumoral (tumor escasamente diferenciado). Actualmente, y en virtud de correlaciones de orden histológico establecidas -- con el fenotipo tumoral RE(+)/RE(-) por Antoniades y Spector (4) Fisher (64) y Lesser (145) entre otros, ha quedado claro que los tumores RE(+) suelen presentar un buen o moderadamente buen grado de diferenciación tumoral (I-II), alto grado nuclear (II-III), ploidia normal, bajo ritmo de crecimiento (tiempo de duplicación largo) y respuesta del huesped mínima (traducción de un potencial invasor del tumor escaso), datos, todos ellos, de buen pronóstico.

Por el contrario los tumores RE(-) suelen presentar escasa diferenciación tumoral, bajo grado nuclear, aneuploidia cortos tiempos de duplicación y marcada respuesta defensiva del huesped (en términos de infiltrado inflamatorio peritumoral). Los datos de observación resultantes de las experiencias realizadas en nuestro laboratorio (58) coinciden con lo anteriormente expuesto. En efecto, ha sido posible demostrar que el mejor grado de diferenciación tumoral, la ausencia de una reacción defensiva del huesped (indicio de crecimiento celular lento y por tanto de escasa agresividad tumoral), la presencia de elastosis tumoral (que junto con la presencia de elementos tumorales constituyen elementos característicos de diferenciación tumoral) y el escaso desarrollo de necrosis tumoral (frecuente en tumores agresivos de rápida cinética) se asocian sistemáticamente con el fenotipo RE(+).

De todo ello, es fácil deducir a la luz de los datos actuales, que la caracterización tumoral en base a la presencia o ausencia de receptores hormonales, se presenta como un elemento de primordial importancia en el establecimiento del pronóstico y la estrategia terapéutica, de las enfermas afectas de cáncer de mama.

1.7. EL METODO DE ENSAYO CLASICO. GENERALIDADES

La estimación cuantitativa de la cantidad de proteínas intracelulares que poseen "locus" de unión para los estrógenos, puede efectuarse tomando como base los niveles de hormona marcada enlazada específica e inespecíficamente a los componentes macromoleculares del citosol.

El ensayo se basa en la separación de la fracción de hormona ligada respecto a la fracción libre en dos situaciones experimentales distintas:

a) Cuando en el medio existe, exclusivamente, citosol y hormona marcada. En estas condiciones la cuantificación de cada una de las fracciones (libre y ligada) permitirá conocer la cantidad total de hormona enlazada a las proteínas (enlaces específicos e inespecíficos).

b) Cuando en el medio existe citosol, hormona marcada y hormona fría. La presencia de un competidor frío, añadido en exceso, al medio de reacción, ocasiona el desplazamiento del estrógeno marcado de los sitios de unión específicos que poseen las moléculas receptoras.

Este proceso de enlace, tiene como característica fundamental el hecho de que a partir de determinado nivel de concentración de hormona, la cantidad de ésta, específicamente enlazada es constante e independiente de su concentración en el medio y, debido a ello, la existencia de una molécula o similar, no radiactiva, capaz de competir con la hormona marcada por el sitio de unión, produce, por simples razones de probabilidad, -el competidor se adiciona en relación superior a 100:1 respecto a la hormona marcada- la situación de los enlaces específicos de unión por moléculas no radiacti-

vas. No ocurre así con los denominados "enlaces no específicos" puesto que este tipo de asociación es no saturante y la cantidad de hormona marcada que se fija a las macromoléculas no resulta modificada por la presencia en el medio de la molécula "fría".

La separación de la fracción enlazada respecto a la fracción libre ofrecerá, en la situación b, una estimación de los enlaces no específicos. Por último la diferencia entre la cantidad enlazada total y la correspondiente a las uniones no específicas dará como resultado la cantidad de hormona "específicamente" enlazada al receptor.

1.7.1. Limitaciones de los Procedimientos Analíticos de Cuantificación de Receptores Estrogénicos.

1.7.1.1. La Degradación del Receptor

Existe acuerdo general acerca de que los tumores mamarios utilizados para la determinación de receptores hormonales deben, tras la cirugía, ser mantenidos en refrigeración y procesados inmediatamente o bien, si el ensayo se pospone desde algunas horas a varias semanas- congelados en N_2 líquido y almacenados a $-70^{\circ}C$ hasta su análisis (57, 135, 162). La importancia de este proceder ha sido destacada por Leclercq y col (143) quienes atribuyen el más alto porcentaje de tumores ER(+) encontrado en su serie, a la más rápida y mejor coordinada manipulación del espécimen tumoral desde la sala de operaciones hasta el quirófano. El receptor de estrógenos es termolábil, (la exposición de citosol a la temperatura de $60^{\circ}C$ durante 1 hora inactiva al receptor (131).

La degradación del receptor es un proceso que tiene lugar incluso a baja temperatura (4°C) y durante el tiempo de desarrollo del ensayo que conduce a su determinación. Se ha demostrado que tiempos de incubación, citosol $-17\beta E_2^3H$, superiores a 12 horas conducen a una infravaloración de la capacidad de enlace (B_{Max}) del citosol por degradación del receptor que puede alcanzar hasta un 30% menos que el valor de su máxima capacidad de enlace (58).

Las recomendaciones de la EORTC (57) incluyen una muy detallada descripción del procedimiento de homogeneización tisular para evitar en lo posible la degradación del receptor que puede ser ocasionada por elevación de la temperatura en la etapa de obtención del citosol. La pulverización del trozo de tejido tumoral, tras congelación en nitrógeno líquido y la homogeneización de este polvo en un volumen de tampón 3-4 veces superior al peso de muestra, en condiciones de temperatura controlada (baño de hielo) y utilizando un homogeneizador vídrio-teflón, permite obtener un citosol "crudo" que debe ser ultracentrifugado a 100.000g durante 1 hora a 4°C para separar los núcleos, membranas y organelas celulares de la porción soluble citoplasmática (190). Si bien pequeñas modificaciones en el pH del medio no tienen influencia sobre la estabilidad del receptor (29) es usual el empleo de soluciones tampón de pH=7,4. Por otra parte, numerosos trabajos destacan la importancia de los grupos sulfidrilo en la molécula receptora y la necesidad de utilizar agentes protectores de estos grupos, como el monotioglicerol o el ditiotreitól (17). Efectos parecidos consigue la adición de inhibidores de las proteasas como la leupeptina (230) o el molibdato sódico (230). El molibdato sódico protege al receptor estrogénico posiblemente por inducir directa o indirectamente un cambio conformacional en la proteína que impide, al menos parcialmente la acción de las proteasas (230), o bien porque el $MoO_4^{=}$ actúe directamente como inhibidor de las fosfatasa (232). El positivo efecto que ejerce la adición de $MoO_4^{=}$ al medio en el que la

reacción entre receptor y estradiol le lleva a cabo, ha sido también puesta de manifiesto recientemente por nuestro grupo de trabajo (59).

1.7.2. Reproductibilidad del Ensayo

La dilución del citosol a niveles de concentración de proteínas bajos (inferiores a 1mg/ml) ocasiona una infravaloración de la proteína receptora cuantificada en términos de f mol de E_2 - 3H enlazado por mg de proteína (190) cuando el ensayo se realiza sobre diluciones de citosol comprendidas entre 1 y 5 mg/ml de proteína la capacidad de enlace máxima (fmol/mg) no se modifica, pero el valor de la constante de disociación (K_d) entre receptor y hormona, estimada por la transformación de Scatchard (203), resulta función directa de la concentración protéica, estableciéndose entre ambas magnitudes una correlación positiva estadísticamente cierta (190). Por otra parte, si bien la cantidad de carbón-dextrano no parece tener influencia sobre el valor de B_{Max} , la constante de disociación, K_d , decrece cuando la cantidad de absorbente se incrementa (190).

El método de absorción de la fracción libre de estradiol utilizando carbón-dextrano (129) tiene, en su realización, ciertos problemas. Dispersiones notables en torno al valor medio de RE cuantificados, en repetidos ensayos, sobre la misma muestra de tejido, han sido referidos por diversos autores (52). De un lado el procedimiento de enlace de un radioligando es una técnica más compleja que cualquier procedimiento de análisis bioquímico propio de un laboratorio de Química clínica y de otro, como anteriormente hemos puesto de manifiesto, el receptor es termolábil. Ambas circunstancias justifican que, a pesar de la cuidadosa manipulación del espécimen

tumoral y la estandarización intralaboratorio de cada una de las etapas del ensayo, los errores en la cuantificación final de la tasa de RE sean apreciables. Por otra parte, las modificaciones de la técnica empleada en los distintos laboratorios -composición de tampones, rango de concentración del $^{17}\beta$ -E₂ utilizado, concentración de proteínas y carbón-dextrano, procedimiento de separación entre fracción libre fracción ligada, tratamiento de los datos de enlace, expresión del resultado final e incluso nivel, o umbral de decisión, para la distinción entre receptor estrogénico positivo y negativo-, ha condicionado que, hasta ahora, los datos ofrecidos por instituciones distintas no puedan ser comparados a un nivel más general.

Considerando lo anteriormente expuesto y teniendo en cuenta que el valor predictivo del ensayo RE, si bien puede ser aceptado como óptimo para el caso RE(-), dista mucho de ser algo más que orientativo en el caso RE(+), han sido numerosos los intentos de establecer un control de calidad, para el ensayo RE, intra e interlaboratorios (119, 120). En algunos casos, la heterogeneidad de la muestra (los fragmentos del espécimen tumoral pueden ser heterogéneos en relación a la composición celular de los mismos), o la inestabilidad del receptor en el citosol pueden, por si solos, justificar las variaciones interlaboratorio encontradas (192).

De cualquier forma, la necesidad de un control de calidad se hace evidente y en el intento de estandarizar los métodos tiene especial relevancia el trabajo de Bojar y col (12) que describe la utilización tejido procedente de útero de vaca, pulverizado y liofilizado, como muestra patrón de concentración conocida. La estabilidad de esta preparación permite su almacenamiento a temperatura ambiente durante un plazo de dos semanas sin pérdida en la capacidad de enlace para el $^{17}\beta$ -E₂ e incluso el tratamiento térmico de la mues-

tra durante 16 horas a la temperatura de 80°C reduce, sólo parcialmente (N 40%), la capacidad de enlace para el $17\beta E_2$, de la muestra. Los análisis de la forma molecular del receptor utilizando ultracentrifugación en gradiente de densidad pone de manifiesto que el almacenamiento del liofilizado a temperatura ambiente no supone tampoco la disociación del complejo desde la forma molecular 8S a la 4S (12).

En 1.972 la EORTC Breast Cancer Cooperative Group (57) acordó la recomendación de ciertos aspectos metodológicos para unificar las técnicas del ensayo de RE en cáncer de mama. En 1.979 una segunda reunión de trabajo definió los criterios metodológicos "tipo" para la realización tanto de los ensayos RE como RPg, que debían ser seguidos por las instituciones integradas en los ensayos clínicos dirigidos por este organismo (61). Los participantes en esta reunión eligieron la utilización de muestras liofilizadas como preparaciones de referencia, para el control de calidad de los ensayos, basados precisamente en la termoestabilidad que tales preparaciones presentan (7, 12, 130). Los resultados de la experiencia conjunta de 13 laboratorios europeos especializados en los análisis de Receptores han sido publicados por Koenders y col (131,132). Todos los laboratorios analizaron tres muestras de citosol liofilizado durante 9 días consecutivos de trabajo y una cuarta preparación fué analizada tres veces. Los métodos tanto para la cuantificación del receptor (análisis de múltiples datos de enlace por la transformación de Scatchard) como para la determinación de la concentración protéica (16) fueron siempre los mismos en todos los laboratorios. A pesar de esta uniformidad metodológica, los resultados son decepcionantes: Excluyendo uno de los laboratorios participantes, cuyos resultados distaban más de tres desviaciones estandar en relación a los valores medios, del resto, los rangos de concentraciones de RE expresadas en fmol/mg de proteína, oscilan entre 813 y 2.133 fmol/mg para el liofil-

zado de más alta concentración, entre 393 y 1.033 fmol/mg para el liofilizado de concentración media-alta y entre 150 y 668 fmol/mg para la muestra de nivel medio-bajo. Los coeficientes de variación intralaboratorio oscilan entre el 3% y el 38%; y las oscilaciones en el valor de las constantes de disociación K_d , tanto inter como intralaboratorios, son amplias (intervalo 0,1 a $2 \cdot 10^{-9}$ M). Cuando el citosol es tratado térmicamente para inactivar el receptor, los resultados generales encontrados por todos los laboratorios participantes concuerdan en la negatividad RE de la muestra (131) y, quizás, lo más positivo de la experiencia sea que cuando los niveles de RE en las muestras utilizadas como standar son bajos (132), las dispersiones de los datos interlaboratorio, al menos en 10 de los 13 participantes, están comprendidas en rangos biológicamente tolerables y ello hace posible pensar en ensayos clínicos multicéntricos basados en status RE del tumor mamario (132). Resultados similares han sido comunicados por Zava y col (153) que demuestran, a pesar de la dispersión de los datos de $B_{máx}$ y K_d , una concordancia cierta en la identificación de muestras con contenido RE y RPg bajo, medio y alto.

1.8. PROCEDIMIENTOS ALTERNATIVOS PARA LA CUANTIFICACION DE RECEPTORES DE ESTROGENOS

La descripción de otras metodologías para la cuantificación de receptores a hormonas esteroideas en tejidos blanco de esta acción hormonal, con el objetivo de mejorar los resultados ofrecidos por el procedimiento clásico de Korenman (129), es una constante en los últimos 15 años. La introducción Protamina como agente precipitante de la forma molecular 8S (214) enlazada al estradiol permitió describir la presencia de la forma molecular 4S, parcialmente, precipitable por la protamina, en el citosol de útero de ratas maduras.

La protamina precipita el receptor presente en el citosol de los tejidos hormonodependientes tanto si éste se encuentra libre (R) como si está ocupado por estrógenos endógenos (RE). Después de la precipitación, el $17\beta\text{E}_2\text{-}^3\text{H}$ se enlaza cuantitativamente al R a las temperaturas de 0°C y 30°C , sin embargo la forma RE sólo enlaza hormona tritiada, a la temperatura de 30°C a través de reacciones de intercambios entre la hormona marcada y la fría (26). El ensayo realizado a la temperatura de 30°C permite, entonces, cuantificar la cantidad total de receptor presente en el citosol. La principal ventaja de la técnica de precipitación con protamina es que muchas proteínas que enlazan inespecíficamente la molécula radiactiva quedan en el sobrenadante con lo que los enlaces no específicos disminuyen (214). La separación entre $17\beta\text{E}_2$ libre, $17\beta\text{E}_2$ ligado inespecíficamente y $17\beta\text{E}_2$ enlazado al receptor ha sido llevada a cabo utilizando técnicas de electroforesis (134, 236). Una metodología, algo más compleja basada en la competencia de $17\beta\text{E}_2$ radiactivo y no radiactivo por el enlace al receptor, ha sido descrita por Hawkins y col (88), aunque los coeficientes de variación intralaboratorio (16% para $B_{\text{máx}}$ y 33% para K_d), no parecen mejorar la precisión del test analítico en relación al procedimiento de Koenman (129).

Para resolver los problemas de escasez de muestra que en muchas ocasiones se presentan, se han propuesto diversas metodologías. Una de ellas, quizás la más simple, utiliza una concentración única saturante de $17\beta\text{E}_2$ y el método de separación con carbón-dextrano (57, 60, 157) o hidroxapatita (67). Mediante estos procedimientos es posible estimar la concentración de receptores estrogénicos a partir de trozos de tejido tumoral mínimos.

La comparación de la técnica que utiliza Hidroxapatita (HAP) respecto a la DCC (191) ha permitido demostrar que

los niveles de $B_{\text{máx}}$ encontrados por uno u otro procedimiento, difieren ligeramente, aunque los valores de K_D resultan equivalentes. Cifras significativamente más altas para el "background" se encuentran cuando se utiliza el test HAP (191).

El isoelectro-enfoque ha sido propuesto como un procedimiento alternativo para separar los receptores estrogénicos, de otras proteínas capaces de enlazar la hormona marcada (246, 247). Estos procedimientos permiten además ensayar la presencia de RE y RPg en las muestras obtenidas mediante biopsia - por aspiración (210).

La utilización del 16α ^{125}I estradiol para el estudio del enlace entre Receptor y hormona (149) puede ser de enorme utilidad al permitir la realización simultánea de los ensayos RE y RPg (Progesterona marcada con ^3H) utilizando las técnicas de doble marcado (226) y mejorando la eficacia del test - al disponer de una molécula cuya actividad específica resulta más alta que la que es posible conseguir con el 17β E_2 - ^3H -- (229, 175).

1.8.1. El Receptor Nuclear

El status RE de la fracción citosólica de los tumores - mamarios está generalmente aceptado como uno de los discriminantes que pueden ser utilizados por el clínico a la hora de proponer una estrategia terapéutica determinada para sus enfermas (54). Además, la presencia o ausencia de RE puede ser utilizada para enjuiciar el pronóstico de la enfermedad (99, 136). Sin embargo la demostración de esta proteína en el citosol no representa, por sí sola, un índice de valor absoluto en la determinación de la hormonosensibilidad del tumor (139). Efectivamente, el complejo Hormona-Receptor puede "fallar" en las etapas de activación/translocación (226), o en

el enlace al sitio aceptor del DNA (202). La pérdida de la hormonodependencia tumoral puede ocurrir también en las etapas que siguen al nivel postranscripcional. Estas razones han inducido a estudiar otras moléculas relacionadas con la acción estrogénica como puede ser, por ejemplo, el receptor de progesterona (54) o el receptor nuclear (81, 127, 184). La primera descripción metodológica para el análisis del receptor nuclear fué efectuada por Anderson y col (3).

El procedimiento incluía la separación por centrifugación diferencial de los núcleos celulares y la incubación con $17\beta E_2-^3H$ a la temperatura de 30 °C para facilitar las reacciones de intercambio de las moléculas de estradiol enlazadas al receptor por moléculas marcadas. La extracción del receptor nuclear utilizando tampones con ClK 0,4 M (31) y la separación con carbón-dextrano (21) o protamina son otros procedimientos propuestos y, hoy día, parece claro que la medida de los receptores estrogénicos presentes en el núcleo celular, simultánea a la determinación de RE en el citosol, proporciona una información más fidedigna acerca de la hormonodependencia del tumor (43).

1.9. LA LOCALIZACION INTRACELULAR DEL RECEPTOR

El modelo original que describía el mecanismo de acción de los estrógenos fué introducido en la década de los 60 (78, 110, 208) y se encuentra, aún hoy día, ampliamente aceptado. Brevemente descrito el modelo supone que en ausencia de estradiol, el receptor se localiza en el citoplasma de las células "blanco" (78, 110, 208, 242, 243). Cuando la hormona entra en la célula se produce el enlace de ésta con el receptor y mediante un proceso dependiente de la temperatura, el complejo receptor-estrógeno pasa el núcleo donde se

inician los efectos dependientes y característicos de la acción hormonal. Gran número de experimentos son compatibles con el modelo "en dos etapas" como explicativo de los mecanismos de acción de los esteroides (19). Sin embargo ciertos trabajos realizados en los últimos diez años, ponen en duda la generalidad de este proceso y se ha demostrado que el receptor citoplasmático puede traslocarse al núcleo en ausencia de la hormona esteroidea (206,254).

Willians y Gorski (242,243) fueron los primeros en plantear la hipótesis de que la distribución intracelular de la proteína receptora podría ser estudiada en base a los principios cinéticos del equilibrio. Su análisis sugiere que el receptor existe en dos estados que exhiben propiedades distintas. Uno de ellos incluye aquellas proteínas receptoras que existen libres o están débilmente ligadas a componentes nucleares, de forma que pueden ser fácilmente extraídas con la fracción citosólica. El segundo estado contempla las proteínas RE que se encuentran fuertemente enlazadas con las estructuras nucleares o poseen la propiedad de poder asociarse en circunstancias particulares. En ausencia de estradiol es predominante el receptor distribuido de acuerdo con el primer estado, mientras que la formación del complejo Receptor-Hormona desplaza el equilibrio de la distribución hacia el estado segundo. Esta hipótesis, postula que ambas formas, el receptor libre y el receptor unido al estradiol, se encuentran en equilibrio, -de acuerdo con su coeficiente de reparto-, entre el citoplasma y el núcleo. En la regulación de este estado de equilibrio influye de manera fundamental la concentración de estrógenos (ligando) presente. Por otra parte, estudios realizados utilizando técnicas autoradiográficas (253) han permitido poner de manifiesto que tanto en ausencia de estradiol como en presencia de la hormona, a la temperatura de 0°C, existe un estado de equilibrio reversible para el complejo Receptor-Hormona distribuido entre el núcleo y el citoplasma de la célula blanco, de forma que la

cantidad de complejo existente en el núcleo es un simple reflejo de la magnitud del compartimento acuoso al que el RE tiene acceso por difusión. De acuerdo con esta hipótesis, la localización nuclear del receptor puede ocurrir en estado de no estimulación con independencia del enlace nuclear del RE a la cromatina. Si la hipótesis de Martin y Sheridan (253) es correcta la localización predominante del receptor estrogénico, tanto libre como enlazado al estrógeno, es nuclear. En ausencia de hormona no hay activación del receptor y en presencia de $17\beta E_2$, a la T de $0^\circ C$, la velocidad de transconformación o activación el complejo RE nuclear es baja, por ello el reparto de RE entre citoplasma y núcleo pueden modificarse cuando se altera el compartimento acuoso (por ejemplo durante el proceso de homogeneización). A la T de $37^\circ C$ el complejo RE está fuertemente asociado con el núcleo o posee la capacidad de enlazarse a la cromatina por inactivación de algún factor inhibitor (200). Esta teoría rompe con el modelo tradicional "dos etapas" para el mecanismo de acción de los esteroides, puesto que el hallazgo de RE en alta concentración en el citosol de los tejidos blanco puede ser un artefacto debido simplemente al procedimiento de obtención del citosol. La confirmación de esta hipótesis utilizando procedimientos bioquímicos para obtener fracciones subcelulares de alta pureza (239) o mediante el empleo de anticuerpos monoclonales frente a la estrofilina (137) ha cuestionado fuertemente el modelo de Jensen (110) para explicar los mecanismos de acción/respuesta de las hormonas estrogénicas sobre los tejidos blanco y ha abierto una interesante controversia científica (221).

1.0. OBJETIVOS

El trabajo experimental realizado por nosotros, ha estado presidido por los siguientes propósitos:

1.- El estudio de los aspectos metodológicos relacionados con la determinación de receptores estrogénicos y en particular el establecimiento de un control de calidad interno para el ensayo de RE en citosol con especial definición de:

- a.1.- La reproductibilidad de estas determinaciones analíticas.
- a.2.- Los coeficientes de variación intra e interensayo.
- a.3.- La termoestabilidad del receptor.

2.- Desarrollo y puesta a punto de un procedimiento alternativo para el ensayo RE utilizando células intactas, objetivo que incluye:

- b.1.- La obtención de una suspensión monocelular a partir de los tejidos "blanco".
- b.2.- La separación y purificación celular por centrifugación.
- b.3.- La estabilidad de la suspensión celular en lo que a concentración de receptores estrogénicos se refiere.
- b.4.- El estudio de la cinética de incorporación intracelular del receptor.
- b.5.- La fijación de las condiciones físico-químicas óptima para la realización del ensayo.

3.- La investigación de la especificidad del enlace Receptor-Estradiol en células intactas utilizando como competidores diversas moléculas esteroideas (estrogénicas o no) y antiestrogénos de síntesis.

4.- Aplicación de esta metodología en células intactas estudio de la hormonodependencia celular de cáncer de mama mano.

II. MATERIAL Y METODOS

II. MATERIAL Y METODOS

2.1. INSTRUMENTACION

2.1.1. Espectrómetro de centelleo líquido

Se ha utilizado un espectrómetro de centelleo líquido, marca Beckman, modelo LS2800, de Beckman Instruments Inc, Irvine, California, USA., con capacidad para 336 o 648 muestra que pueden ser analizadas automáticamente en tres canales - energéticos. El proceso de centelleo se fundamenta en la conversión de parte de la energía cinética de la partícula ionizante emitida por el trazador radiactivo en fotones luz, al quedar dicha radiación atenuada, o frenada, en ciertos materiales. Cuando se utiliza como material centelleador un compuesto orgánico (tolueno, benceno o dioxano por ejemplo) con disolvente de compuestos orgánicos especiales (solutos), el proceso se denomina centelleo líquido y a la disolución centelleadora líquido de centelleo o "fósforo". El material radiactivo, solubilizado en ese líquido, puede ser analizado en condiciones de máxima eficiencia.

Una solución para "centelleo líquido" consta, entonces de tres partes básicas: El disolvente, el soluto y la muestra. El proceso de centelleo resulta afecto por la naturaleza y las cantidades de cada una de esas partes. El átomo radiactivo, que puede ser la muestra o estar incorporado a una molécula más compleja, excita al desintegrarse a las moléculas del disolvente y la energía transferida en procesos de excitación puede llegar a las moléculas de soluto y si la elección de este compuesto es adecuada, la transferencia: Energía de excitación del disolvente → Energía de excitación del soluto puede ser cuantitativa. Los solutos se eligen de forma tal que el rendimiento de este proceso de transferencia de energía sea elevado y que su decaimiento energético a nivel basal ocurra por fluorescencia predominantemente (rendimiento $\approx 90\%$) con

emisión de fotones-luz cuya longitud de onda sea eficientemente medida por tubos fotomultiplicadores comerciales.

El soluto primario usualmente constituye el 1% w/v respecto al disolvente y en algunos casos un segundo soluto se adiciona a la mezcla centelleadora si se desea desplazar la longitud de onda de la emisión fluorescente a rangos que sea más eficazmente cuantificados por el fotomultiplicador. Los fotones son emitidos isotópicamente por el centelleador y utilizando unos reflectores ópticos apropiados se dirigen la mitad de los fotones luz emitidos a cada uno de los dos tubos fotomultiplicadores que "ven" la muestra. Cuando suficiente número de fotones inciden sobre el fotomultiplicador, se genera un impulso eléctrico de voltaje proporcional al número de fotones luz detectados.

El rendimiento de estos procesos puede ser reducido por diferentes mecanismos que se denominan genéricamente "quenching" o extinción y que, para su corrección, es necesario acudir a procedimientos experimentales, que exigen determinados cálculos matemáticos capaces de relacionar el "quenching" con la eficiencia del contaje.

El equipo utilizado por nosotros corrige, de manera automática, la extinción de la muestra haciendo uso del procedimiento de relación de canales externos y utilizando ^{137}Cs como fuente radiactiva externa.

Todas las determinaciones de radiactividad en la muestra han sido efectuadas preseleccionando un tiempo de contaje mínimo (10 minutos) o acumulando un número de cuentas suficiente como para que el error estadístico del contaje fuese menor del 1% y sustrayendo de la velocidad de recuento experimental (cpm) el valor numérico estimado para la radiación de fondo.

2.1.2. Ultracentrífuga

Hemos utilizado una ultracentrífuga preparativa Beckman modelo L8-70, suministrada por Beckman Instruments Inc., Palo Alto, California, USA, dotada con un microprocesador para controlar y prefijar las condiciones en las que las experiencias se llevan a cabo.

Características del equipo utilizado son las siguientes

Rango de velocidad : 10.000 - 70.000 RPM

Rango de temperatura: 0° - 45 °C

Control de Temperatura : ± 1 °C

Rango de tiempo : 0 a 100 horas

Integrador $\omega^2 t$: 0 a $9,99 \cdot 10^{14}$ rad² x S

Operación : Manual, automática o programada

Sistema de vacío: bomba de vacío más difusora

Rotor empleado : Modelo 70 Ti (titanio)

Valor G a máxima velocidad = $504.000 \times g$ a r_{\max}
= $361.000 \times g$ a r_{med}
= $217.000 \times g$ a $r_{\text{núm}}$

Dimensiones de los tubos : 25 x 89 mm

Capacidad máxima = 38,5 ml

Capacidad total = 308 ml

Nº de tubos = 8

Peso del rotor = 9 Kg

Condiciones de las experiencias de ultracentrifugación

Velocidad = 33.000 RPM

Valor G = 100.000 (r_{\max})

Temperatura = 4 °C

Tiempo = 1 hora

Tubos empleados : Polialomero, Beckman ref : 326814

2.1.3. Espectrofotómetro

Se ha empleado un espectrofotómetro ultravioleta/visible Beckman, modelo 34C de Beckman Instruments Inc., Irvine USA, dotado de doble haz, con fuente capaz de operar entre 190 y 700 nm. Como accesorios, el aparato dispone de un registro gráfico e impresora digital y de una bomba peristáltica para introducir automáticamente las muestras en la cubeta de flujo.

En la mayor parte de las experiencias realizadas se han utilizado cubetas estándar de vidrio (para determinación de la densidad óptica en la zona del visible) de un centímetro de paso de luz, o de cuarzo (medidas de absorbencia en UV) de las mismas dimensiones. Cuando el volumen de muestra a analizar era muy escaso hemos empleado microcubetas de cuarzo.

2.1.4. Centrífuga Refrigerada

Hemos utilizado una centrífuga convencional, marca Beckman, modelo TJ-6, dotada con una unidad adicional de refrigeración que permite centrifugar muestras a baja temperatura. La centrífuga utiliza un rotor, con soportes intercambiables que permite la centrifugación simultánea de un número de muestras variable comprendido entre 4 y 120.

2.1.5. Centrífuga

Para separar por centrifugación componentes de muestra que no sufren alteración a temperatura ambiente, se ha empleado una centrífuga marca Kokusan, con capacidad máxima de 108 tubos de 1,2 cm de diámetro, capaz de alcanzar la velocidad de 3.000 rpm.

2.1.6. Cámara frigorífica

Para el almacenamiento de reactivos y tampones, así como para la realización de experiencias a baja temperatura hemos utilizado una cámara instalada por Pedro y López cuya temperatura está regulada a 4 ± 1 °C.

2.1.7. Congeladores

Para el almacenamiento de muestras se ha utilizado un arcón congelador marca selecta, modelo 455 capaz de alcanzar la temperatura de -80 °C. La temperatura de operación durante todo el tiempo en el que este trabajo ha sido realizado ha sido de -70 °C.

2.1.8. pH metro

Para la regulación del pH de los medios de cultivo celular o de los tampones empleados hemos utilizado un Phmetro ministrado por la firma Orion Research, modelo 501 cuya precisión se estima en 0,01 unidades de pH.

2.1.9. Homogeneizador

Para la obtención de la fracción citosólica hemos utilizado un homogeneizador Braum cuya velocidad de rotación es posible regular entre 150 y 1.500 r.p.m.

2.1.10. Otro material

Hemos utilizado micropipetas Schwarz/Man con capacidad entre 10 l y 1ml, pipetas automáticas Nichiryo modelo 2.100 DC con capacidad variable entre 1 y 10 ml, dosificadores para líquido de centelleo con volumen regulable entre 1 y 10ml pipetas contrastadas de vidrio JENA, erlenmeyer, vasos de precipitado, matraces contrastados y otros materiales fungibles. Así mismo, a lo largo de este trabajo ha sido necesario utilizar agitadores Mixo-Tub, agitadores magnéticos, baños termostatzados con agitación, balanzas de precisión, etc, equipos y materiales todos ellos, propios de un laboratorio de investigación.

2.2. REACTIVOS

2.2.1. Hormonas Radiactivas

Hemos utilizado como hormona radiactiva estrogénica el [2,4,6,7-³H] 17 β -Estradiol, suministrado por la casa Amer--sham International PLC, Inglaterra, con actividad específica comprendida entre 85 y 110 Ci/mmol según la preparación y cuya concentración radiactiva era de 1 mCi/ml. La pureza radio

química del trazador se estima siempre superior al 97% y para minimizar la descomposición, las soluciones stock, se almacenaron siempre a la temperatura de -20°C . En estas condiciones, los datos del fabricante, refieren una descomposición inferior al 1% por mes de almacenamiento. Ningún ensayo se realizó utilizando un vial que estuviese almacenado un tiempo superior a 3 meses.

Como producto radiactivo para analizar el contenido en receptores de progesterona hemos empleado la $[17\alpha\text{Metil-}^3\text{H}]$ -Promegestone, suministrada por New England Nuclear, Boston, Mass. USA, con actividad específica de 77 a 101 Ci/mmol y 1 mCi/ml, cuya pureza radioquímica determinada por procedimientos cromatográficos resulta mayor que el 99%. La estabilidad de la preparación es suficientemente buena en ausencia de luz y a la temperatura de -20°C (velocidad de descomposición en esas condiciones 1,5% por mes). No se utilizó para ningún ensayo una solución radiactiva que hubiese estado almacenada un periodo de tiempo superior a 3 meses.

2.2.2. Hormonas no Radiactivas

Como productos hormonales utilizados como competidores o en experiencias de inhibición del enlace R-E, se han empleado las siguientes sustancias:

17β Estradiol, Sigma, Ref : E-8875
Diethylstilbestrol, Sigma, Ref : D-4628
 17α Estradiol, Sigma, Ref : E-8750
Estrona, Sigma, Ref : E-9750
Testosterona, Sigma, Ref : T-1500
Androstanodiona, Sigma, Ref : A-8255
 5α Dihidrotestosterona, Sigma, Ref : A-8380

Pregnanolona, Sigma, Ref P : 7879
Progesterona, Sigma, Ref P : 0130
Corticosterona, Sigma, Ref : C-2505

2.2.3. Medios de Cultivo Celular

Se ha utilizado Mínimo Medio Esencial EAGLE (MEN) con sales de Earle, con glutamina y sin bicarbonato sódico, suministrado por Flow como polvo en cantidad suficiente para preparar 1 litro. Para lavar las células y eliminar moléculas inactivas no enlazadas, hemos empleado medio HANK'S (sin calcio ni magnesio) preparado de acuerdo con las siguientes especificaciones:

ClNa	8 g/l
ClK	0,4 g/l
PO ₄ HNa ₂ .2H ₂ O	60 mg/l
PO ₄ H ₂ K	60 mg/l
Glucosa	1 g/l
CO ₃ HNa	0,35 g/l

Se utilizaron reactivos Merck, grado Análisis, y el pH del medio se reguló a 7,4.

2.2.4. Soluciones Tampón

Para la homogeneización tisular y la obtención del citosol hemos empleado como disolución tampón la constituida por:

Tris-hidroximetil-amino-metano : 10mM
Acido etilen-diamin-tetraacético : 1,5mM
Monotioglicerol : 10mM

El pH se reguló, utilizando ClH 0,1N, a 7,4. Todos --
los reactivos, grado Análisis, fueron suministrados por --
Merck, salvo el monotioglicerol que se adquirió a Sigma.

2.2.5. Enzimas

Para la obtención de la suspensión celular a partir -
de los tejidos blanco de la acción estrogénica (útero del -
conejo o ratas y tejido tumoral mamario) han sido utilizada
una disolución enzimática constituida por: Colagenasa, Tipo
I, de Sigma al 0,2% y deoxiribonucleasa I, de Sigma, al - -
0,02% en MEN.

2.2.6. Cócktel de Centelleo

En la medida de la radiactividad de la hormona incor-
porada, específica o inespecíficamente, a los materiales -
biológicos empleados, se ha utilizado como mezcla centellea
dora Normascint-22 suministrada por los laboratorios Schar-
lau, España y que está constituida PPO (4g/l), POPOP (0,5 -
g/l) Triton X-100 (100 ml) y Tolmeno hasta completar 1 li-
tro. Cuando la cantidad de agua incorporada al vial, supera
ba la capacidad de disolución del cócktel, se adicionó eta-
nol absoluto en la proporción del 10% v/v.

2.2.7. Material Biológico

Se ha utilizado útero de ratas inmaduras Spragne-Daw-
ley de 20-25 días de edad, útero de conejas inmaduras de -
aproximadamente 1 a 2 meses de edad y útero de ternera como

material biológico hormono-dependiente, riñón de conejo como fuente de material hormono-independiente y tejido tumoral maligno mamario.

2.3. MÉTODOS

2.3.1. Obtención del Citosol

El material biológico utilizado como modelo de tejido hormono-dependiente se obtuvo por escisión quirúrgica, tras el sacrificio por dislocación cervical de los animales (ratas o conejos) o por descarga eléctrica (ternera).

Los úteros obtenidos se limpiaron de tejido graso y se lavaron con TRIS-ClH para eliminar restos de sangre y se congelaron con N₂ líquido, pulverizándose con posterioridad utilizando un sistema de percusión construido en acero inoxidable. El polvo resultante se suspende en un volumen 3-4 veces superior a su peso de tampón TRIS-ClH previamente refrigerado. La mezcla resultante se homogeniza en Potter Vidrio-teflón utilizando un baño de hielo para evitar el sobrecalentamiento de la muestra y regulando la velocidad del homogeneizador a 300 r.p.m. La operación se realiza en 10 periodos de, aproximadamente, 5 segundos cada uno, separados por un intervalo de 30 segundos.

Para separar membranas, organelas y núcleos de la fracción soluble citoplasmática o citosólica, la muestra se somete a ultracentrifugación (1.000.000 g, 4°C, 1 hora) y el sobrenadante constituye el citosol.

2.3.2. Obtención de la Suspensión Celular

El tejido obtenido tras cirugía y limpio de grasa y sangre es finalmente cortado sobre una placa Petri de plástico utilizando dos hojas de bisturí, en pequeños fragmentos rectangulares de aproximadamente 1 mm de lado. Los fragmentos así obtenidos se transfieren a un matraz de 25 ml de capacidad donde se someten a la acción de una disolución enzimática (colagenasa al 0,2% y DNAasa al 0,02% en MEN) utilizando un volumen de 5 ml por gramo de tejido. Para favorecer la acción enzimática, el matraz se sumerge en un baño termostático a 37 °C y se mantiene en constante agitación (120 ciclos/min.) durante 2 horas. Este procedimiento es, con ligeras modificaciones, el descrito por Müller (). Terminado el proceso de incubación, la suspensión resultante se pipetea, repetidas veces, utilizando una pipeta automática de 1 ml de capacidad, con puntas de plástico empleando inicialmente unas puntas cortadas para aumentar el calibre del orificio de entrada y salida del líquido. La disminución progresiva de este calibre y la fricción ocasionada por el movimiento turbulento del fluido facilita la liberación de células, de forma que al final del proceso, la mayor parte de las mismas se encuentran aisladas en la disolución. Para eliminar los fragmentos tisulares no disgregados por las enzimas, la suspensión se filtra a través de una malla de nylon de 100 mesh. si el rendimiento de obtención celular ha sido escaso y quedan trozos de tejido retenidos en la malla el proceso puede repetirse una segunda vez. Hemos eliminado de la metodología el empleo de agujas de inyección de calibre decreciente al comprobar que ese procedimiento de digestión mecánica, se acompañaba de una importante disminución del número de células viables.

Para eliminar los enzimas del medio, la suspensión final se trasvasa a un tubo de fondo cónico de 120x10 mm y se

someten a centrifugación durante 10 minutos a 600 g. El pellet celular resultante se suspende en MEN libre de enzimas y la preparación queda lista para su empleo tras ajustar el volumen de MEN a la concentración celular deseada.

La viabilidad celular se determina utilizando el test de exclusión del colorante Tripan Blue (0,1% en solución salina isotónica) (244). Parámetros como la velocidad de agitación del baño tienen importancia crítica sobre el rendimiento y la viabilidad de las células obtenidas (72).

Utilizando un microscopio y una cámara de Neubauer se calcula el número de células y se ajusta la concentración a valores comprendidos entre 100.000 y 1.000.000 elementos/ml según las necesidades requeridas por cada experiencia.

2.3.3. Separación de Células

Para eliminar células muertas o células distintas de las del útero (hematíes por ejemplo) se ha utilizado el procedimiento de separación por centrifugación en gradiente de Percoll (83), utilizando un gradiente discontinuo establecido, en orden de densidad creciente, de la siguiente forma: 60% y 20%. Estas disoluciones se obtenían por dilución de 90 ml de Percoll (Pharmacia Fine Chemicals) con 10 ml de Hank's a 10 veces su concentración óptima. A esta disolución se le denomina 100% (83). La osmolaridad de la disolución stock resultante se sitúa en torno a 280-320 mOs/Kg H₂O. Las distintas concentraciones de percoll necesarias, pueden ser preparadas por dilución a partir del stock, utilizando HANK'S isotónico. Después de la centrifugación (800 x g durante 30 minutos) pueden observarse tres bandas celulares situadas en la cabeza del tubo (células no viables y detritus), en la interfase 20-60 (constituida mayoritariamente por células viables aisladas) y

en el fondo del tubo (donde se depositan predominantemente los hematies).

Utilizando una pipeta Pasteur se recoge por succión la capa de células intactas que se lavan, para eliminar los restos de Percol con 10 ml de Hank's isotónico por cada mililitro de la fracción celular colectada. Por último tras recuento y examen de viabilidad celular se ajusta la concentración de elementos a la cantidad requerida para llevar a cabo la experiencia, utilizando MEN.

2.3.4. Análisis de Proteínas

Para el análisis de la concentración de proteínas en citosol hemos empleado el procedimiento de Bradford (16) que está basado en el cambio de color de un colorante (azul Coomassie Brillante) en respuesta a diferentes concentraciones de proteína. En presencia de proteínas el colorante, en solución ácida, desplaza su máximo de absorción desde 465 nm a 595 nm, debido al enlace que se establece entre éste y las moléculas proteicas.

Los reactivos necesarios para la realización del ensayo han sido suministrados por Bio-Rad y son los siguientes:

a) Disolución concentrada de colorante: Contiene cantidad suficiente para la realización de 450 ensayos y el Azul Coomassie Brillante se encuentra disuelto en una mezcla de ácido fosfórico y metanol.

b) Standard de Proteínas: Vial conteniendo albúmina bovina liofilizada. El procedimiento analítico incluye la dilución

del colorante (1 volumen de colorante 4 volúmenes de agua destilada), la reconstitución del standard de concentración protéica conocida en 20 ml de agua destilada para obtener una concentración final de 1,4 mg/ml, que por diluciones sucesivas permite obtener los puntos de la curva de calibración (200-1.400 ng/ml) y la mezcla de 0,1 ml de cada uno de los standard y de los problemas, por duplicado, en tubos de vidrio, con 5 ml de colorante diluido. Después de agitar suavemente para obtener una mezcla homogénea se deja incubar durante un periodo de tiempo comprendido entre 5 minutos y 1 hora y se lee la densidad óptica, a 595 nm, de las muestras frente al blanco (concentración protéica = 0). La representación de la recta patrón (D.O. frente a concentración de proteínas) y la interpolación, en la misma de los datos de D.O. obtenidos para los problemas permite deducir la concentración de proteínas en estos últimos.

2.3.5. Análisis de DNA

El procedimiento para el análisis cuantitativo del ácido deoxirribonucléico se basa en la relación entre el DNA y la difenilamina en una mezcla de ácido acético y sulfúrico a temperatura controlada (20 °C). La metodología incluye la extracción con ácido perclórico del DNA nuclear a 70 °C durante 20 minutos. El sobrenadante obtenido tras centrifugación (3000 r.p.m., 10 min) contiene el ácido deoxirribonucléico solubilizado.

El reactivo de coloración es una disolución de difenilamina (1,5 g/100 ml) en ácido acético glacial (98 ml), ácido sulfúrico concentrado (1,5 ml) y 0,5 ml de acetaldehído de concentración 16 mg/ml.

Las concentraciones de DNA en las muestras problema se deducen por comparación con una recta de calibración obtenida utilizando concentraciones conocidas de DNA procedente de timo de vaca (sigma, ref D-1501). La reacción entre reactivo de Burton y standard o problemas en solución de ClO_4H 0,5 N se lleva a cabo en tubos de cristal, a la temperatura de 30 °C durante 20 horas y la densidad óptica se determina, en comparación con el blanco (concentración de DNA cero), a la longitud de onda de 600 nm.

2.3.6. Ensayo de Receptores Estrogénicos

2.3.6.1. Receptores de Estrógenos en Citosol

A partir de una solución de $17\beta\text{E}_2\text{-}^3\text{H}$ de actividad específica aproximadamente igual a 100 Ci/mMol, se constituye por dilución en tampón Tris-ClH, una serie de patrones de concentración conocida. Las concentraciones finales utilizadas en las experiencias realizadas en nuestro trabajo han sido las siguientes: $2 \cdot 10^{-9}\text{M}$, 10^{-9}M , $8 \cdot 10^{-10}\text{M}$, $5 \cdot 10^{-10}\text{M}$ y $3 \cdot 10^{-10}\text{M}$.

La cuantificación de la radiactividad existente en una alícuota de cada una de esas diluciones permite conocer el dato de la Actividad Total puesta en cada uno de los puntos del ensayo.

La cantidad de radiactividad enlazada al receptor se evalúa tras incubar una fracción constante de citosol (0,1ml) con 0,1 ml de cada uno de los puntos de concentración conocida. Para conocer la cantidad enlazada específicamente al receptor el ensayo incluye una serie paralela en la que la rea

ción Hormona-Receptor se lleva a cabo en presencia de compo-
dor, $17\beta E_2$ o DES no radiactivo, en concentración al menos
200 veces superior a la que alcanza la hormona radiactiva.
cuantificación de la cantidad total de hormona enlazada y d
la cantidad de hormona ligada inespecíficamente, permite ded
cir por sustracción, la magnitud del enlace específico.

La reacción se realiza a temperatura controlada (gene-
ralmente $4^{\circ}C$) y durante un tiempo también prefijado (genera-
mente 20 horas) y la separación entre fracción libre y liga-
al receptor se consigue por absorción de la hormona no enla-
da utilizando carbón activo recubierto con Dextrano (300 ml
de DCC por tubo). Por último, 300 μ l del sobrenadante obten-
do por centrifugación se mezclan con 4,2 ml de mezcla cente-
lleadora y el vial se somete a contaje en el espectómetro d
centelleo líquido. Todas las experiencias se realizan, al me-
nos, por duplicado.

2.3.6.2. Tratamiento de Datos

Desde un punto de vista conceptual los mecanismos de
control a nivel celular pueden ser divididos en tres grande
grupos (146).

a) Control genético: supone la regulación de la expresió
de los genes.

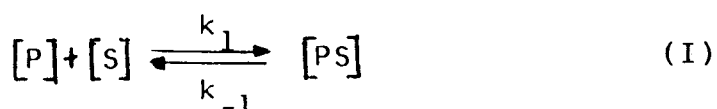
b) Control hormonal: Determina la iniciación o inhibició
de los procesos metabólicos.

c) Control alostérico de los enzimas reguladores.

Estos tres tipos de mecanismos de control tienen en c
mún a nivel molecular una propiedad básica. En todos ellos

interacción de un ligando con un receptor específico desencadena cierto acontecimiento bioquímico. De ello es fácil deducir que gran número de interesantes nociones básicas en investigación biomédica surgen del estudio del proceso de enlace entre ligandos (usualmente una molécula pequeña) y macromoléculas de interés biológico. Está generalmente aceptado que los cambios conformacionales inducidos por estas interacciones ligando-receptor son transmitidos específicamente a la macromolécula o a la subunidad molecular que es responsable de la función bioquímica. Muchas macromoléculas (proteínas, por ejemplo) son oligómeras y están constituidas por dos o más cadenas polipeptídicas separadas (protómeros). El modo característico mediante el cual las cadenas individuales polipeptídicas encajan unas con otras en la conformación nativa de una proteína constituye su estructura cuaternaria. El término protómero se refiere a la cadena polipeptídica individual; el término subunidad se emplea frecuentemente para definir una porción funcional de la proteína.

En el equilibrio el proceso de enlace entre el ligando y la proteína puede ser representado en la forma siguiente:



la velocidad de formación del complejo $[PS]$ viene dada por:

$$v_1 = k_1 [P] \times [S] \quad (II)$$

donde k_1 es la constante de velocidad de formación del complejo.

Por otra parte la velocidad de disociación puede expresarse por:

$$v_2 = k_{-1} [PS] \quad (III)$$

donde k_{-1} es la constante de velocidad de disociación del complejo $[PS]$.

En el equilibrio $v_1 = v_2$, de donde:

$$k_1 [P] [S] = k_{-1} [PS]$$

$$K = \frac{k_1}{k_{-1}} = \frac{[PS]}{[P] [S]} \quad (IV)$$

siendo K la constante de equilibrio del proceso.

Si llamamos \bar{Y} a la fracción de proteína saturada por el ligando S ; (es decir, \bar{Y} es la fracción respecto al número total de sitios de enlace para S que están ocupados por el ligando), $1 - \bar{Y}$ será la fracción de lugares no ocupados. De acuerdo con la definición anterior, \bar{Y} será igual a:

$$\bar{Y} = \frac{[PS]}{[PS] + [P]} \quad (V)$$

y combinando esta expresión con la ecuación del equilibrio, (IV), resulta:

$$\bar{Y} ([P] + [PS]) = [PS]$$

$$[PS] = \frac{\bar{Y} [P]}{(1 - \bar{Y})}$$

$$K [P] [S] = \frac{\bar{Y} [P]}{(1 - \bar{Y})} \quad (VI)$$

simplificando y despejando \bar{Y} , obtenemos:

$$\bar{Y} = \frac{K [S]}{1 + K [S]} \quad (VII)$$

Esta última ecuación corresponde a la expresión matemática de una hipérbola rectangular y la representación gráfica:

de la saturación fraccional de la proteína frente a la concentración de ligando es, por tanto, una hipérbola. La ecuación VII es análoga a la de Michaelis-Menten para la cinética de las reacciones catalizadas enzimáticamente y define las relaciones cuantitativas que existen entre la fracción saturada de la macromolécula y la concentración del ligando. Es posible, a partir de ella, deducir una relación numérica importante cuando la fracción de saturación corresponde exactamente al 50% de la capacidad de enlace total de la macromolécula. Para esta especial situación se tiene:

$$\frac{1}{2} = \frac{K [S]}{1 + K [S]}; \quad 1 + K [S] = 2 K [S]$$

$$K [S] = 1; \quad K = \frac{1}{[S]} \quad (\text{para } \bar{Y} = \frac{1}{2} Y_{\text{max}}) \quad (\text{VIII})$$

y por tanto podemos llegar a la conclusión de que la constante de equilibrio del complejo proteína-ligando es igual a la inversa de aquella concentración de ligando para la cual la fracción de saturación de la proteína es la mitad de su valor máximo.

Transformaciones de la ecuación hiperbólica: La ecuación hiperbólica, tipo Michaelis-Menten, puede ser transformada algebráicamente en otras formas, que son más útiles para extraer la información que una serie de datos experimentales contiene. Una de las transformaciones más habitualmente utilizadas se obtiene sencillamente tomando los recíprocos de ambos miembros de la ecuación VII.

Ecuación de Lineweaver-Burk (147): Resulta más fácil para la comprensión de las manipulaciones algebráicas que guen, cambiar la notación de las ecuaciones anteriores basándose en la utilización de los conceptos de ligando enlazado (B) y ligando libre (F). Las equivalencias entre esta nomenclatura y la anteriormente utilizada son inmediatas: así \bar{Y} o fracción de macromolécula saturada por el ligando fué definido como:

$$\gamma = \frac{[ps]}{[P]+[PS]}$$

Expresión que es equivalente a:

$$\gamma = \frac{B}{B_{Máx}}$$

donde B es evidentemente igual a [PS], es decir cantidad de gando enlazada y $B_{Máx}$ equivale al valor máximo de ligando que puede ser enlazado por la macromolécula ($B_{Máx} = [P]+[PS]$). Por otra parte resulta inmediata la igualdad entre cantidad de ligando libre (F) y la denominación utilizada para este concepto en la ecuación VII: (S). De ello podemos escribir:

$$\frac{B}{B_{Máx}} = \frac{K F}{1 + K F} \quad (IX)$$

y operando

$$\frac{1}{B} = \frac{1}{B_{Máx}} \cdot \frac{1}{K \cdot F} + \frac{1}{B_{Máx}} \quad (X)$$

o bien
$$\frac{1}{B} = \frac{Kd}{B_{Máx}} \cdot \frac{1}{F} + \frac{1}{B_{Máx}} \quad (XI)$$

donde
$$Kd = \frac{1}{K}$$

Si representamos en ordenadas los valores recíprocos de cantidad enlazada frente al recíproco de ligando libre en abcisa: obtenemos una línea recta cuya intersección en el eje de ordenadas es el valor inverso de la cantidad máxima de ligando enlazado, mientras que la intersección sobre el eje de abcisa ofrece el valor absoluto de la constante de asociación del complejo. Esta forma de tratar los datos experimentales, llamada también representación doblemente recíproca, tiene la ventaja de que es posible determinar con más exactitud el valor de $B_{Máx}$ puesto que en la representación de Michaelis-Menten (B frente a F) la aproximación al valor de $B_{Máx}$ se alcanza asípticamente y su valor, por ello, es incierto.

Ecuación de Hill (46): La ecuación de Hill puede ser obtenida operando a partir de la expresión (VI) en la siguiente forma:

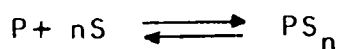
$$K [P] [S] = \frac{\bar{Y} [P]}{(1 - \bar{Y})} \quad \text{(VI) simplificando}$$

$$\frac{\bar{Y}}{1 - \bar{Y}} = K [S] \quad \text{(XI) y tomando logaritmos}$$

$$\log \frac{\bar{Y}}{(1 - \bar{Y})} = \log K + \log [S] \quad \text{(XII)}$$

La representación gráfica del $\log \frac{\bar{Y}}{(1 - \bar{Y})}$ frente al logaritmo la concentración de [S] en abcisas corresponde a una línea recta.

Desde un punto de vista más general, consideramos que son n las moléculas de ligando S que se enlazan por macromolécula, la condición de equilibrio de la reacción permite decir las siguientes expresiones:



$$K = \frac{[PS_n]}{[P] [S]^n}$$

$$\bar{Y} = \frac{[PS_n]}{[P] + [PS_n]}$$

} combinando estas dos ecuaciones

$$\bar{Y} = \frac{K [S]^n}{1 + K [S]^n} \quad \text{(XIII)}$$

operando

$$\frac{\bar{Y}}{1 - \bar{Y}} = K [S]^n \quad \text{(XIV)}$$

tomando logaritmos

$$\log \frac{\bar{Y}}{1 - \bar{Y}} = \log K + n \log [S] \quad \text{(XV)}$$

Esta última ecuación en la que se representa gráficamente el $\log \bar{Y}/1-\bar{Y}$ frente al $\log [S]$ es denominada ecuación de Hill. La pendiente de la representación gráfica ofrece el valor de n (número de Hill), que desde el punto de vista teórico, debe corresponder con el número de moléculas de ligando que se enlazan específicamente a la macromolécula, mientras que la extrapolación para valor de $[S] = 1$ permite deducir el valor de la constante de equilibrio del proceso cinético de enlace (fig. 3).

La representación de Scatchard (203): La transformación de Scatchard puede ser deducida a partir de la ecuación (XI):

$$\frac{\bar{Y}}{1-\bar{Y}} = K S \quad (\text{XI})$$

operando

$$\frac{\bar{Y}}{S} = K (1-\bar{Y}) \quad (\text{XVI})$$

y la representación gráfica de la ocupación fraccional de sitios de enlace (\bar{Y}) dividida por la concentración de ligando libre (S), frente al valor de la fracción (\bar{Y}), da una línea recta cuya pendiente es igual a $-K$, mientras que la ordenada en el origen, es, directamente, el valor de la constante de equilibrio.

Utilizando la notación de ligando libre (F) y ligando enlazado (B), anteriormente explicada podemos escribir:

$$\bar{Y} = \frac{B}{B_{\text{máx}}} \quad ; \quad \frac{B}{B_{\text{máx}}} = K \left(1 - \frac{B}{B_{\text{máx}}} \right)$$

$$\frac{B}{F} = K \cdot B_{\text{máx}} - B \cdot K \quad (\text{XVII})$$

La representación de B/F frente a B se denomina representación de Scatchard y constituye uno de los métodos gráficos más comunmente utilizados en el análisis de los datos experimentales de enlace macromolécula -ligando. Esta representación ofrece, para cierto intervalo de concentraciones de -ligando, una línea recta de pendiente $-K$ y cuya intersección con el eje de abscisas proporciona el valor de $B_{\text{máx}}$ o número de sitios de unión.

2.3.6.3. Análisis Saturante Simple

Una de las limitaciones que el ensayo de receptores de estrógenos impone a su aplicación en oncología clínica es la necesidad de utilizar una cantidad medible de tejido tumoral. Este hecho obliga, en ciertas condiciones experimentales, o en presencia de piezas tumorales de escasa cuantía, a la modificación del método de análisis convencional y a su sustitución por el denominado "Análisis saturante simple" (58).

Los fundamentos teóricos de este test para pequeñas muestras surgen del análisis de los datos de enlace específico de un ligando a una macromolécula determinada (apartado 2.3.6.2). En efecto, debido al hecho de que en este tipo de reacciones, a semejanza de lo que ocurre en las reacciones catalizadas enzimáticamente puede ponerse de manifiesto el fenómeno de saturación por el sustrato, disponemos de la posibilidad de extraer información útil, contando exclusivamente con la determinación experimental de la cantidad de estrógeno enlazada a las proteínas citoplasmáticas cuando el nivel de concentración de estrógeno en el medio supera el valor de la concentración saturante. El análisis de la figura 1, pone de manifiesto que a partir de cierto valor de la con

centración de ligando la cantidad de éste enlazada a la proteína receptora alcanza un valor máximo que resulta ser independiente de la concentración final de estrógeno existente en el medio. En estas condiciones experimentales de cantidad de estrógeno ligada está limitada exclusivamente por la concentración de proteína receptora presente en el ensayo. Es por otra parte evidente que este tipo de ensayo no aporta información alguna acerca de la constante de asociación (K_a) del proceso de acoplamiento, así como tampoco es posible demostrar experimentalmente la presencia de heterogeneidad de sitio de unión, situación realmente frecuente al existir en el citosol una segunda molécula protéica receptora de estrógenos con menos afinidad por el ligando pero con capacidad de enlace importante (183,185,220). Las limitaciones anteriores suponen sin duda fuentes potenciales de error; a pesar de ello, el procedimiento es a menudo utilizado para análisis rutinarios de receptores de estrógenos en ciertos centros (47). Nosotros hemos empleado este procedimiento analítico en algunas experiencias de termolabilidad del receptor citosólico o de cinética de incorporación de $17\beta E_2-^3H$ al interior de células uterinas. En estos casos, la mayor parte de los inconvenientes metodológicos desaparecen y la información que ofrece el análisis resulta válida.

Brevemente descrito el procedimiento consiste en la incubación durante cierto tiempo de una alícuota de citosol con $17 E_2-^3H$ en concentración de $2 \cdot 10^{-9}$ M y la separación de la fracción ligada respecto a la libre, utilizando DCC. En el caso de células intactas, la suspensión celular se incubó en presencia de $17\beta E_2-^3H$ y la separación se realiza por centrifugación. Experiencias paralelas que incluyen, en el medio de reacción, la presencia de $17\beta E_2$ frío, permiten valorar los enlaces no específicos.

2.3.6.4. Estudios de Especificidad del Enlace

La especificidad del enlace receptor-estrógeno permite a una determinada célula blanco desarrollar una acción en respuesta a una señal hormonal sin interferencia de otras señales (205). Así, hormonas de la misma clase, sus agonistas y sus antagonistas pueden competir eficazmente por enlazarse al receptor, mientras que no deben afectar a otros sistemas receptores. La estereoquímica de la molécula hormonal y la geometría del sitio de unión en el receptor son características fundamentales que determinan la especificidad del sitio de enlace. El principio de competencia entre la hormona marcada y otra sustancia de estructura estérica similar ($17\beta E_2$ o DES), se aplica para determinar la magnitud de los enlaces específicos saturables por la hormona. Por otra parte, esteroides no estrogénicos presentes en el medio no deben competir (o hacerlo débilmente) con los estrógenos por unirse al lugar específico de enlace en la macromolécula, debido a que la estructura molecular de estas sustancias posee ciertas diferencias estéricas respecto a los estrógenos.

Desde el punto de vista teórico, la inhibición, si la hay, puede derivar de mecanismos competitivos, por un lado, o de mecanismos no competitivos. Los inhibidores que actúan de manera competitiva se combinan con el receptor de tal manera que el ligando no puede enlazarse; esto es, ligando e inhibidor compiten por el mismo locus de unión. La naturaleza mutuamente excluyente del enlace entre ligando e inhibidor en el sistema, puede ponerse de manifiesto a través del análisis que proporciona la transformación doble recíproca. Así, cuando se estudia un conjunto de datos de enlace RE_2 , obtenidos en presencia y ausencia del inhibidor, la transformación doble recíproca muestra que el número de sitios de unión permanece constante de manera que para saturarlos por

$17\beta E_2-^3H$ en su totalidad en presencia de competidor, es necesario utilizar concentraciones de ligando más elevadas. De esta forma, la presencia del inhibidor modifica la pendiente de la transformación de lineweaver-Bruk y cambia el valor de la constante aparente de disociación.

La inhibición no competitiva puede ocurrir por varias razones: El inhibidor puede en primer lugar precipitar o desnaturalizar el sitio de unión del receptor o bien enlazarse a un segundo sitio del receptor y, como consecuencia de ello, alterar el locus de unión específico para el estrógeno. En este caso, el número de sitios de enlace disminuye mientras que la constante de asociación no se modifica.

Utilizando como modelo biológico células intactas del útero, hemos sometido a estudio los mecanismos de inhibición del enlace receptor-estrógeno, en presencia de distintas hormonas esteroideas, estrogénicas o no y de los antiestrógenos moxifeno e hidroxitamoxifeno. El método utilizado es el mismo que se describe en el apartado siguiente y la concentración de la sustancia competidora fue entre 200-500 veces superior a la del $17\beta E_2-^3H$.

2.3.6.5. Análisis de Receptores Estrógenicos sobre Células Intactas.

La preparación de suspensiones monocelulares a partir del útero de rata y su caracterización bioquímica fue descrita en 1973 por Willians y Gorski (144) y la utilización de este sistema como modelo experimental, permitió establecer la equivalencia existente entre los lugares de enlace específicos para el estradiol, tanto en el extracto uterino (úteros intactos incubados en presencia de estradiol) como en células uterinas aisladas. El empleo de úteros intactos como modelo de tejido

blanco de la acción de los estrógenos, tropieza con varios convenientes entre los que sabe citar (173): a) la difusión del estradiol a través de varias capas celulares, b) su coeficiente de reparto entre los espacios intra y extra tisular intra y extra celular y c) la absorción preferencial del estróide en los tejidos adiposos que no pueden ser completamente separados de los úteros intactos. Estas limitaciones desaparecen cuando se utilizan células uterinas en suspensión en la que las interacciones Hormona/célula, aún siendo bioquímica te muy complejas, pueden ser estudiadas en condiciones experimentales cercanas a las fisiológicas (concentración hormona nutrientes, pH, pO_2 , temperatura, etc).

Durante los últimos diez años distintos procedimientos de análisis bioquímicos han sido propuestos para cuantificar receptores de estrógenos y progesterona en tejido tumoral mamario (216); sin embargo el ensayo sobre células intactas, mantenidas en suspensión utilizando un medio nutriente adecuado, ha alcanzado, quizás como consecuencia de ciertas dificultades experimentales, una difusión generalizada. Muy recientemente (223, 224) esta metodología ha sido incorporada a las investigaciones que utilizan como modelo de tejido hormono dependiente, líneas celulares tumorales mamarias establecidas y cultivadas en monocapa y se piensa (180) que la virtud potencial de este tipo de ensayo radica en la estandarización de un sistema experimental, que permita la realización de ensayos encaminados a estudiar la afinidad de moléculas derivadas de estrógenos y progestágenos de forma que sea posible establecer relaciones apropiadas entre la estructura química y la actividad biológica de la molécula ensayada.

Brevemente descrito el procedimiento consiste en la incubación de un determinado número de elementos celulares (comprendido entre 200.000 y 600.000) en suspensión (0,4 ml de MEN) con 0,1 ml de solución de $17\beta E_2-^3H$ en concentraciones variables ($2 \cdot 10^{-9}$ a $3 \cdot 10^{-10} M$). Todos los ensayos se realizan con

nimo por duplicado y paralelamente se realiza el ensayo en presencia de un exceso (100-500 veces) de hormona fría, como en el procedimiento clásico en enlace específico de la hormona radiactiva se deduce por sustracción de la actividad inepecíficamente enlazada de los datos de enlace total. Los valores resultantes de esta diferencia pueden ser tratados de acuerdo con la transformación de Scatchard o de la doble reprocua deduciéndose el valor de $B_{Máx}$ y Kd . Los resultados se expresan en fmol/ DNA o número de sitios de enlace por célula.

Las condiciones experimentales en que se realiza el ensayo: tiempo de incubación: 20 minutos, Temperatura: 37 °C, velocidad de agitación: 120 ciclos/min, pH: 7,4 y medio de incubación: MEN, garantizan la absoluta viabilidad celular durante el desarrollo del mismo.

La reproducción de las células del medio de reacción lleva a cabo por centrifugación (800g, 10 minutos) y aspiración del sobrenadante. Tras lavar con 2 ml de solución de HANK'S para eliminar el esteróide enlazado a las membranas celulares, el pellet celular obtenido por centrifugación se trata con una mezcla constituida por 0,3 ml de Solueno-100 y 0,7 ml de Etanol y la extracción de $17\beta E_2-^3H$ se realiza por solubilización total de las células en esa mezcla. Por último se transfiere la solución resultante a un vial de centelleo líquido con 4,2 ml de mezcla centelleadora y se somete a contaje

2.3.7. Cinética de la Captación de $17\beta E_2$ por las Células Uterinas

Células en monocapa (MCF-7 o T47D) captan el estradiol presente en el medio de cultivo con gran rapidez, alcanzándose el máximo valor de incorporación del estrógeno al interior de la célula en tiempos comprendidos entre 30 y 60 minutos (180,223): Este valor no se modifica para células MCF-7 cultivadas en suspensión (155) y resulta aproximadamente igual al encontrado para células uterinas en suspensión (173). Los mecanismos de entrada del estradiol en células uterinas han sido discutidos por Müller y Wotiz (174). Siguiendo las técnicas descritas en la bibliografía hemos estudiado la cinética de la captación del $17 E_2$ en dos condiciones experimentales distintas.

a) Velocidad inicial de incorporación intracelular de $17 E_2$ y b) Captación del estradiol a tiempos cercanos al equilibrio.

En el primer caso, una suspensión celular conteniendo 10^6 cel/ml se incubaba con $17 E_2$ - 3H , $10^{-9}M$ a las temperaturas de 5° , 10° , 15° , 20° , 30° y $37^\circ C$ extrayendo del tubo de reacción muestras de 0,5 ml a los siguientes intervalos de tiempo: 5, 10, 20, 30, 45, 60, 90 y 120 segundos. La entrada del estradiol al interior de la célula se detiene utilizando 2 ml de HANK'S conteniendo $17 E_2$ frío, $10^{-6}M$ y reduciendo temperatura a $0^\circ C$ con mezcla de hielo fundente. Al término de la experiencia las muestras obtenidas se separaban por centrifugación y el pellet resultante se procesa de acuerdo con lo expuesto en el apartado anterior. Paralelamente, la incorporación intracelular de el esteróide marcado se estudia en presencia de una concentración 1.000 veces superior de hormona no radiactiva con objeto de valorar los enlaces no específicos.

Experiencias análogas a las descritas se han llevado a cabo modificando la concentración de $17 \text{ E}_2\text{-}^3\text{H}$ presente en el medio de incubación, Las concentraciones empleadas han sido: 1.10^{-8} , 8.10^{-9} , 5.10^{-9} , 3.10^{-9} , 8.10^{-10} M.

En el segundo caso y con el objeto de definir el tiempo óptimo para la realización del ensayo de RE o RPg sobre células intactas, hemos estudiado la captación específica de la hormona marcada ($17\beta \text{ E}_2\text{-}^3\text{H}$ o R-5020- ^3H) a las temperaturas de 4°C y 37°C , modificando los tiempos de incubación entre 5 y 90 minutos.

2.3.8. Estudio de la Termolabilidad del RE en Citosol y en Células Intactas

En apartados anteriores hemos descrito que el receptor de estrógenos es una especie protéica que presenta una marcada habilidad térmica. Esta propiedad es muy acusada en el tejido intacto a temperatura ambiente, -también en el citosol- y puede reducirse por congelación del espécimen a la temperatura del N_2 líquido o por liofilización del mismo. Con objeto de comprobar si la termoestabilidad del receptor es la misma en citosol que en las células metabólicas activas, hemos sometido a comparación los resultados del ensayo de RE sobre células intactas y sobre citosol procedente del mismo tejido modificando entre 0 y 6 h el tiempo de almacenamiento de la muestra, y utilizando tres temperaturas distintas: 0°C , 20°C y 37°C . El cálculo de la actividad específicamente enlazada al receptor (intracelular o citosólico) se obtiene, como en casos anteriores, por sustracción de los enlaces no específicos respecto al valor de la actividad total enlazada

III. RESULTADOS

III. RESULTADOS OBTENIDOS

3.1. SEPARACION DE CELULAS

Para separar células uterinas de rata de células adiposas o hemáticas contaminantes y/o de células no viables hem llevado a cabo experiencias de centrifugación en gradiente discontinuo de Percoll, desarrollándose éstas en tres condiciones experimentales distintas. Los resultados obtenidos se expresan en las tablas III-1 a III-3 y en ellas se incluyen las condiciones en que la separación se ha llevado a cabo.

TABLA III-1

Separación en gradiente de Percoll

Condiciones experimentales:

Tiempo de centrifugación = 30 min.

Velocidad : 1.800 r.p.m. (800 g-r_{máx})

Concentración de Percoll : 20, 30, 35 y 40%

Volumen de cada componente : 2 ml

<u>FRACCION</u>	<u>CONTENIDO</u>	<u>CELULAS UTERINAS</u>		<u>OTRAS CELULAS</u>
		<u>(vivas)</u>	<u>(Muertas)</u>	
I	Interfase 0-20%	47.500	2.500	--
II	Interfase 20-30%	890.000	10.000	--
III	Fases 30-35%	-	-	25.000 (Macrófagos)
IV	Pellet	-	-	125.000 Hematies Linfoc

1 ml de suspensión celular ($\sim 10^6$ elementos/ml de HANK'S) se aplicó en la capa superior del gradiente.

TABLA III-2

Separación en gradiente de Percoll

Condiciones experimentales

Tiempo de centrifugación = 30 min.
 Velocidad : 1.800 r.p.m. (800g - r_{máx})
 Concentración de Percoll : 20-24-28%
 Volumen de cada componente = 3 ml

<u>FRACCION</u>	<u>CONTENIDO</u>	<u>CELULAS UTERINAS</u>		<u>OTRAS CELULAS</u>
		<u>(Vivas)</u>	<u>(Muertas)</u>	
I	Interfase 0-20%	414.000	345.000	--
II	Fases 20-24-28%	320.000	-	--
III	Pellet	12800.000	-	1.600.000 Hematies, linfc tos, Macrófagos

1 ml de suspensión celular ($\sim 15 \times 10^6$ elementos/ml de HANK'S se aplicó en la capa superior del gradiente.

TABLA III-3

Separación en gradiente de Percoll.

Condiciones experimentales:

Tiempo de centrifugación = 30 minutos

Velocidad : 1.800 r.p.m. (800g - $r_{\text{máx}}$)

Concentración de Percoll : 20, 40%

Volumen de cada componente : 4 ml

<u>FRACCION</u>	<u>CONTENIDO</u>	<u>CELULAS UTERINAS</u> (Vivas) (Muertas)		<u>OTRAS CELULAS</u>
I	Interfase 0-20%	192.000	40.000	--
II	Interfase 20-40%	27000.000	50.000	--
III	Pellet	-	-	10.800.000 Hematies, Macrophages, linfocitos

1 ml de suspensión celular ($\sim 40 \cdot 10^6$ elementos/ml de HANK'S) se aplicó en la capa superior del gradiente.

3.2. ENSAYO DE RE EN CITOSOL

Sobre una preparación homogénea de citosol obtenido a partir de útero de ternera hemos sometido a estudio las variaciones intra e inter ensayo del procedimiento clásico de cuantificación de RE por absorción de la fracción libre con DCC (129).

El citosol originalmente obtenido por homogeneización del tejido en tampón TRIS-ClH, se diluyó a la mitad con ese mismo tampón y a partir de esta dilución, (A) se obtuvo una nueva dilución, $B = 1/4 A$, utilizando como diluyente tampón TRIS-ClH con 2,4 mg/ml de albúmina bovina para evitar el efecto de la escasa proporción de proteínas en el medio sobre la expresión final del resultado de B_{Max} y K_D (190).

Sobre la muestra A se han realizado 5 experiencias de cuantificación de RE por duplicado y sobre la muestra B hemos llevado a cabo también 5 experiencias de RE por duplicado que se repitieron 4 veces en diferentes días. Los resultados de los datos de enlace total, enlace no específico y enlace específico se ofrecen en las tablas III-4 a III-11.

TABLA III-4
=====

Datos de enlace Receptor-Estrógeno. Citosol A (Enlace Total)

Concentración de $17\beta E_2-^3H$	<u>EXPERIENCIA</u>				
	I	II	III	IV	V
	d.p.m.	d.p.m.	d.p.m.	d.p.m.	d.p.m.
$3.10^{-9}M$ (86742 dpm)	10384	10430	10595	10277	10663
	10496	10062	10604	10430	9580
	$\bar{M}:10440$	$\bar{M}:10246$	$\bar{M}:10599$	$\bar{M}:10353$	$\bar{M}:10121$
$2.10^{-9}M$ (58000 dpm)	8098	8369	8141	8426	8503
	8652	8399	7899	8439	8295
	$\bar{M}:8375$	$\bar{M}:8384$	$\bar{M}:8022$	$\bar{M}:8432$	$\bar{M}:8399$
$1.10^{-9}M$ (30714 dpm)	5897	5936	6005	5877	6072
	6134	5857	6107	6022	5989
	$\bar{M}:6015$	$\bar{M}:5896$	$\bar{M}:6056$	$\bar{M}:5949$	$\bar{M}:6030$
$8.10^{-10}M$ (24530 dpm)	4845	5453	5638	5520	5678
	5525	5485	5602	5301	5490
	$\bar{M}:5185$	$\bar{M}:5469$	$\bar{M}:5620$	$\bar{M}:5410$	$\bar{M}:5564$
$5.10^{-10}M$ (15708 dpm)	4112	3824	4176	4210	4393
	4172	4199	4444	4232	4374
	$\bar{M}:4144$	$\bar{M}:4011$	$\bar{M}:4310$	$\bar{M}:4221$	$\bar{M}:4381$
$3.10^{-10}M$ (9884 dpm)	3339	3382	3345	2910	3159
	3028	3512	3284	3367	3407
	$\bar{M}:3183$	$\bar{M}:3447$	$\bar{M}:3314$	$\bar{M}:3138$	$\bar{M}:3283$

TABLA III-5

Datos de enlace Receptor-Estrógeno. Citosol A (Enlaces No Específicos)

Concentración de $17\beta E_2-^3H$	EXPERIENCIA				
	I	II	III	IV	V
	d.p.m.	d.p.m.	d.p.m.	d.p.m.	d.p.m.
$3.10^{-9}M$ (86742 dpm)	4590	4558	4770	5005	4914
	4423	4686	5018	4647	4522
	$\bar{M}:4506$	$\bar{M}:4622$	$\bar{M}:4894$	$\bar{M}:4826$	$\bar{M}:4718$
$2.10^{-9}M$ (58000 dpm)	3719	3635	3290	3543	3246
	3515	3596	4333	3315	3590
	$\bar{M}:3617$	$\bar{M}:3615$	$\bar{M}:3811$	$\bar{M}:3429$	$\bar{M}:3418$
$1.10^{-9}M$ (30714 dpm)	2180	2225	2261	2311	2451
	2245	2320	2225	2428	2378
	$\bar{M}:2212$	$\bar{M}:2272$	$\bar{M}:2243$	$\bar{M}:2369$	$\bar{M}:2414$
$8.10^{-10}M$ (24530 dpm)	1987	1829	1924	2036	2841
	1810	1971	1853	1895	2060
	$\bar{M}:1898$	$\bar{M}:1900$	$\bar{M}:1888$	$\bar{M}:1965$	$\bar{M}:2450$
$5.10^{-10}M$ (15708 dpm)	1428	1449	1441	1417	1395
	1441	1474	1355	1330	1366
	$\bar{M}:1434$	$\bar{M}:1461$	$\bar{M}:1447$	$\bar{M}:1373$	$\bar{M}:1380$
$3.10^{-10}M$ (9884 dpm)	1303	1259	1251	1226	1273
	1332	1204	1271	1156	1084
	$\bar{M}:1317$	$\bar{M}:1231$	$\bar{M}:1261$	$\bar{M}:1191$	$\bar{M}:1178$

TABLA III-6

Datos de enlace Receptor-Estrógeno
Citosol B (Enlace Total)
1^{er} grupo de ensayos

Concentración de $17\beta E_2-^3H$	EXPERIENCIA				
	I	II	III	IV	V
$3 \cdot 10^{-9} M$ (81579 dpm)	9855	10095	9874	10023	10005
$2 \cdot 10^{-9} M$ (54250 dpm)	7015	7454	7327	7395	7278
$1 \cdot 10^{-9} M$ (27808 dpm)	3935	4034	3907	4058	3961
$8 \cdot 10^{-10}$ (21708 dpm)	3486	3594	3397	3488	3271
$5 \cdot 10^{-10}$ (13539 dpm)	--	--	--	--	--
$3 \cdot 10^{-10}$ (8826 dpm)	1554	1567	1794	1565	1596

Los datos recogidos en la tabla representan el valor medio de cada punto realizado por duplicado.

TABLA III-7

Datos de enlace Receptor-Estrógeno
Citosol B (Enlaces no específicos)
1^{er} grupo de ensayos

Concentración de $17\beta E_2-^3H$	EXPERIENCIA				
	I	II	III	IV	V
$3.10^{-9}M$ (81579 dpm)	8187	8612	8213	8496	8490
$2.10^{-9}M$ (54250 dpm)	5514	6032	5657	6000	5618
$1.10^{-9}M$ (27808 dpm)	2486	2892	2429	3105	2618
$8.10^{-10}M$ (21708 dpm)	2315	2640	2282	2394	2252
$5.10^{-10}M$ (13539 dpm)	--	--	--	--	--
$3.10^{-10}M$ (8826 dpm)	913	979	1045	956	1017

Esta Tabla representa los valores medios de la experiencia realizada por duplicado.

TABLA III-8

Datos de enlace Receptor-Estrógeno
Citosol B (Enlace Total)
2º Grupo de ensayos

Concentración de $17\beta E_2-^3H$	EXPERIENCIA				
	I	II	III	IV	V
$3.10^{-9}M$ (81579 dpm)	8684	9283	8951	9064	9687
$2.10^{-9}M$ (54250 dpm)	7354	5929	6470	6054	6150
$1.10^{-9}M$ (27808 dpm)	3929	3899	3768	3425	4018
8.10^{-10} (21708 dpm)	3458	3286	3134	3324	3297
$5.10^{-10}M$ (13539 dpm)	2354	2366	2364	--	2384
3.10^{-10} (8826 dpm)	1769	1913	1849	1775	1773

Esta tabla representa los valores medios de las experiencias realizadas por duplicado.

TABLA III-9

Datos de enlace Receptor-Estrógenos
Citosol B (Enlaces no específicos)
2º Grupo de Ensayos

Concentración de $17\beta E_2-^3H$	EXPERIENCIA				
	I	II	III	IV	V
$3.10^{-9}M$ (81579 dpm)	7040	7793	7515	7755	8321
$2.10^{-9}M$ (54250 dpm)	5766	4683	5252	5014	5021
$1.10^{-9}M$ (27808 dpm)	2570	2567	2553	2520	2831
8.10^{-10} (21708 dpm)	2348	2149	2070	2333	2235
5.10^{-10} (13539 dpm)	1445	1445	1528	--	1553
3.10^{-10} (8826 dpm)	956	1111	1091	1052	1040

Esta tabla representa los valores medios de las experiencias realizadas por duplicado.

TABLA III-10

Datos de enlace Receptor-Estrógenos
Citosol B (Enlace total)
3^{er} grupo de ensayos

Concentración de $17\beta E_2-^3H$	EXPERIENCIA				
	I	II	III	IV	V
$3 \cdot 10^{-9} M$ (81579 dpm)	8794	9024	9205	9304	10026
$2 \cdot 10^{-9} M$ (54250 dpm)	6540	6743	6346	6365	7124
$1 \cdot 10^{-9} M$ (27808 dpm)	3729	3656	3953	3773	3750
$8 \cdot 10^{-10}$ (21708 dpm)	3047	3184	3063	3127	3130
$5 \cdot 10^{-10}$ (13539 dpm)	2443	2326	2180	2284	--
$3 \cdot 10^{-10}$ (8826 dpm)	1481	1634	1545	1639	1598

Esta tabla representa los valores medios de las experiencias realizadas por duplicado.

TABLA III-11

Datos de enlace Receptor-Estrógenos
Citosol B (Enlaces no Específicos)
3^{er} Grupo de ensayos

Concentración de $17 E_2-^3H$	EXPERIENCIA				
	I	II	III	IV	V
$3.10^{-9}M$ (81579 dpm)	6869	7489	7653	7665	8491
$2.10^{-9}M$ (54250 dpm)	5352	5400	4830	5090	5746
$1.10^{-9}M$ (27808 dpm)	2933	2424	2832	2764	2638
$8.10^{-10}M$ (21708 dpm)	2094	2221	2111	2142	2151
$5.10^{-10}M$ (13539 dpm)	1479	1434	1361	1369	--
3.10^{-10} (8826 dpm)	1007	1066	1056	1067	1057

Esta tabla representa los valores medios de las experiencias realizadas por duplicado.

3.3. CINETICA DE LA CAPTACION INTRACELULAR DEL ESTRADIOL

Para definir el tiempo de incubación necesario para que la magnitud del enlace específico del estradiol a las células, alcance su máximo valor, hemos estudiado la evolución de los niveles de $17\beta\text{E}_2\text{-}^3\text{H}$ unido específica e inespecíficamente a las células, utilizando como modelo una suspensión celular de $1,25 \cdot 10^6$ elementos por ml de MEN y una concentración 10^{-9}M de estradiol en el medio. La experiencia se realizó a dos temperaturas, 0° y 37°C , y la separación entre fracción libre y ligada (Actividad total enlazada y actividad inespecíficamente unida a las células) se llevó a cabo por centrifugación en cada uno de los siguientes instantes de tiempo: 5, 10, 20, 30, 45 y 60 minutos. En todos los casos los datos de enlace se obtuvieron por triplicado y para la valoración de los enlaces inespecíficos se utilizó un exceso ($6 \cdot 10^{-7}\text{M}$) de estradiol frío. Las tablas III-12 y III-13 contienen, de manera resumida, los resultados obtenidos.

TABLA III-12

Cinética de la captación intracelular del 17β -Estradiol- ^3H

(Temperatura : 0 °C)

<u>Tiempo</u> <u>(min)</u>	<u>ET</u>	<u>ENE</u>	<u>EE</u>
5	10996	8554	2401
10	17501	11314	6187
20	17905	12082	5103
30	17401	13270	4131
45	15337	12722	2615
60	16295	15548	747

ET: Enlace total (dpm)
ENE: Enlaces no específicos (dpm)
EE: Enlace específico (dpm)

TABLA III-13

Cinética de la captación intracelular del 17β Estradiol- ^3H
(Temperatura : 37 °C)

<u>Tiempo</u> <u>(min)</u>	<u>ET</u>	<u>ENE</u>	<u>EE</u>
10	13290	5423	7867
20	12814	3895	8919
30	11775	3407	8369
45	10208	4178	6030
60	8982	3755	5227

ET : Enlace total (dpm)
ENE : Enlace no específico (dpm)
EE : Enlace específico (dpm)

3.3.1. Cinética de entrada del estradiol en la célula uterina. Efecto de la concentración del $^{17}\beta\text{E}_2$

Los datos de enlace correspondientes a la velocidad de entrada del estradiol en la célula uterina en dos situaciones experimentales distintas (en presencia y en ausencia de competidor no radiactivo) y en función de la concentración de estradiol en el medio (10^{-8} , $8 \cdot 10^{-9}$, $5 \cdot 10^{-9}$, $3 \cdot 10^{-9}$ y $8 \cdot 10^{-10}$ M) se recogen en las tablas III-14 a III-18. La concentración de elementos celulares se ajustó a $1 \cdot 10^6$ cel/ml y el volumen total para cada ensayo fue de 5 ml. A cada uno de los tiempos reflejados en las tablas se extrajo una alícuota de 0,5 ml que se agregó sobre un tubo, a la temperatura de 0 °C, que contenía un exceso (1000 veces aproximadamente) de estradiol frío para detener la incorporación de la molécula marcada al interior de la célula, (apartado 2.3.7).

TABLA III-14

Velocidad de entrada del $17\beta E_2$ - 3H en la célula uterina
($[E_2^*] = 10^{-8}M$)

t(s)	$17\beta E_2$ - 3H	t(s)	$E_2^* + 17\beta E_2$
10	9300	10	--
20	10632	25	6777
30	13803	30	7168
45	16613	45	11139
60	14069	60	7505
90	17812	90	9702
120	17603	120	11141

==TABLA III-15==

Velocidad de entrada del $17\beta E_2-^3H$ en la célula uterina
 ($[E_2^*] = 8 \cdot 10^{-9} M$)

t(s)	$17\beta E_2-^3H$	t(s)	$E_2^* + 17\beta E_2$
10	8506	15	--
20	9905	25	8440
30	10992	35	--
45	13210	45	7167
60	13820	60	5446
90	14286	90	6935
120	17032	120	8817

TABLA III-16
=====

Velocidad de entrada del $17\beta E_2\text{-}^3\text{H}$ en la célula uterina
($[E_2^*] = 5 \cdot 10^{-9} \text{M}$)

$t(s)$	$17\beta E_2\text{-}^3\text{H}$	$t(s)$	$E_2^* + 17\beta E_2$
10	8311	10	5315
20	6428	20	3909
30	7459	30	4192
45	9503	45	3682
60	10601	60	4072
90	12376	90	4968
120	--	120	6587

TABLA III-17

Velocidad de entrada del $17\beta E_2-^3H$ en la célula uterina
 ($[E_2^*] = 3 \cdot 10^{-9} M$)

t(s)	$17\beta E_2-^3H$	t(s)	$E_2^* + 17\beta L_2$
10	4791	10	--
20	3718	20	2972
30	4823	30	--
45	6608	45	2577
60	6998	60	3423
90	--	90	3423
120	9091	120	--

TABLA III-18

Velocidad de entrada del $17\beta E_2^{-3}H$ en la célula uterina

$$([E_2^*] = 8 \cdot 10^{-10} M)$$

$t(s)$	$17\beta E_2^{-3}H$	$t(s)$	$E_2^* + 17\beta E_2$
10	2560	10	2040
20	2653	20	1847
30	2356	30	1796
45	2390	45	1699
60	3270	60	1971
90	3949	90	2115
120	4671	120	1843

3.3.2. Cinética de entrada del estradiol en la célula uterina. Efecto de la temperatura

El estudio de la influencia que sobre la velocidad de entrada del $17\beta E_2-^3H$ en la célula uterina ejerce la temperatura se ha realizado sobre una preparación homogénea de células uterinas de ratas suspendidas en MEN (1.10^6 cel/ml) a las temperaturas de 5, 10, 15, 20 y 30 °C en las situaciones experimentales definidas por presencia o la ausencia de compuestos frío. Los resultados obtenidos se ofrecen en las tablas III-19 a III-23. La concentración de estradiol fue en todos los casos 10^{-9} M.

TABLA III-19

Velocidad de entrada del $17\beta E_2-^3H$ en la célula uterina
(T = 5 °C)

t (s)	$17\beta E_2-^3H$	$E_2^* + 17\beta E_2^-$
10	6167	4823
30	7252	4976
60	9826	4611
90	9975	4847
120	4731	4929
150	12924	3848
180	12038	4781

TABLA III-20

Velocidad de entrada del $17\beta E_2-^3H$ en la célula uterina
(T = 10 °C)

t(s)	$17\beta E_2-^3H$	$E_2^* + 17\beta E_2$
10	7365	4980
30	10443	4414
60	10722	5210
90	12824	5602
120	--	4365
150	13527	4413
180	15047	4185

TABLA III-21

Velocidad de entrada del $17\beta E_2-^3H$ en la célula uterina
(T = 15 °C)

t(s)	$17\beta E_2-^3H$	$E_2^* + 17\beta E_2$
10	7644	5303
30	10957	--
60	11598	4987
90	12215	3852
120	14587	3987
150	15786	3624
180	16080	3902

TABLA III-22

Velocidad de entrada del $17\beta E_2-^3H$ en la célula uterina
(T = 20 °C)

t(s)	$17\beta E_2-^3H$	$E_2^* + 17\beta E_2$
10	8422	4447
30	11069	3558
60	13785	4762
90	--	3842
120	14569	3789
150	18572	3485
180	--	3859

TABLA III-23

Velocidad de entrada del $17\beta E_2-^3H$ en la célula uterina
(T = 30 °C)

t(s)	$17\beta E_2-^3H$	$E_2^* + 17\beta E_2$
10	14040	3147
30	18031	3880
60	22065	4106
90	--	3729
120	31810	3955
150	25799	3559
180	--	3692

3.4. LINEALIDAD DE LA CAPTACION DEL 17 β ESTRADIOL-³H

Para comprobar la relación existente entre captación específica del 17 β E₂ y el número de células puestas por tubo, en las condiciones de T = 37 °C y tiempo de incubación = 20 minutos, hemos analizado los datos de enlace observado en 5 suspensiones celulares distintas cuya cantidad de células por cada 0,4 ml de suspensión fue la siguiente: 10⁵, 2.10⁵, 3.10⁵, 4.10⁵ y 5.10⁵ células.

La valoración de la actividad total enlazada se efectuó por triplicado, empleando 0,1 ml de 17 β E₂-³H, 5.10⁻⁹M, sobre 0,4 ml de suspensión celular (concentración de E₂, 10⁻⁹M final) y la de los enlaces no específicos incorporando a la disolución 5.10⁻⁹M el 17 E₂-³H un exceso de hormona fría (600 veces).

La tabla III-24 ofrece de manera resumida los resultados obtenidos.

TABLA III-24

Linealidad de la captación de $17\beta E_2-^3H$

<u>Nº de células</u>	<u>Enlace Específico</u>
10^5	632
$2 \cdot 10^5$	1318
$3 \cdot 10^5$	1512
$4 \cdot 10^5$	2321
$5 \cdot 10^5$	2803

3.5. ESTABILIDAD TERMICA DEL RECEPTOR DE ESTROGENOS

La degradación del receptor estrogénico por efecto de la temperatura se ha estudiado, tanto en citosol como en células, evaluando la cantidad de $17\beta E_2$ específicamente enlazada en función del tiempo de permanencia de la muestra a cada una de las siguientes temperaturas (0°, 20°, y 37 °C). Los resultados obtenidos se reflejan en las tablas III-25 a III-27 expresados como porcentaje respecto al valor de enlace encontrado para el tiempo inicial.

TABLA III-25

Termoestabilidad del Receptor de Estrógenos

temperatura : 0 °C

Tiempo (horas)	Citosol	Células
0	100%	100%
1	100%	100%
2	83,7%	100%
4	69,1%	83,6%
6	61,0%	75,6%

TABLA III-26

Termoestabilidad del Receptor de Estrógenos

Temperatura = 20 °C

Tiempo (horas)	Citosol	Células
0	100%	100%
1	66,4%	90,2%
2	38,6%	73,9%
4	42,7%	67,3%
6	33,1%	64,9%

TABLA III-27

Termoestabilidad del Receptor de Estrógenos

Temperatura = 37 °C

Tiempo (horas)	Citosol	Células
0	100%	100%
1	35,0%	67,6%
2	7,5%	42,9%
4	0	4,5%
6	0	0

3.6. ESTUDIO DE LA ESPECIFICIDAD DEL ENLACE RECEPTOR-ESTRADIOL

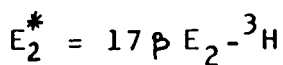
Los estudios de inhibición del enlace receptor-Estradiol en células intactas se han llevado a cabo utilizando como competidores las sustancias siguientes: 17β Estradiol, dietiltildiestrol, 17α Estradiol, Testosterona, Estrona, Progesterona, Corticosterona, Androstendiona, 5 α Dihidrotestosterona, Pregnenolona, Tamoxifeno e Hidroxitamoxifeno. Los resultados obtenidos -utilizando tiempo de incubación 20 minutos, temperatura del ensayo 37°C y concentración de competidor en exceso (2 veces respecto a la concentración de hormona marcada)- se presentan en las tablas III-28 a III-31.

La tabla III-32 ofrece los resultados de los datos de enlace del $17\beta\text{E}_2\text{-}^3\text{H}$ al receptor citosólico en presencia de $17\beta\text{E}_2$ y de los antiestrógenos Tamoxifeno e hidroxitamoxifeno.

TABLA III-28

Datos de enlace Receptor-Estradiol en presencia de distintos competidores.

Molécula	Concentración de $17\beta E_2-^3H$				
	$2 \cdot 10^{-9} M$	$10^{-9} M$	$8 \cdot 10^{-10}$	$5 \cdot 10^{-10}$	$3 \cdot 10^{-10}$
E_2^*	5352	4150	3507	2505	2056
$E_2^* + 17\beta E_2$	2364	1643	1272	924	699
$E_2^* + 17\alpha E_2$	2600	1666	1484	1234	876
$E_2^* + T$	3698	2573	2337	1685	1425
$E_2^* + E_1$	3439	2496	1949	1330	--



T = Testosterona

E_1 = Estrona

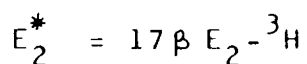
Nº de células por tubo 400.000

Actividad específica del $17 E_2-^3H = 151 \text{ dpm/fmol}$

TABLA 111-29

Datos de enlace Receptor-Estradiol en presencia de distintos competidores.

Moléculas	Concentración de $17\beta E_2-^3H$				
	$2 \cdot 10^{-9} M$	$10^{-9} M$	$8 \cdot 10^{-10} M$	$5 \cdot 10^{-10} M$	$3 \cdot 10^{-10} M$
E_2^*	13286	9015	8164	5839	4620
$E_2^* + 17\beta E_2$	5079	2981	2776	1983	1799
$E_2^* + Pg$	12080	8559	6804	5793	4298
$E_2^* + C$	11714	8867	7188	5862	4942



Pg = Progesterona

C = Corticosterona

nº de células por tubo 400.000

Actividad específica : 151 dpm/fmol

TABLA III-30

Datos de enlace Receptor-Estradiol en presencia de distintos competidores.

Moléculas	Concentración de $17\beta E_2-^3H$				
	$2 \cdot 10^{-9} M$	$10^{-9} M$	$8 \cdot 10^{-10} M$	$5 \cdot 10^{-10} M$	$3 \cdot 10^{-10} M$
E_2^*	7296	5206	4240	3471	2605
$E_2^* + 17\beta E_2$	3718	2114	1660	1482	1160
$E_2^* + A$	6921	5240	4195	3478	2608
$E_2^* + Pr$	7476	5298	4318	3506	2585
$E_2^* + 5\alpha DHT$	7047	5324	4340	3477	--

E_2^* : $17\beta E_2-^3H$

A : Androstendiona

Pr : Pregnanolona

$5\alpha DHT$: 5α Dihidrotestosterona

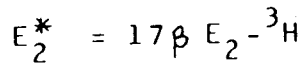
nº de células por tubo: 300.000

Actividad específica : 151 dpm/fmol

TABLA III-31
=====

Datos de enlace Receptor-Estradiol en presencia de distintos competidores.

Moléculas	Concentración de $17\beta E_2$				
	$2 \cdot 10^{-9} M$	$10^{-9} M$	$8 \cdot 10^{-10} M$	$5 \cdot 10^{-10}$	$3 \cdot 10^{-10} M$
E_2^*	3501	2565	2031	1521	1044
$E_2^* + 17\beta E_2$	2063	1409	1127	853	721
$E_2^* + TAM$	2731	1967	1507	1088	734
$E_2^* + OH-TAM$	2743	1764	1233	963	716



TAM = Tamoxifeno

OH-TAM = Hidroxitamoxifeno

TABLA III-32

Datos de enlace Receptor-Estradiol en presencia de distintos competidores

(Citosol de útero de rata)

Moléculas	Concentración de $17\beta E_2-^3H$				
	$2 \cdot 10^{-9} M$	$10^{-9} M$	$8 \cdot 10^{-9} M$	$5 \cdot 10^{-10} M$	$3 \cdot 10^{-10}$
E_2^*	7405	4587	3289	2247	1479
$E_2^* + E_2$	4878	2754	1929	1325	875
$E_2^* + TAM$	4574	2793	2102	1595	1218
$E_2^* + OHTAM$	4410	2562	1844	1318	927

3.7. EL CONTROL "NEGATIVO" DEL ENSAYO

Con objeto de verificar que la incorporación intracelular específica del estradiol tiene lugar sobre la proteína receptora de estrógenos, y teniendo en cuenta que esta macromolécula existe en los tejidos hormono dependientes pero no en las células extraídas de otros territorios, hemos sometido a comparación los resultados del ensayo en células intactas realizado simultáneamente sobre células uterinas de rata y células del riñón del mismo animal. La suspensiones celulares se prepararon de manera idéntica a lo expuesto en apartados anteriores y la tabla III-33 resume los resultados obtenidos.

TABLA III-33

Control positivo y negativo del ensayo

$17\beta E_2-^3H$	Cél. Utero		Cél. Riñón	
	ET	ENE	ET	ENE
$2 \cdot 10^{-9} M$	5042	2192	29219	27021
$1 \cdot 10^{-9} M$	4185	1856	13790	13133
$8 \cdot 10^{-10} M$	4010	1630	11515	9626
$5 \cdot 10^{-10} M$	3388	1574	7081	7154
$3 \cdot 10^{-10} M$	2858	1326	4198	4887

Nº de células uterinas = 200.000 cel/tubo
DNA = 10,6 ng/10⁶ cel.

nº de células renales = 700.000 cel/ tubo
DNA = 15,2 ng/10⁶ cel

3.8. COMPARACION DE METODOS

Utilizando como modelo de tejido hormono-dependiente - útero de coneja inmadura, hemos sometido a comparación los resultados del ensayo de RE en células intactas con los que ofrece el procedimiento clásico de medida de RE en citosol. Para ello y con objeto de garantizar la homogeneidad del material biológico utilizado, los úteros se dividieron, inmediatamente a la cirugía, en dos porciones idénticas destinándose una de ellas a la obtención del citosol (apartado 2.3.1) y la otra se procesó de acuerdo con lo expuesto en el apartado 2.3.2 para obtener una suspensión monocelular de elementos viables.

Los resultados de estas experiencias se ofrecen en las tablas III-34 a III-39.

El tratamiento de esos datos de enlace de acuerdo con la transformación de Scatchard se expone en la tabla III-40.

TABLA III-34
 =====

Comparación citosol-células. Experiencia I.

$17\beta E_2-^3H$	<u>Datos de enlace</u>			
	Citosol		Células	
	ET	ENE	ET	ENE
$2 \cdot 10^{-9}$	17102	6483	9644	3454
10^{-9}	12912	3684	6737	2733
$8 \cdot 10^{-10}$	10810	3065	6056	2713
$5 \cdot 10^{-10}$	7802	1925	4740	2523
$3 \cdot 10^{-10}$	5519	1266	3768	2291

Proteínas citosol = 1,29 mg/ml

nº células : 1.250.000/ml

DNA = 13,8 ng/10⁶ cel

nº células/tubo = 500.000

TABLA III-35

Comparación citosol-células. Experiencia II.

Datos de enlace

$17\beta E_2-^3H$	Citosol		Células	
	ET	ENE	ET	ENE
$2 \cdot 10^{-9}$	21539	6683	13393	5363
10^{-9}	16641	4263	11294	4018
$8 \cdot 10^{-10}$	13474	3102	8004	3483
$5 \cdot 10^{-10}$	9515	1939	7064	3046
$3 \cdot 10^{-10}$	6701	1374	5500	2915

Proteínas citosol = 2,58 mg/ml

nº células : $1,75 \cdot 10^6$ cel/ml

DNA = 15,7 ng/ 10^6 cel

Nº células/Tubo = 700.000

TABLA III-36

Comparación citosol-células. Experiencia III.

Datos de enlace

$17\beta E_2-^3H$	Citosol		Células	
	ET	ENE	ET	ENE
$2 \cdot 10^{-9}$	7221	3623	17755	6752
10^{-9}	4654	2105	12046	4340
$8 \cdot 10^{-10}$	3443	1469	10300	3901
$5 \cdot 10^{-10}$	2603	1074	7275	2950
$3 \cdot 10^{-10}$	1765	710	5078	2265

Proteínas citosol = 1,98 mg/ml

nº células = $1,83 \cdot 10^6$ cel/ml

DNA = 8,8 ng/ 10^6 cel.

nº células/tubo = 730.000

TABLA III-37

Comparación citosol-células. Experiencia IV.

Datos de enlace

17 β E ₂ - ³ H	Citosol		Células	
	ET	ENE	ET	ENE
2.10 ⁻⁹	9355	6545	4803	3105
10 ⁻⁹	5639	3559	3310	2050
8.10 ⁻¹⁰	4798	2850	2997	1798
5.10 ⁻¹⁰	3267	1754	2398	1489
3.10 ⁻¹⁰	2065	1155	1902	1292

Proteínas citosol = 0,96 mg/ml

nº de células = 750.000 cel/ml

DNA = 15.3 ng/10⁶cel.

nº células/Tubo = 300.000

TABLA III-38

Comparación citosol-células. Experiencia V.

Datos de enlace

$17\beta E_2-^3H$	Citosol		Células	
	ET	ENE	ET	ENE
$2 \cdot 10^{-9}$	12831	5704	5215	2111
10^{-9}	9925	3769	4312	1715
$8 \cdot 10^{-10}$	8455	2842	4205	1682
$5 \cdot 10^{-10}$	6369	1692	3391	1532
$3 \cdot 10^{-10}$	4609	1286	2832	1342

Proteínas citosol = 1,76 mg/ml

nº de células = 500.000 cél/ml

DNA = 20,6 ng/10⁶ cel.

nº células/Tubo = 200.000

TABLA III-39

Comparación citosol-células. Experiencia VI.

Datos de enlace

$^{17}\beta E_2-^3H$	Citosol		células	
	ET	ENE	ET	ENE
$2 \cdot 10^{-9}$	7405	4815	3504	2063
10^{-9}	4587	2721	2565	1409
$8 \cdot 10^{-10}$	3089	1803	2031	1127
$5 \cdot 10^{-10}$	2247	1311	1514	850
$3 \cdot 10^{-10}$	1479	734	1100	721

Proteínas citosol = 1,92 mg/ml

nº células = $1,4 \cdot 10^6$ cél/ml

DNA = 12,8 ng/ 10^6 cél.

nº células/Tubo = 560.000

TABLA III40

Parámetros de la transformación de Scatchard en citosol y células.

Experiencia		Citosol	Células
Exp. I	r	0,992	0,984
	a	$-3,77 \cdot 10^{-5}$	$-3,95 \cdot 10^{-6}$
	b	0,548	0,057
Exp. II	r	0,978	0,983
	a	$-3,35 \cdot 10^{-5}$	$-7,18 \cdot 10^{-6}$
	b	0,774	0,093
Exp. III	r	0,974	0,980
	a	$-2,96 \cdot 10^{-5}$	$-4,34 \cdot 10^{-6}$
	b	0,158	0,099
Exp. IV	r	0,984	0,990
	a	$-2,66 \cdot 10^{-5}$	$-9,56 \cdot 10^{-6}$
	b	0,106	0,023
Exp. V	r	0,957	0,991
	a	$-5,23 \cdot 10^{-5}$	$-1,66 \cdot 10^{-5}$
	b	0,476	0,065
Exp. VI	r	0,964	0,986
	a	$-1,69 \cdot 10^{-5}$	$-1,09 \cdot 10^{-5}$
	b	0,084	0,025

3.9. ENSAYO DE RE SOBRE CELULAS OBTENIDAS POR CENTRIFUGACION EN GRADIENTE DE PERCOLL

Con objeto de estudiar la influencia que la presencia de otras células (hematíes, linfocitos, macrófagos y células uterinas no viables) tiene sobre la cuantificación final de la tasa de receptores estrogénicos en células intactas, hemos sometido a comparación los resultados del ensayo realizado sobre suspensiones celulares con las que se obtienen cuando es misma preparación celular, se somete a centrifugación para separar las células uterinas viables del resto de elementos celulares acompañantes.

Los resultados de estas experiencias se muestran en las tablas III-41 y III-42. La tabla III-43 recoge los parámetros de la transformación de scatchard de los datos de enlace.

TABLA III-41

Ensayo RE sobre células uterinas separadas por centrifugación en gradiente de Percoll.

Experiencia I

$^{17}\beta\text{E}_2\text{-}^3\text{H}$	<u>Suspensión "Bruta"</u>		<u>Suspensión "Pura"</u>	
	ET	ENE	ET	ENE
$2 \cdot 10^{-9}\text{M}$	13393	5363	4906	2972
10^{-9}M	11294	4018	3752	2364
$8 \cdot 10^{-10}\text{M}$	8004	3483	3390	2259
$5 \cdot 10^{-10}\text{M}$	7064	3046	2943	2020
$3 \cdot 10^{-10}\text{M}$	5500	2915	2486	1885

Suspensión "Bruta":

nº de células : $1,75 \cdot 10^6/\text{ml}$

DNA = $15,7 \text{ ng}/10^6 \text{ cel}$

nº células/tubo 700.000

Suspensión "Pura"

nº células/tubo = 200.000

TABLA III-42

Ensayo sobre células uterinas separadas por centrifugación en gradiente de Percoll.

Experiencia II

$^{17}\beta\text{E}_2\text{-}^3\text{H}$	<u>Suspensión "Bruta"</u>		<u>Suspensión "Pura"</u>	
	ET	ENE	ET	ENE
$2 \cdot 10^{-9}\text{M}$	17755	6752	11551	4382
10^{-9}M	12046	4340	8207	2839
$8 \cdot 10^{-10}\text{M}$	10300	3901	7150	2570
$5 \cdot 10^{-10}\text{M}$	7275	2950	5158	1912
$3 \cdot 10^{-10}\text{M}$	5078	2265	3885	1801

Suspensión "Bruta"

nº de células : $1,83 \cdot 10^{-6}$ cel/ml

DNA = $8,8 \text{ ng}/10^6$ cel

nº células/tubo 730.000

Suspensión "Pura"

nº células tubo = 350.000

TABLA III-43

Parámetros de la transformación de Scatchard de los
datos de enlace

Experiencia	Suspensión "Bruta"	Suspensión "Pura"
I	$r = 0,983$ $a = 7,18 \cdot 10^{-6}$ $b = 0,093$	$r = 0,937$ $a = -9,18 \cdot 10^{-6}$ $b = 0,024$
II	$r = 0,980$ $a = 4,34 \cdot 10^{-6}$ $b = 0,099$	$r = 0,984$ $a = -5,97 \cdot 10^{-6}$ $b = 0,076$

3.9 ENSAYO DE RECEPTORES ESTROGÉNICOS SOBRE CELULAS INTACTAS DE CANCER DE MAMA

La aplicación de las técnicas de separación celular - acción enzimática acción mecánica- (apartado 2.3.2), a trozos de tejido tumoral mamario nos ha permitido estudiar la presencia o ausencia de estrofilina en células intactas procedentes de cáncer humano como parámetro indicativo de la hormono dependencia tumoral y contrastar los resultados ofrecidos por este ensayo, con los que se obtienen cuando se aplica la metodología tradicional del test RE realizado sobre la fracción citosólica del tejido.

Tras la puesta a punto de las técnicas necesarias para llevar a cabo el análisis en células y durante el periodo final de la realización experimental de este trabajo, hemos tenido oportunidad de incluir en el mismo, un total de 8 casos en los que ambos ensayos se han llevado a cabo simultáneamente. Los resultados obtenidos se exponen en las tablas III-45 a III-51.

En 4 casos el rendimiento de la obtención celular fue escaso y el ensayo en células completas se realizó utilizando un procedimiento similar al de saturación de un único punto.

TABLA III-44

Ensayo RE en cáncer de mama.

CASO Nº 1 : D.M.H.

DATOS DE ENLACE : (RE-CITOSOL)

Prot = 6,2 mg/ml

AT	ET	ENE	B	F
82487	16033	15831	-	-
63590	9827	10633	-	-
29624	6268	6616	-	-
18301	3586	3893	-	-
7878	1947	1742	-	-

DATOS DE ENLACE : (RE-CELULAS)

Análisis de un punto único.

nº de células : 200.000 cél/Tubo

DNA = 44 ng/Tubo

AT	ET	ENE	B
81844	8701	7950	741

TABLA III-45

Ensayo RE en cáncer de mama.

CASO Nº 2 : E.S.M.

DATOS DE ENLACE: (RE-CITOSOL)

Prot = 6,4 mg/ml

AT	ET	ENE	B	F
125653	9967	7441	2526	123127
63745	5760	3641	2119	60664
31507	3118	1815	1303	30284
15859	1694	883	811	15103
8409	904	484	420	7978
4331	510	257	253	4078

DATOS DE ENLACE : (RE- CELULAS)

Análisis de un punto único

Nº de células : 150.000 cel/Tubo

DNA = 11,7 ng/Tubo

AT	ET	ENE	B
81844	18907	16160	2747

TABLA III-46

Ensayo RE en cáncer de mama.

CASO Nº 3 : A.H.M.

DATOS DE ENLACE : (RE-CITOSOL)

Prot = 7,7 mg/ml

AT	ET	ENE	B	F
125607	29048	11071	17977	107630
62783	20038	5642	14396	48387
31587	12433	2993	9440	22147
15914	6975	1906	5067	10845

DATOS DE ENLACE : (RE-CELULAS)

Nº células = 300.000/tubo

DNA = 20,8 ng/tubo

AT	ET	ENE	B	F
214604	36993	29167	7828	206776
109125	19449	13356	6093	103032
60593	11400	7022	4378	56215
29184	6803	3352	2451	26733
17581	4348	2960	1388	16193

TABLA III-47
=====

Ensayo RE en cáncer de mama.
CASO Nº 4, C.A.B.

DATOS DE ENLACE : (RE-CITOSOL)

Prot = 5 mg/ml

AT	ET	ENE	B	F
204712	19898	19455	443	204269
122949	13065	11409	1656	121293
81838	8268	8863	--	--
40171	4446	3958	488	39683
22148	3125	2585	540	21608
6676	895	1636	--	--

DATOS DE ENLACE : (RE-CELULAS)

Nº células = 130.500 cél/Tubo

DNA = 3,75 ng/tubo

AT	ET	ENE	B	F
239098	13056	12484	572	238526
134728	7630	7044	586	134142
70913	3211	3213	-	70913
40705	2226	1674	552	40153
20935	1184	1095	89	20846

TABLA III-48

Ensayo RE en cáncer de mama.

CASO Nº 5, A.M.H.

DATOS DE ENLACE : (RE-CITOSOL)

Prot =4,9 mg/ml

AT	ET	ENE	B	F
204712	38201	20923	17278	187434
122949	27875	12241	15634	107315
81838	21461	8497	12964	68874
40171	14254	4385	9869	30302
22148	8933	2517	6416	15732
6676	--	1758	--	--

DATOS DE ENLACE : (RE-CELULAS)

Análisis de un punto único.

Nº células : 134.000 cel/Tubo

DNA = 3,4 ng/tubo

AT	ET	ENE	B
224350	19556	12317	7015

TABLA III-49

Ensayo RE en cáncer de mama.

CASO Nº 6 M.Q.T.

DATOS DE ENLACE : (RE-CITOSOL)

Prot = 3,5 mg/ml

AT	ET	ENE	B	F
200231	16574	10129	6445	193786
120900	6703	5566	1137	119763
83226	4400	3088	1312	81914
42451	2059	1594	485	41986
22515	1179	818	361	12506
12867	689	854	-	--

DATOS DE ENLACE : (RE-CELULAS)

Nº células : 280.000 cel/Tubo

DNA = 7,85 ng/tubo

AT	ET	ENE	B	F
310886	44828	37394	7437	303452
162447	27569	21886	5683	156764
83232	13776	10771	3005	80227
56549	8236	7113	1163	55386
39691	5508	5942	--	--

TABLA III-50

Ensayo RE en cáncer de mama.
CASO Nº 7, M.L.R.

DATOS DE ENLACE : (RE-CITOSOL)

Prot = 2,5 mg/ml

AT	ET	ENE	B	F
197521	8640	6750	1890	195631
118762	5878	4001	1877	116885
83597	4255	2721	1534	82063
43452	2373	1429	944	42508
23788	1440	698	742	23046
12782	838	350	488	12294

DATOS DE ENLACE : (RE-CELULAS)

Nº células : 300.000 cel/tubo

DNA = 7,6 ng/tubo

AT	ET	ENE	B	F
253778	15413	10416	4997	248781
148530	11302	6798	4504	144026

TABLA III-51

Ensayo RE en cáncer de mama.

CASO Nº 8 C.L.R.

DATOS DE ENLACE : (RE-CITOSOL)

Prot = 1,71 mg/ml

AT	ET	ENE	B	F
321136	23132	24009	-	-
173759	13531	19726	-	-
87923	9863	8756	893	87030
62610	4762	6003	-	-
21360	2517	2957	-	-
11947	1604	1434	170	11777

DATOS DE ENLACE : (RE-CELULAS)

Nº células : 128.000 cel/tubo

DNA = 1,74 ng/tubo

AT	ET	ENE	B	F
208464	2893	3013	-	-
114170	1508	924	584	113586
91496	1261	1128	133	91363
57497	1112	881	231	57266
37317	509	400	109	37208

IV. DISCUSSION

IV. DISCUSION

4.1. SEPARACION DE CELULAS EN GRADIENTE DE PERCOLL

La preparación, en medios de cultivo adecuados, de suspensiones celulares procedentes de tejidos o tumores malignos cualesquiera, ha hecho posible el estudio "in vitro" de cierto número de propiedades biológicas específicas del tejido o tumor en cuestión. La determinación del potencial clonogénico de algunos tumores (42, 84), el establecimiento de relaciones de dependencia entre el nivel de supervivencia celular tumoral y los parámetros básicos-dosis/tiempo -de la irradiación (194) y el análisis en términos cuantitativos de la acción de los agentes quimioterápicos en la respuesta tumoral, (187) constituyen algunos de los ejemplos más significativos del problema planteado.

El desarrollo de uno u otro tipo de experiencias exige dos premisas fundamentales: la disponibilidad de un medio de cultivo apropiado -agar semisólido, habitualmente- para el crecimiento celular, y la obtención, a partir de espécimen tumoral lido correspondiente de un número suficiente de elementos celulares viables para asegurar el cultivo. Este último objetivo suele conseguirse mediante el recurso a la disgregación tumoral utilizando procedimientos técnicos distintos entre los que destacan la separación mecánica (187) por un lado y el tratamiento enzimático del tejido tumoral por otro (211). Recientemente, Engelho y cols (56) han descrito un método de disgregación que combina el carácter mecánico y enzimático de los anteriores y proporciona un índice de rendimiento celular muy acusado.

Brevemente descrito (234) el procedimiento mecánico incluye la división del tumor en pequeños fragmentos utilizando tijeras o bisturí y el posterior, y repetido, paso forzado de los trozos obtenidos a través de agujas de inyección de diámetro c

creciente (nº: 20,22 y 25). Todas las manipulaciones se realizan en ambiente estéril (cámara de flujo laminar) y en medio de cultivo suplementado con antibióticos. Por su parte, los procedimientos enzimáticos incluyen la exposición del espécimen tumoral a la acción conjunta de la tripsina, colagenasa y/o DNAasa a diversas temperaturas y durante periodos de tiempo también variables (56).

En investigación oncológica básica los estudios de quimiosensibilidad tumoral, tropiezan con dos órdenes distintos de dificultad. Por un lado se encuentran los bajos rendimientos que ofrecen, en general, los métodos de separación celular actualmente en uso y por otro, la escasa eficiencia de formación de colonias en agar semisólido de los elementos celulares planteados (92). Una de las líneas de trabajo de nuestro grupo (77) es encaminada al desarrollo de una metodología apropiada para los estudios de quimiosensibilidad y radiosensibilidad tumoral, (utilizando células cultivadas en monocapa) que intenta superar las dificultades anteriormente descritas. Etapa obligada de ese trabajo es la obtención de una suspensión monocelular donde el número de células tumorales viables por unidad de volumen de medio de cultivo, permita el desarrollo posterior de la experiencia. Nuestras investigaciones, en este sentido, han contribuido a estandarizar metodológicamente los procedimientos de obtención de la suspensión de células a partir de trozos de tejido uterino según una técnica cuyas distintas fases pueden ser directamente utilizadas en casos de tumores sólidos humanos como hemos podido demostrar al aplicar nuestro procedimiento a los especímenes de cáncer de mama incluidos en este trabajo. Es importante destacar aquí que, una vez obtenida la suspensión celular, es posible estudiar en ella la presencia o ausencia de receptores estrogénicos (como en este trabajo se expone), la respuesta de las células clonogénicas del tumor a la radiación o a las drogas (76) profundizar en el conocimiento de las características cinéticas de los tumores humanos, investigando los mecanismos de contracción de los mismos.

Por otra parte, la heterogeneidad celular de las efusiones malignas o de los tumores sólidos, hace que el análisis de las capacidades funcionales de los distintos tipos de células sea difícil, si bien las células neoplásicas no viables, los linfocitos y los macrófagos, no representan un serio problema cuando el cultivo celular se lleva a cabo en agar semi-sólido (85, 86) (en este sistema sólo crecen las células neoplásicas con capacidad clonogénica), es bien cierto que para estudiar el crecimiento en monocapa o para definir con precisión alguna característica funcional de las células tumorales (RE o en cáncer de mama por ejemplo) la obtención y purificación de un número adecuado de células resulta esencial. El empleo de una lica coloidal recubierta de povidona (Percoll), como agente capaz de formar medios con diferente densidad, ha sido ampliamente utilizado en la separación de células hematopoyéticas (181-188). Más recientemente se han podido separar células malignas derivadas de tumores experimentales (82) y de tumores humanos (83) de células no neoplásicas, utilizando la centrifugación en Percoll. Debido a su baja osmolaridad, los gradientes de Percoll pueden ser fácilmente ajustados a los niveles fisiológicos utilizando medios de cultivo simples (HANK'S o HBSS), de forma tal que las células "vivas" mantienen su integridad morfológica tras la centrifugación.

En nuestra experiencia, la utilización de un gradiente discontinuo de Percoll permite la separación de células uterinas "vivas" de células no viables o de otros elementos celulares (hematíes, linfocitos y macrófagos) presentes en la suspensión celular (apartado 3.1, tablas III-1 a III-3). Las características funcionales de las mismas, al menos en lo que a su capacidad de captación específica del estradiol se refiere resultan igualmente, inmodificadas.

El método de preparación de la suspensión monocelular se describe en este trabajo, es el resultado de una larga s

de experiencias en las que sucesivamente se fueron modificando las condiciones experimentales (concentración de enzimas, temperatura y tiempo de incubación, velocidad y método de agitación, combinación de la disgregación mecánica tras la acción enzimática, etc) hasta conseguir que la viabilidad -evaluada - por exclusión de azul Tripan- y el rendimiento celular -medido en función del número de células obtenido por gramo de tejido disgregado- alcanzaron, un óptimo nivel. Así aplicando nuestra metodología, la viabilidad celular, para tejido uterino, ha sido siempre superior al 90% y el rendimiento se ha situado en torno a $2-4 \cdot 10^7$ cél/útero.

Desde un punto de vista exclusivamente metodológico, creemos que las modificaciones introducidas en la disgregación mecánica del tejido (utilización de puntas de plástico desechables para pipetas automáticas, en lugar de agujas de inyección) y en las condiciones de temperatura (37°C), tiempo (2 horas), agitación continua en movimientos de vaivén (120 ciclos/min) y concentración de enzimas (colagenasa 0,2% y DNAasa 0,02%) garantizan la obtención de una suspensión monocelular adecuada a cualquier tipo de investigación sobre células intactas.

Por otra parte, conocidos previamente (72) los efectos de la composición de los tampones en los que se lleva a cabo la disgregación celular sobre éste mismo proceso parece apropiado destacar aquí el papel que la concentración de los iones Ca y Mg ejercen tanto sobre el rendimiento y la viabilidad celular como sobre los cambios en el pH, la osmolaridad o la presencia de nutrientes en el medio. En este sentido, la presencia de Ca o Mg (fundamentalmente del primero) ocasiona una disminución importante del rendimiento celular (72) y por ello en todas las experiencias que hemos llevado a cabo en el curso del presente trabajo el medio de reacción no contuvo calcio ni magnesio y tanto el pH como la osmolaridad se ajustaron a niveles fisiológicos.

4.2. REPRODUCTIBILIDAD DEL ENSAYO RE EN CITOSOL

La presentación de los resultados del ensayo de RE en citosol se realiza, por la mayor parte de los laboratorios que tienen en desarrollo, en forma de representación de Scatchard ajustando, por el procedimiento de mínimos cuadrados, los puntos experimentales a una línea recta de la que es posible deducir la máxima capacidad de enlace (B_{Max}), a partir de la intersección de la recta con el eje de abscisas, y la constante de asociación (o disociación: K_d) del complejo RE formado utilizando la pendiente y la ordenada en el origen.

La necesidad de un control de calidad interno (véase apartado 1.7.1) para contrastar la fiabilidad de los resultados que el laboratorio suministra al clínico, nos ha llevado a la realización de una serie de experiencias, utilizando como material biológico citosol de útero de vaca, y eligiendo como niveles de concentración de proteína receptora, aquellos que en los trabajos de Koenders (131, 132) arrojan unos resultados más dispersos. El tratamiento de los datos de enlace (Tablas III-4 a III-11) de acuerdo con la transformación de scatchard se ofrece en forma gráfica en las figuras 4-1 a 4-4 y en forma numérica en las Tablas IV-1 a IV-4.

TABLA IV-1

Reproductibilidad del ensayo RE en citosol. (Muestra A)

Exp	B _{Max} (fmol/mg)	Kd. 10 ¹⁰ (M/l)	r
I	245	5,1	0,987
II	222	3,7	0,906
III	216	3,5	0,947
IV	248	4,9	0,948
V	232	4.2	0,894

TABLA IV-2

Reproductibilidad del ensayo RE en citosol (Muestra B:grupo 1)

Exp	B _{Max} (fmol/mg)	Kd. 10 ¹⁰ (M/l)	r
I	82	6,3	0,904
II	49	6,0	0,988
III	55	4,3	0,924
IV	48	6,0	0,909
V	60	8,2	0,894

TABLA IV-3

Reproductibilidad del ensayo RE en citosol (Muestra B:grupo 2

Exp	B_{Max} f (mol/mg)	$Kd \cdot 10^{10}$ (M/l)	r
I	50	4,2	0,949
II	43	3,1	0,914
III	40	3,2	0,935
IV	35	2,8	0,838
V	39	3,0	0,925

TABLA IV-4

Reproductibilidad del ensayo RE en citosol (Muestra B:grupo 3

Exp	B_{Max} f (mol/mg)	$Kd \cdot 10^{10}$ (M/l)	r
I	50	5,4	0,901
II	50	6,0	0,912
III	57	8,5	0,918
IV	52	6,5	0,937
V	51	8,3	0,996

REPRESENTACION DE SCATCHARD DE LOS DATOS

DE ENLACE. CITOSOL · A. Exp. - I

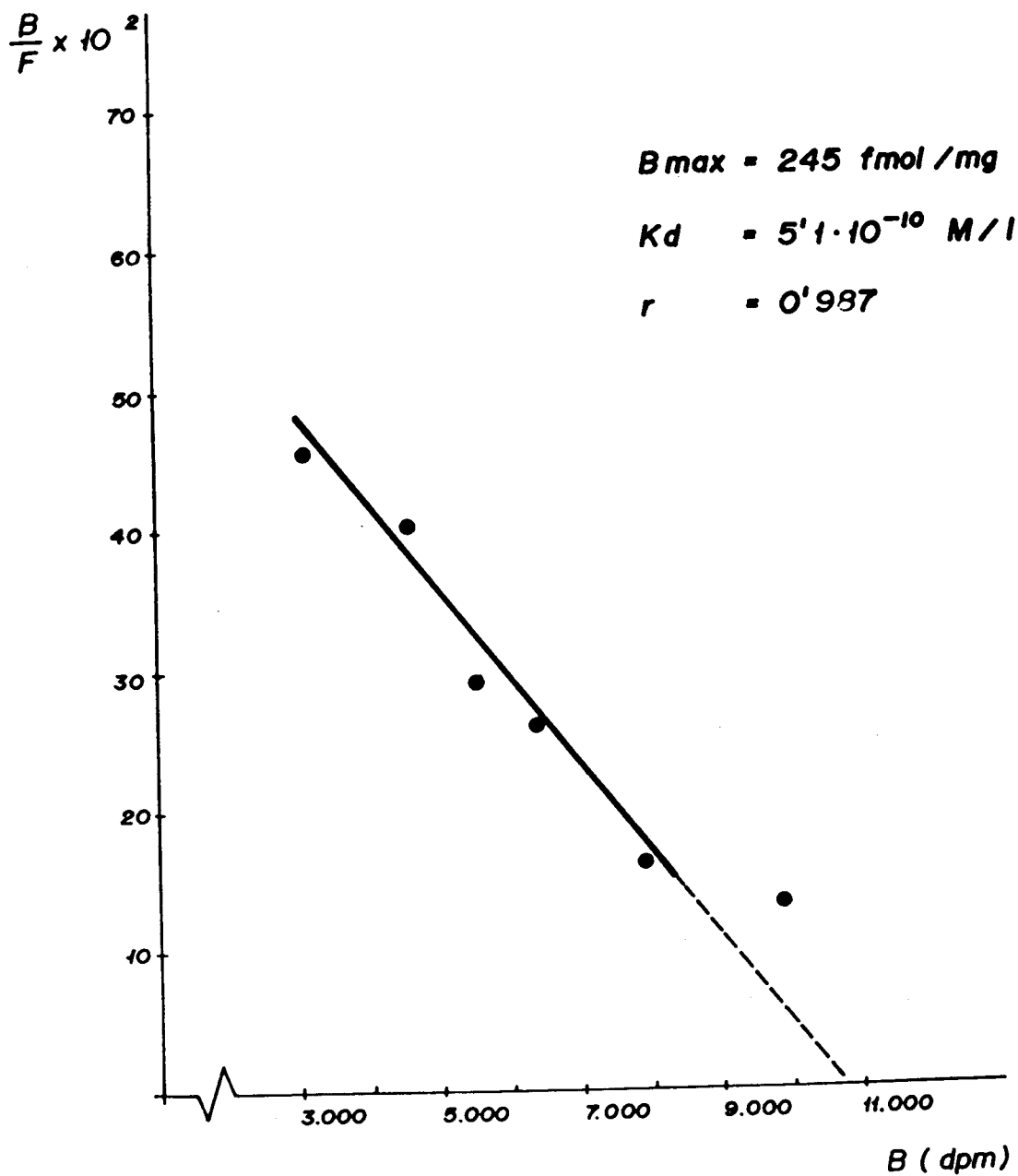


FIGURA. - 4.1

REPRESENTACION DE SCATCHARD DE LOS DATOS
DE ENLACE. CITOSOL · B. - GRUPO 1. - Exp. - IV.

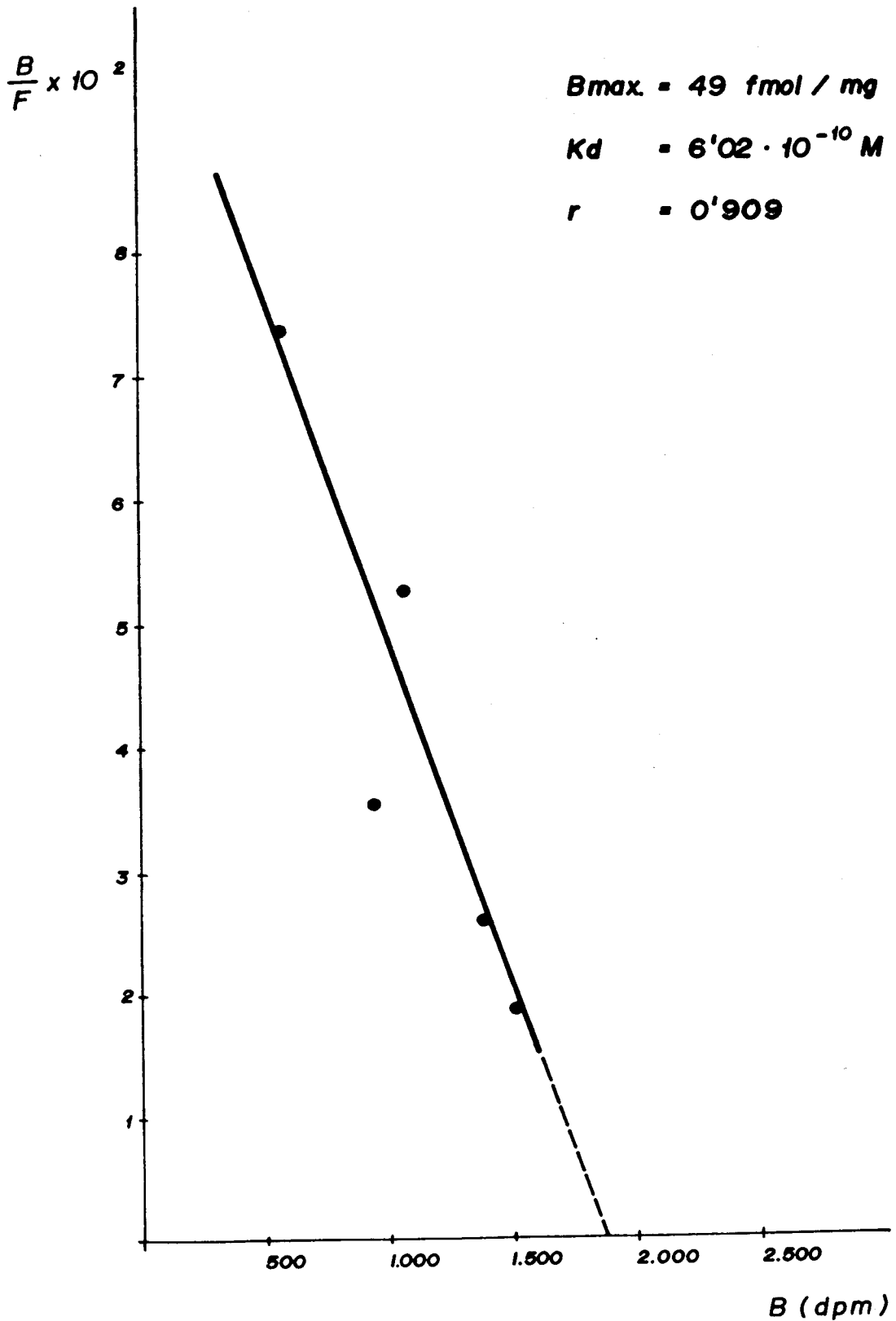


FIGURA. - 4.2

REPRESENTACION DE SCATCHARD DE LOS DATOS
DE ENLACE. CITOSOL · B. - GRUPO 2. - Exp. - III.

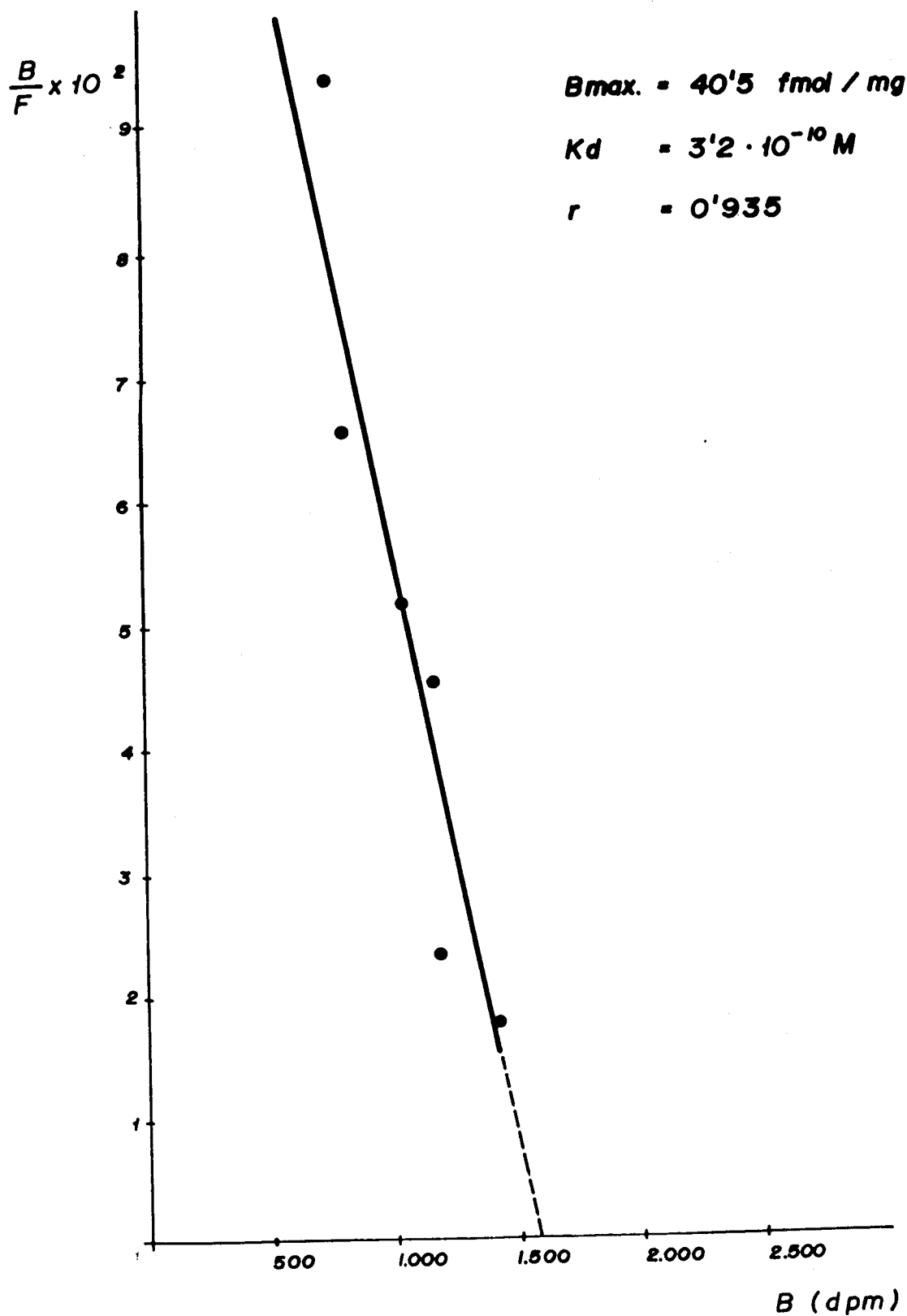


FIGURA. - 4.3

REPRESENTACION DE SCATCHARD DE LOS DATOS

DE ENLACE. CITOSOL · B. - GRUPO 3. - Exp. - IV.

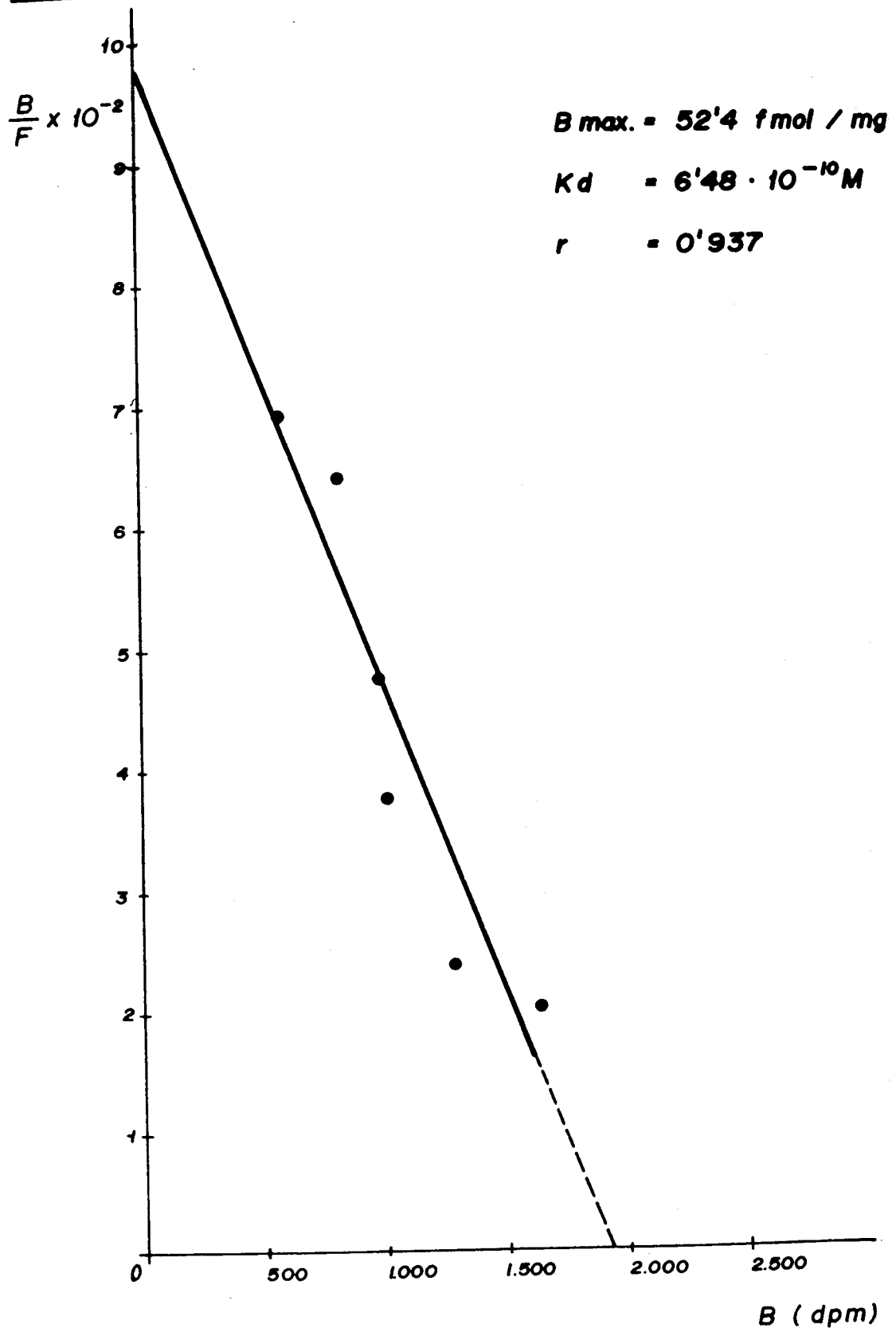


FIGURA. - 4.4

Los valores de la media, desviación estandard y coeficiente de variación para cada uno de los grupos de experiencias realizados figuran en la tabla IV-5.

TABLA IV-5

Reproductibilidad del ensayo RE parámetros de tendencia centra

		M	DS	CV
Muestra A	B_{Max}	232	14	6%
	$Kd \cdot 10^{10}$	4,3	0,7	16%
Muestra B ₁	B_{Max}	59	14	24%
	$Kd \cdot 10^{10}$	6,2	1,4	23%
Muestra B ₂	B_{Max}	41	6	15%
	$Kd \cdot 10^{10}$	3,3	0,6	18%
Muestra B ₃	B_{Max}	52	3	6%
	$Kd \cdot 10^{10}$	6,9	1,4	20%

Del análisis de la Tabla anterior resulta fácil deducir que el coeficiente de variación intraensayo para muestras de concentración de RE situadas en un rango medio o bajo (según la terminología de Koenders (131, 132)) puede alcanzar niveles de hasta el 24%, tanto para la capacidad máxima de enlace como para la constante de disociación del proceso. Estas cifras coinciden con las publicadas por otros autores y deben ser consideradas como una limitación del ensayo, en cuanto a la precisión que el valor cuantitativo de la tasa de Receptores Estrogénico proporciona, limitación que resulta especialmente importante para el establecimiento del umbral de decisión entre positividad o negatividad del análisis, y que obliga a definir una zona ambigua (RE(+)/RE(-)) más o menos amplia según los laboratorios. De acuerdo con las experiencias de otros grupos de trabajo y considerando nuestros propios resultados, una paciente afecta de cáncer de mama tendrá un resultado "inequívocamente" negativo cuando la cuantificación de RE en el citosol procedente del tumor sea inferior a 5 fmol/mg de proteína e "inequívocamente" positivo cuando el valor para B_{Max} sea superior a 10 fmol/mg. Entre 5 y 10 fmol/mg se incluyen los casos en los que el resultado (+) o (-) del ensayo no puede afirmarse con certeza.

Por otra parte teniendo en cuenta que el citosol "B" fué preparado a partir del "A" por dilución 1/4, es posible efectuar una comparación estadística entre los valores medios de la tasa de RE cuantificada en cada uno de los subgrupos B y entre estos y el grupo citosol A.

La tabla Iv-6 ofrece los resultados de estas comparaciones estadísticas realizadas tras la aplicación del test de Cochran para muestras pequeñas.

TABLA IV-6

Comparaciones estadísticas entre resultados medios.

Grupos	Parámetro	$t_{exp.}$	p.
$B_1 - B_2$	B_{Max}	2,64	0,05
	Kd	4,26	0,01
$B_1 - B_3$	B_{Max}	1,09	0,30 N.S.
	Kd	0,79	0,50 N.S.
$B_2 - B_3$	B_{Max}	3,66	0,01
	Kd	5,28	0,01

Al analizar los resultados de la tabla IV-6 es fácil advertir que las comparaciones entre los subgrupos B_1-B_2 y B_1-B_3 son demostrativas de la existencia de diferencias significativas entre los valores medios de la capacidad máxima de enlace (B_{Max}) y constante de disociación (Kd). Sin embargo las diferencias carecen de significación estadística cuando los grupos comparados son B_1 y B_3 . Al revisar los resultados pudimos advertir que las alicuotas de citosol etiquetadas como B_2 fueron las últimas muestras que se procesaron y que entre la cuantificación de RE en citosol A, B_1 y B_3 existió un intervalo de tiempo de 48 horas mientras que entre B_3 y B_2 , el intervalo fué de una semana. Si bien la muestra, una vez preparado el citosol, fué almacenada en congelador a $-60^{\circ}C$, no se puede excluir una degradación parcial del receptor consecuencia de la cual fuese la reducción del número de sitios de unión para el $^{17}PE_2$.

Sabemos, por otra parte, que en el intento de incrementar la exactitud del test RE, como criterio discriminante en la selección de enfermas para terapia endocrina, no sólo la presencia de proteína RE sino también su nivel cuantitativo, ha adquirido importancia en los últimos años (186). La investigación bioquímica de la proteína estrofilina llevó en 1.978 a describir la presencia de un segundo sitio de enlace para el estradiol en citosol de útero de rata (32). Este segundo sitio de unión, llamado "Receptor Tipo II", ha sido demostrado también en citosol procedente de cáncer de mama (185) y aunque su afinidad para el $17\beta E_2$ es algo más reducida que la del "Receptor Tipo I" posee una elevada capacidad de enlace con la hormona. La demostración de este receptor "tipo II" es posible cuando se utilizan altas concentraciones de hormona marcada. En esta situación la transformación de Scatchard para los datos de enlace RE muestra la presencia de los dos componentes (receptor tipo I y receptor tipo II) que pueden ser identificados, en la representación gráfica, con cada una de las rectas que aparecen en la misma (figura 5.5). Aunque en el trabajo de Pankaj y col (185) se sugiere que el receptor tipo II pueda ser parte del mecanismo que media la acción estrogénica o resultado de esta acción investigaciones anteriores de nuestro grupo (58,59) han demostrado que ambas proteínas pueden ser consideradas como formas poliméricas de una cadena elemental de 30.000 dalton de peso molecular. Si bien entre el dímero (Receptor tipo II, coeficiente de sedimentación 4S) y el tetramero (Receptor tipo I, coeficiente de sedimentación 8S) existe una situación de equilibrio, ésta puede ser fácilmente alterada por las condiciones de temperatura, tiempo, fuerza iónica, presencia o ausencia de inhibidores o activadores enzimáticos, etc., en que se realiza el ensayo. En nuestra opinión, y teniendo en cuenta que el sistema biológico constituido por el citosol, dista mucho de ser representativo de los mecanismos de respuesta en células intactas a la acción de las hormonas esteroideas, estos hallazgos deben ser considerados más como artefactos propios del ensayo "in vitro" que co-

REPRESENTACION DE SCATCHARD.

RECEPTORES TIPO - I y II

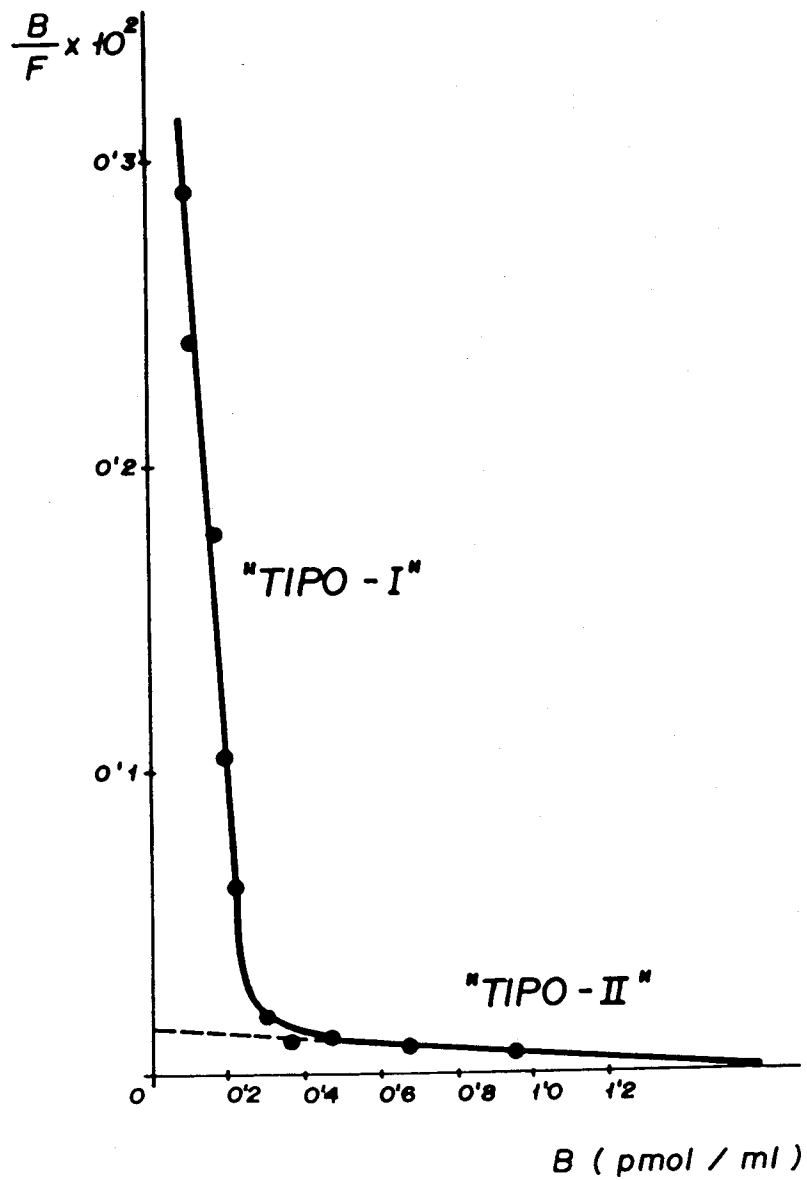


FIGURA. - 4.5

mo proteínas distintas de cuya existencia puedan extraerse conceptos extrapolables a la bioquímica celular primero y a la oncología clínica después.

Los razonamientos anteriores nos han inducido, en este trabajo, a elegir como rango de concentraciones de $17\beta E_2$, aquel que se ajustase mejor a la primera porción lineal de la transformación de Scatchard, ignorando, voluntariamente, la presencia del segundo receptor como, por otra parte, la degradación del receptor en función del tiempo (59), origina, a partir de las formas de alto peso molecular (octamérica y tetramérica), la forma molecular dímera y ésta proteína (receptor tipo II) no es susceptible de cuantificación en las condiciones experimentales en las que hemos realizado los ensayos, he aquí una explicación posible al descenso en la tasa de RE observada en el citosol del grupo B₂ respecto a los grupos B₁ o B₃. Esto quiere decir que aún en condiciones de congelación del citosol a -60°C, la degradación del receptor estrogénico hacia formas de más bajo peso molecular, ocasiona un descenso del número de sitios de enlace cuantificados en la muestra cuando, como procedimiento de análisis de los datos de enlace, se utiliza la transformación de Scatchard y se ajusta el nivel de concentración del $17\beta E_2$ al rango comprendido entre $2 \cdot 10^{-9} M$ y $3 \cdot 10^{-10} M$.

Hemos sometido también a crítica los métodos de tratamiento matemático de los datos de enlace -(enlace total y enlace no específico)- comparando los resultados que arroja la transformación de Scatchard con los que ofrece la aplicación de la ecuación doble recíproca de lineweaver-Burk. La tabla IV-7 recoge, resumidamente, los valores de la capacidad de enlace máxima (B_{Max}), en fmol/mg de proteína citosólica, y el coeficiente de correlación lineal (r) correspondiente al ajuste, por mínimos cuadrados, de los puntos experimentales a la ecuación:

$$\frac{1}{B} = \frac{Kd}{B_{Max}} \times \left(\frac{1}{f} + \frac{1}{B_{Max}} \right)$$

TABLA IV-7

Tratamiento de los datos de enlace de acuerdo con la transformación doble-recíproca.

Ensayo	Grupo B ₁	Grupo B ₂	Grupo B ₃	
I	B _{Max}	62	50	48
	r	0,988	0,974	0,974
II	B _{Max}	39	43	54
	r	0,954	0,970	0,975
III	B _{Max}	53	41	64
	r	0,989	0,971	0,981
IV	B _{Max}	48	34	49
	r	0,975	0,934	0,987
V	B _{Max}	62	39	58
	r	0,988	0,969	0,998

$$G_1 : \bar{B}_{Max} = 52,8 \quad 10 \text{ fmol/mg}$$

$$G_2 : \bar{B}_{Max} = 41,4 \quad 6 \text{ fmol/mg}$$

$$G_3 : \bar{B}_{Max} = 54,8 \quad 7 \text{ fmol/mg}$$

El análisis de estos datos es demostrativo de dos hechos:

1. El valor de la máxima capacidad de unión del estradiol al citosol puede ser deducido por uno u otro procedimiento y las diferencias encontradas, cuando el tratamiento de datos se hace por la transformación de Scatchard o por la de Lineweaver-Burk, carecen de significación estadística.

2. No obstante lo anterior, el coeficiente de correlación encontrado al aplicar el segundo procedimiento es más alto - que el que resulta de ajustar los puntos experimentales a la ecuación de Scatchard y, efectivamente, estas diferencias en lo que al valor medio de los coeficientes de correlación encontrados se refiere, son estadísticamente significativas - (Tabla IV-8).

TABLA IV-8

Coeficiente de correlación medios.

	<u>Scatchard</u>	<u>Doble-recíproca</u>
B_1	$\bar{M} : 0,924$ DS : 0,037	$\bar{M} : 0,979$ DS : 0,015
B_2	$\bar{M} : 0,912$ DS : 0,043	$\bar{M} : 0,964$ DS : 0,017
B_3	$\bar{M} : 0,933$ DS : 0,038	$\bar{M} : 0,983$ DS : 0,010

Comparaciones estadísticas (test de Cochran):

Grupo B_1 : $t_{exp} = 3,06$; $p = 0,02$
 Grupo B_2 : $t_{exp} = 2,52$; $p = 0,05$
 Grupo B_3 : $t_{exp} = 2,85$; $p = 0,05$

Los anteriores resultados ponen de manifiesto que si bien el procedimiento de Scatchard es el más ampliamente utilizado en el estudio de la capacidad de enlace de una hormona a su receptor específico, no es el modelo matemático que mejor se aproxima a los datos experimentales como, por otra parte, ha sido ya comunicado por distintos autores (113).

Los coeficientes de variación inter-ensayo, tanto para el parámetro B_{Max} como para la Kd del proceso (Tabla IV-9),

TABLA IV-9
=====

Coeficientes de variación inter-ensayo

B_{Max}	Kd
$\bar{M}=51$ fmol/ml	$\bar{M}:5,8 \cdot 10^{-10}$ M/l
DS=11	DS: $2,1 \cdot 10^{-10}$
CV=22%	CV=35,4

no difieren de los encontrados por otros autores y confirman los problemas de reproductibilidad y, por tanto de precisión que afectan al método de ensayo.

Al analizar, por último, los resultados de cuantificación de receptores estrogénicos en el citosol A, encontramos que para ese rango de concentración (230 fmol/mg) el coeficiente de variación intraensayo es óptimo (CV = 6%, tabla IV-5) y que, aproximadamente, los valores de B_{Max} en los citoso

les B_1 y B_3 , resultan ser la cuarta parte del nivel de RE encontrado en A. Hemos de hacer notar que las modificaciones en la constante de disociación, cuando la muestra de citosol se diluye: $4,3 \cdot 10^{-10}$ M/l para citosol A y $6,2$ y $6,9 \cdot 10^{-10}$ M/l para citosol B_1 y B_3 están de acuerdo con la correlación inversa entre Kd y concentración de proteínas citosólicas descrita por Poulsen (190). En efecto, la comparación estadística entre los grupos A - B_1 y A - B_3 demuestran que el valor medio de la Kd encontrada para el citosol diluido es más alto, -y esta diferencia es estadísticamente cierta- que el valor de este mismo parámetro encontrado en citosol A (no diluido).

Por otra parte en el citosol B_2 la degradación de la macromolécula hacia formas de más bajo peso molecular dotadas de menor afinidad por el $17\beta E_2$, interfiere, a través de un mecanismo distinto al de dilución, con la constante de asociación/disociación del complejo R-E. Sabemos en efecto, que los receptores de estrógenos y, presumiblemente, otras macromoléculas receptoras para hormonas esteroideas, son susceptibles de degradación por las proteasas endógenas durante los procesos de manipulación del trozo de tejido (almacenamiento, obtención del citosol, incubación con el $17\beta E_2$ - 3H , etc). Ello conduce a la presencia de heterogeneidad en las formas moleculares de la proteína citosólica que dificulta de manera importante las aplicaciones básicas y clínicas derivadas de su determinación. La forma molecular más pequeña identificada por ultracentrifugación en gradiente de densidad (coeficiente de sedimentación 3S), denominada meroreceptor por Sherman (207), debe corresponder con la forma monomérica de la proteína estrofilina identificada por Expósito y col (59). Esta forma molecular predomina cuando el ensayo se realiza en condiciones en las que la acción de los enzimas proteolíticos endógenos resulta favorecida (ausencia de inhibidores enzimáticos, largo tiempo de incubación y alta fuerza iónica del medio) y presenta menor afinidad por el $17\beta E_2$. Otras formas moleculares,

probablemente péptidos fragmentarios de esta cadena elemental de la proteína, que conservan el sitio de unión para el estradiol pero cuya afinidad es muy baja (peso molecular aparente 19.000 y 20.000 dalton), pueden ser identificadas por técnicas de gel filtración (59). Es evidente que en las condiciones bajo las cuales se ha realizado, en este trabajo el ensayo RE, la influencia de las moléculas descritas sobre la constante de disociación encontrada, es (o puede ser considerada) mínima y, por ello, el valor obtenido para K_d debe, predominantemente, corresponder al proceso de enlace del $17\beta E_2$ con el receptor tipo I.

Así, la degradación del receptor por un lado y la dilución del citosol junto con la modificación consiguiente del equilibrio entre formas moleculares, por otro, parecen ser los factores explicativos de las diferencias existentes entre los valores medios de la constante de disociación encontrada para el enlace Estradiol-Receptor en el citosol A, respecto a la que resulta de los ensayos realizados sobre citosol B₂.

4.3. CINETICA DE LA CAPTACION INTRACELULAR DEL ESTRADIOL

La figura 4.6 refleja la evolución en el tiempo de los niveles de $17\beta E_2$ -³H enlazados específicamente al receptor estrogénico, utilizando como material biológico células intactas de útero de conejo. Las experiencias llevadas a cabo a dos temperaturas diferentes (0° y 37°C), sobre la misma suspensión celular ponen de manifiesto la existencia de un proceso de captación específica muy rápido que alcanza su valor máximo a los 20 minutos para $T = 37^\circ C$ y a los 10 minutos para $T = 0^\circ C$. A partir de este instante, la cantidad de hormona marcada enlazada a la proteína receptora, desciende con rapidez sorprendente cuando nuestros resultados se comparan con -

EVOLUCION DE LOS ENLACES ESPECIFICOS DE
 $17\beta E_2 - ^3H$ EN CELULAS UTERINAS EN FUNCION
DEL TIEMPO.

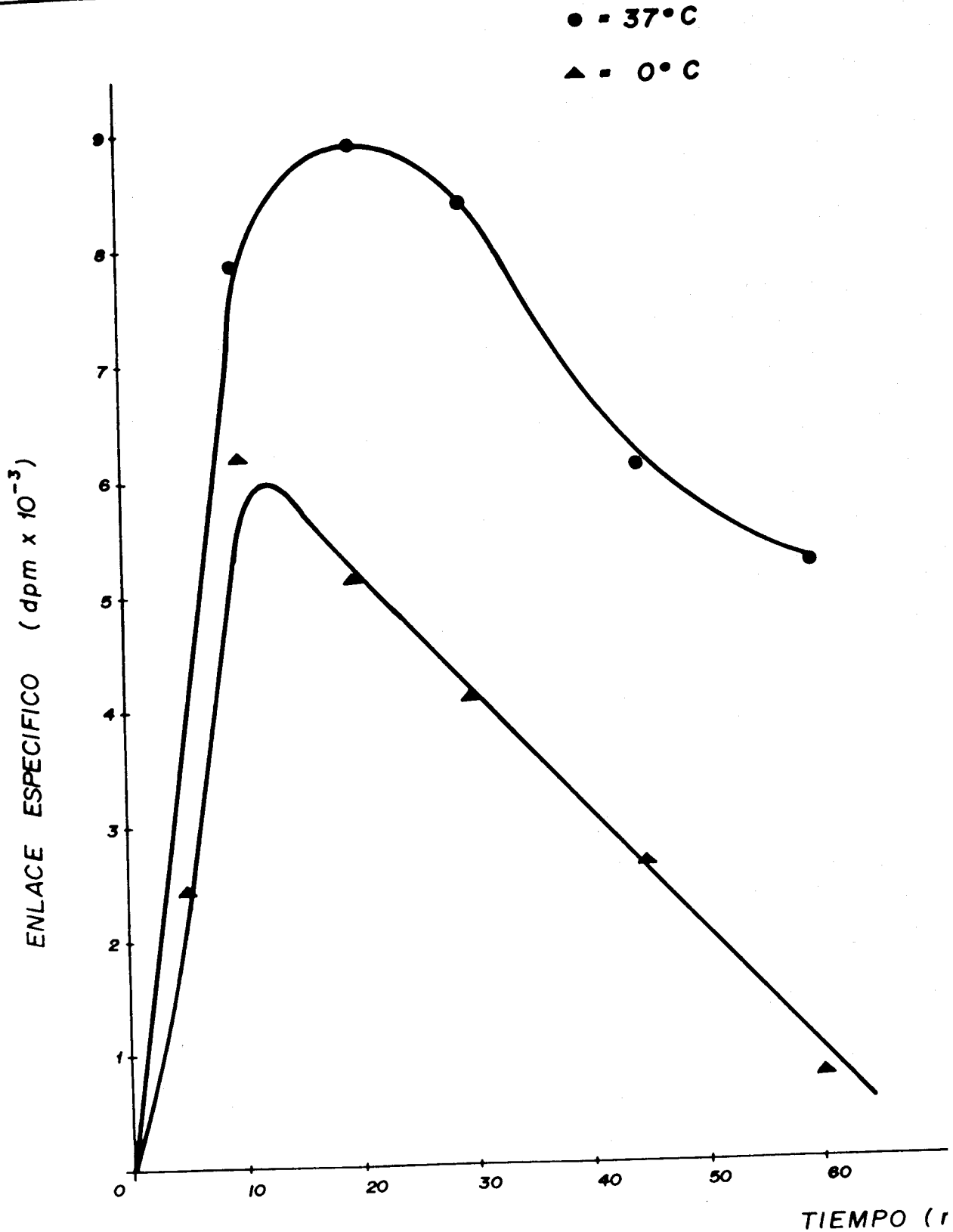


FIGURA. - 4.6

los encontrados por Müller y Wotiz (173) en células de útero de rata. En efecto, de los resultados de estos autores (173) se deduce que si bien el fenómeno que podía denominarse como de "pérdida" del receptor tiene una existencia real, la proporción de esta pérdida es del orden del 17% por hora, cifra claramente inferior a la encontrada por nosotros ($\sim 40\%$ en 40 minutos a la temperatura de $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ y cercano al 90% en 50 minutos para la experiencia realizada a 0°C). El decrecimiento de la capacidad de enlace de las células para el estrógeno, no puede ser achacado, exclusivamente, a pérdidas en la viabilidad celular, puesto que el ensayo con azul tripan, realizado antes y después de la incubación con $17\beta\text{E}_2$, demuestra que la viabilidad de las células a 0°C no se modifica, aunque a la temperatura de $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ y en ausencia de condiciones de esterilidad la muerte celular y la inactivación consiguiente del receptor, pueda explicar parcialmente este hecho.

Por otra parte Horwitz Y McGuire (93,94,95, 96) han descrito un descenso de la capacidad de enlace para el $17\beta\text{E}_2$ por las células MCF-7 (línea celular de cáncer de mama hormono-dependiente) que resulta ser función del tiempo y que, al cabo de 3-5 horas de exposición al estradiol, reduce en un 70% el número de sitios de enlace posibles. Este fenómeno que no se acompaña de una reaparición del receptor en el citoplasma ha sido denominada "Processing". La "transformación" del receptor llega a ser completa en, aproximadamente, 5 horas al cabo de las cuales, se alcanza un nuevo estado de equilibrio para la concentración del receptor. Este acontecimiento intracelular que sigue a la asociación de los esteroides con las proteínas receptoras. carece hoy día de explicación. De acuerdo con la hipótesis de Kasid (111) la magnitud de la pérdida del receptor no es un pre-requisito para la acción hormonal del estradiol, al menos en lo que a inducción del receptor de progesterona se refiere. Se ha sugerido incluso (150) que el proceso de transformación se acompaña de una pérdida real del

estrógeno enlazado en los locus menos específicos, hecho que podría ser compatible con los enlaces de baja afinidad entre el $17\beta E_2$ y el receptor tipo II o con los enlaces entre el estrógeno y determinadas estructuras subcelulares tales como la membrana nuclear, la cromatina o el DNA. Por otra parte la magnitud de la pérdida de enlaces resulta dependiente de variados factores entre los que se incluyen la "densidad" celular (Nº de células por unidad de volumen o de superficie) y la presencia o ausencia de insulina y medio condicionado por el crecimiento de células (150). Así, a baja densidad y en ausencia de estos factores, la magnitud de la pérdida de sitios de unión, oscila entre un 45 y un 72%, para la línea celular MCF-7 (111) cifra que resulta próxima a la encontrada por nosotros a la temperatura de 0°C. El hecho de que el "processing" ocurra, y quizás más intensamente, a baja temperatura apoya la hipótesis de Kasid (111) y contradice la teoría de McGuire (156) en virtud de la cual resultan dependientes del citado mecanismo, en pacientes afectos de cáncer de mama humano, tanto la estimulación estrogénica como los efectos antiestrogénicos.

Se ha postulado, también, que la "transformación" del receptor puede depender de la ruptura proteolítica de una parte de la macromolécula receptora con degradación del locus de unión para el estrógeno (156) y puesto que la concentración de receptor es determinante de la sensibilidad celular a los estrógenos y a los antiestrogénicos, las alteraciones que afecten a la velocidad de síntesis o degradación de estas especies proteicas, podrían modificar la respuesta celular a las hormonas estrogénicas. Se sabe, a este respecto, que la velocidad de síntesis y de degradación del receptor es muy elevada (255) y, por ello, su concentración intracelular, en equilibrio dinámico, puede ser rápidamente ajustada tras acciones que modifiquen, en uno u otro sentido, su nivel de concentración. El tiempo medio de degradación del RE en células MCF-7 resulta próximo a 4 horas (255), pero en presencia de estradiol, el tiempo necesario para reducir a la mitad la cantidad de RE pre

sente en la célula, se acorta significativamente ($t_{1/2} \approx 3$ horas) (225). Por el contrario, los antiestrógenos Nafoxidine y CI628, no afectan a la velocidad de degradación del receptor. La síntesis del RE es, así mismo rápida y se ha estimado que en células control la constante de velocidad del proceso es $0,48 \pm 0,10$ pmol/mg DNA.h (225). De esta manera, el acortamiento del $t_{1/2}$ de degradación del RE en presencia de $17\beta E_2$ puede ser relacionado con el "processing" de esta macromolécula. El rápido turnover intracelular del RE dota a la célula de un mecanismo mediante el cual los niveles de receptor y la sensibilidad celular a los estrógenos pueden ser rápida, y finamente ajustados. Una evidencia que apoya la afirmación anterior deriva del hecho de que cuando a las células se las cambia el medio nutriente para eliminar el estradiol y se las mantiene en cultivo, recuperan en breve plazo (4-6 días según datos de Horwitz (96)) el nivel de RE que poseían con anterioridad a la exposición al $17\beta E_2$.

Parece por ello que en los tejidos hormono dependientes entre concentración de E_2 y nivel de RE intracelulares, existe una relación inversa y que el estado de equilibrio para la proteína es dosis estradiol dependiente. Por último la proporción y la rapidez con que ocurre el fenómeno de "transformación o processing" del receptor, resulta también función de la propia naturaleza del material biológico utilizado para su estudio (223).

4.4. CINETICA DE ENTRADA DEL ESTRADIOL EN LA CELULA

Está generalmente aceptado que la entrada de los estrógenos en las células de los tejidos "blanco" ocurre por difusión pasiva y que el enlace al receptor intracelular específico es el primer acontecimiento que inicia la acción estrogénica. Sin embargo ciertas experiencias (171. 225) han sugerido la existencia de una proteína transportadora que interviene en el proceso de entrada intracelular del estradiol. Por otra parte, técnicas de inmunofluorescencia han demostrado la presencia de globulina enlazante de las hormonas sexuales (sex hormone binding globulin : SHBG) en tejidos del tracto reproductor y en células MCF-7 expuestas a la SHBG in vitro (14). Estos hallazgos han conducido a la idea de que las proteínas plasmáticas juegan algún papel en el transporte de estrógenos y otras hormonas esteroideas al interior de la célula. El carácter de proceso activo para este fenómeno es, no obstante, de difícil establecimiento y asunción.

En efecto, los esteroides se acumulan en el interior de las células muy rápidamente e, incluso a bajas temperaturas, la fase lineal de su captación dura sólo unos segundos (70) (193). Por ello, el diseño de experimentos adecuados para el estudio de la velocidad inicial del proceso presenta ciertas dificultades. Se conoce además, que el transporte de iones y de nutrientes, la función de los receptores de membrana y la actividad de las proteínas enzimáticas, resultan afectados por la fluidez de la capa lipídica de la membrana, la cual responde sensiblemente a los cambios de temperatura, (193). Ha surgido de aquí la hipótesis de que los procesos de transporte mediados por proteínas pueden ser comparados con las reacciones biológicas cuya energía de activación se sitúa entre 42 y 84 KJ/mol (193) y comoquiera que este tipo de transporte exhibe discontinuidad en la representación de Arrhenius se ha pensado

que experiencias realizadas a distintas temperaturas, pueden servir para diferenciar entre captación mediada y difusión simple.

Para investigar la naturaleza de este fenómeno hemos estudiado la velocidad de formación del complejo RE a distintas temperaturas (apartado 3.3.2) (Figura 4.7). Se supone que la formación del complejo RE no es factor limitante de la velocidad (174). Como aparece claramente reflejado en la figura 4.7 la incorporación intracelular del $^{17}E_2$ muestra una marcada dependencia respecto de la temperatura a la que se realiza el ensayo. La sustracción de los enlaces no específicos de la cantidad total de hormona radiactiva enlazada a la célula representa la actividad específicamente enlazada al receptor (figura 4.8). La pendiente inicial de esas curvas, deducida por aproximación de las diferencias ET-ENE a una línea recta entre los tiempos 0 y 60 segundos, representa la velocidad inicial del proceso de incorporación intracelular del estradiol (138). La tabla IV-10 recoge los parámetros del ajuste de los puntos experimentales a una recta para el intervalo de tiempo descrito y para cada una de las temperaturas ensayadas.

La representación de los logaritmos de las velocidades iniciales de la reacción en función de la inversa de la temperatura ($^{\circ}K^{-1}$), permite deducir la energía de activación del proceso (figura 5.9). El ajuste por mínimos cuadrados de los datos de la tabla IV-10 a la ecuación $K = A e^{-E_a/RT}$ ofrece el valor de los parámetros A (factor pre-exponencial o factor de Arrhenius) y E_a (Energía de activación), que, para la entrada del $^{17}E_2$ en las células uterinas de conejo han resultado ser $A = 20,8$ y $E_a = 9$ Kcal/mol.

El valor obtenido para E_a es equivalente al encontrado por otros autores utilizando, como modelo de tejido hormono dependiente, células aisladas de útero de rata (144,174) y citosol de útero de rata (174, 179)- es indicativo de que la entr

CINETICA DE ENTRADA DEL ESTRADIOL EN LAS CELULAS UTERINAS. EFECTO DE LA TEMPERATURA.

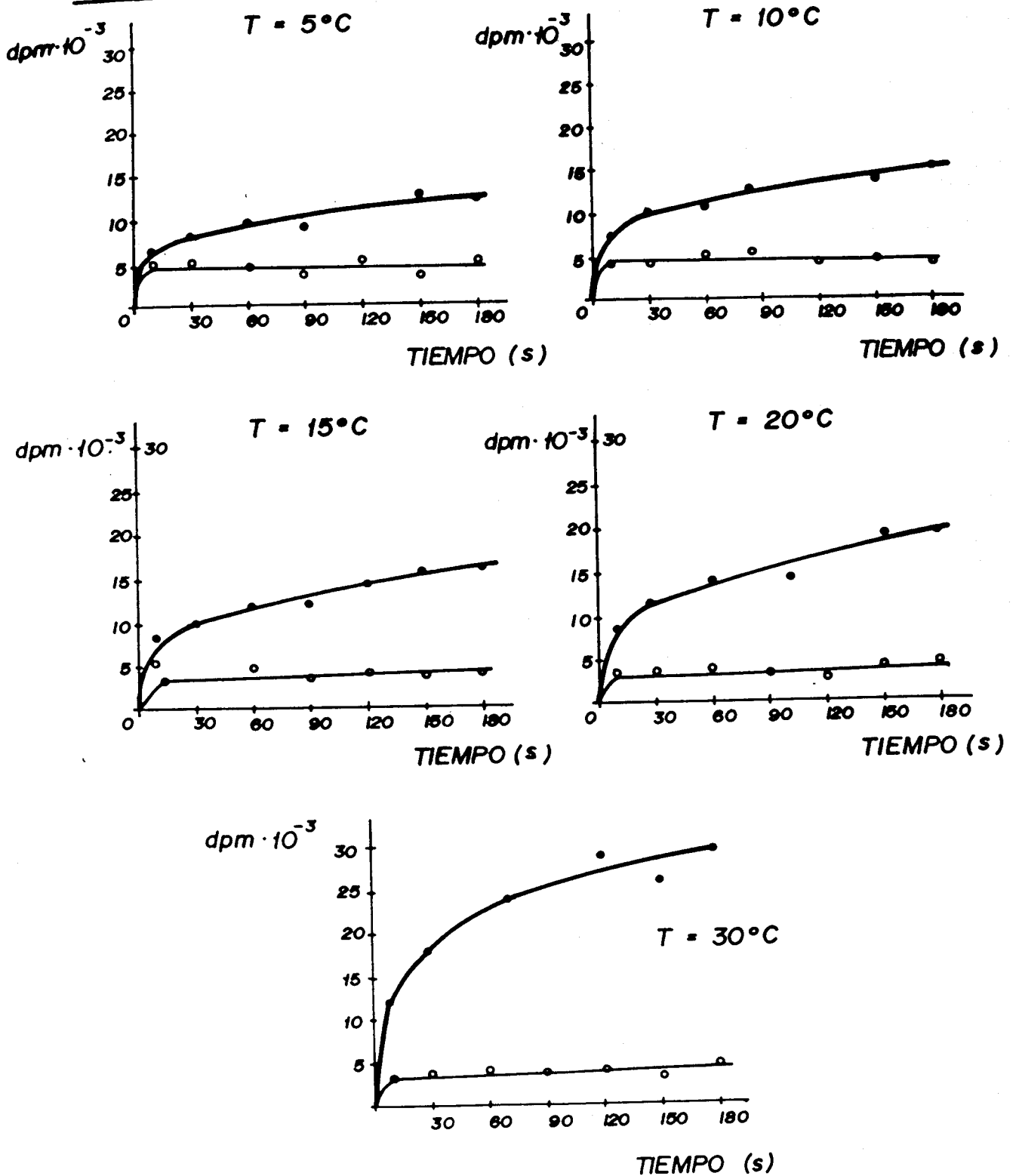


FIGURA. - 4.7

CINETICA DE LA CAPTACION ESPECIFICA DEL
 $17\beta E_2$. EFECTO DE LA TEMPERATURA.

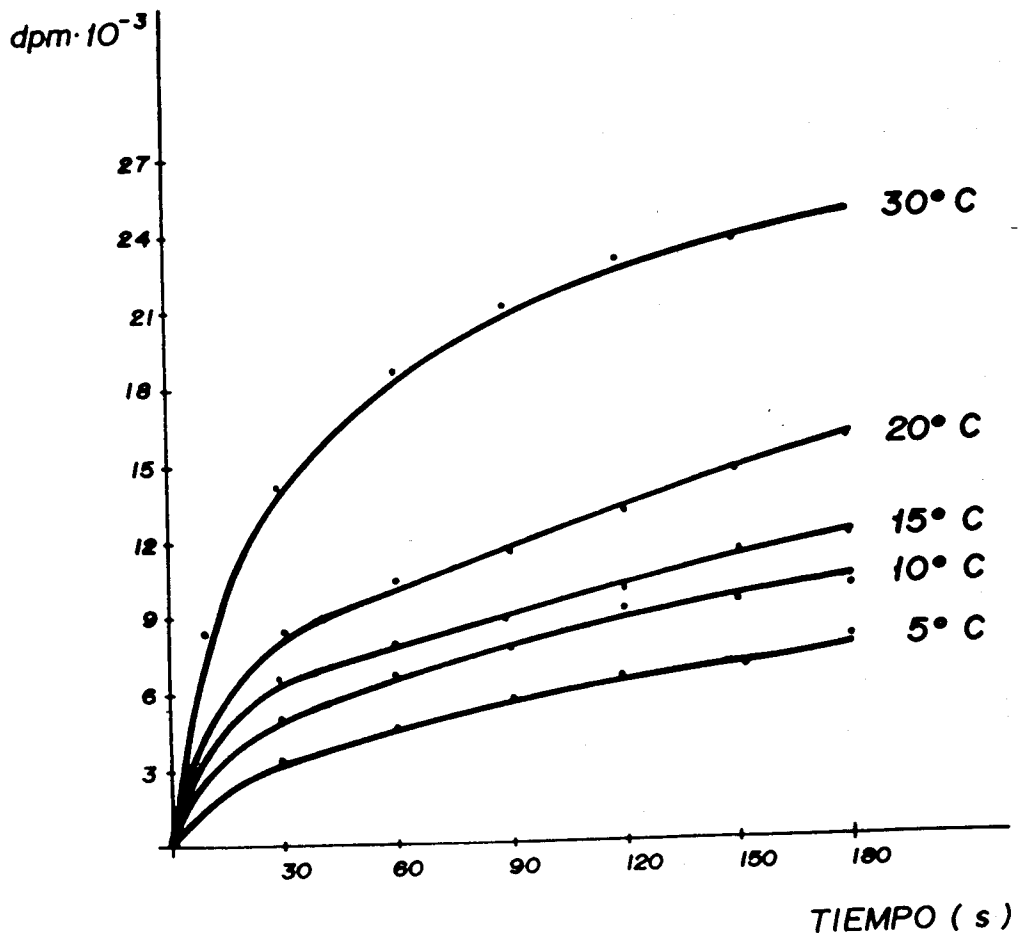


FIGURA. - 4.8

REPRESENTACION DE ARRHENIUS PARA LA ENTRADA DE $17\beta E_2$ EN LA CELULA.

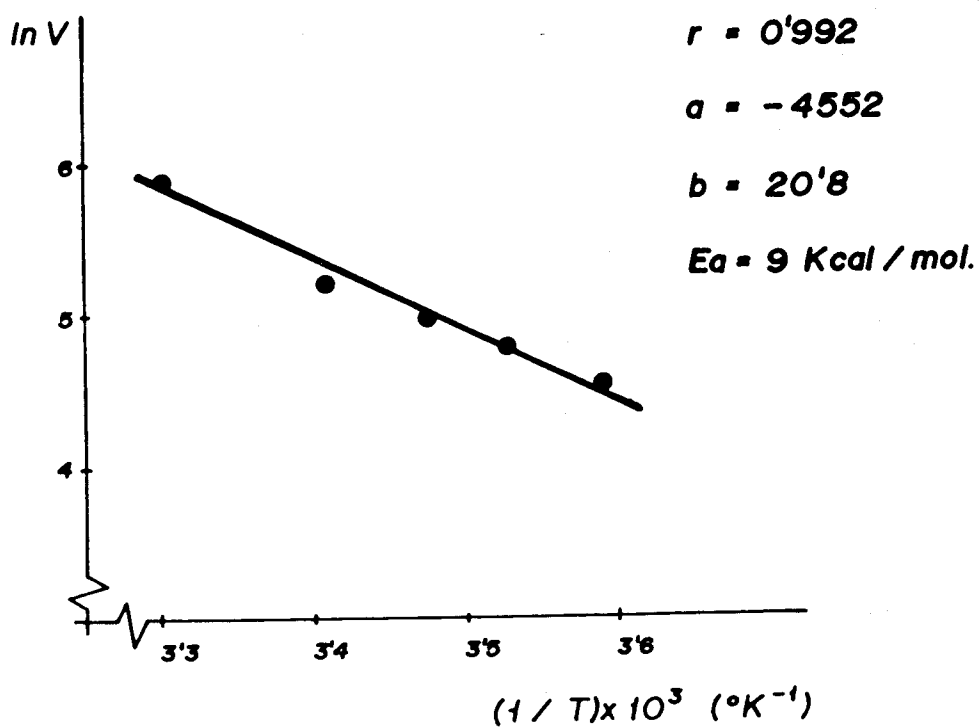


FIGURA. - 4.9

TABLA IV-10

Parámetros del ajuste de la porción lineal de la entrada intracelular del estradiol.

T	a	b	r
5°C	93,0	510	0,986
10°C	120,0	1.308	0,994
15°C	143,4	2.118	0,994
20°C	186,0	2.640	0,996
30°C	354,6	3.804	0,991

da del estradiol a la célula, tiene lugar por difusión pasiva - lo que quiere decir que no existe ninguna proteína o receptor - de membrana involucrado en el proceso de transporte. A esta mis ma conclusión se puede llegar de una manera aproximada, al ob-- servar la linealidad del ajuste de los puntos experimentales a la ecuación de Arrhenius (193). La energía necesaria para que - las moléculas de la hormona estrogénica penetren en la célula, es tan baja que puede ser suministrada por el "ambiente" en el que el proceso de transferencia se realiza. La membrana no regu-- la, por ello, la captación intracelular del estradiol. Muy re-- cientemente De Ryck y col (51) utilizando una complicada meto-- dología, demuestran también que tanto el estradiol como la es-- trona, penetran en células HEC-50 (derivadas de un adenocarcino-- ma de endometrio (219)) mediante un proceso de difusión simple.

Un análisis más detenido de las figuras 4.7 y 4.8 pone de manifiesto que tran un periodo de crecimiento rápido de la acti-- vidad específicamente enlazada en el interior de la célula, la velocidad de captación intracelular del estradiol disminuye y -

los puntos experimentales parecen aproximarse, a partir de los primeros 60 segundos, a una línea recta. Este fenómeno podría indicar que la velocidad de incorporación de la hormona marcada, resulta limitada por un segundo fenómeno distinto al de di fusión. Este segundo proceso sólo puede, evidentemente, ser la formación del complejo R-E que parece mostrar una cinética de orden cero respecto al tiempo (la velocidad de formación de RE es independiente del tiempo para el nivel de concentración de estrógeno utilizado en este trabajo). Si la velocidad de formación del RE es constante, la representación de los logaritmos de la pendiente de cada una de las rectas representativas de - la cinética, en función de la inversa de la temperatura absoluta (ley de Arrhenius) nos permitirá deducir el valor de la - - energía de activación del proceso de enlace entre el estradiol y la macromolécula receptora. Los datos del ajuste estadístico a una línea recta de los puntos finales correspondientes al enlace específico encontrado para cada valor de t (periodo de - tiempo comprendido entre 60 y 180 segundos) se recojen en la - tabla IV-11.

La representación del logaritmo neperiano de la constante de velocidad (pendiente) respecto a la inversa de la temperatura absoluta (figura 5.10) permite el cálculo de la energía de activación necesaria para que el proceso de enlace entre el estradiol y el receptor tenga lugar. Los parámetros encontrados para la ecuación de Arrhenius son:

$$A = 12,59; E_a = 5,2 \text{ Kcal/mol}$$

y, nuevamente, el valor de la energía de activación necesaria para que el enlace entre el receptor y el estradiol tenga lugar, demuestra que el proceso ocurre sin que medie ningún mecanismo enzimático que requiera aporte energético.

Podemos, ahora, descomponer la primera porción de la curva experimental para deducir el componente de velocidad que rere

REPRESENTACION DE ARRHENIUS DE LA VELOCIDAD DE FORMACION DEL COMPLEJO RE.

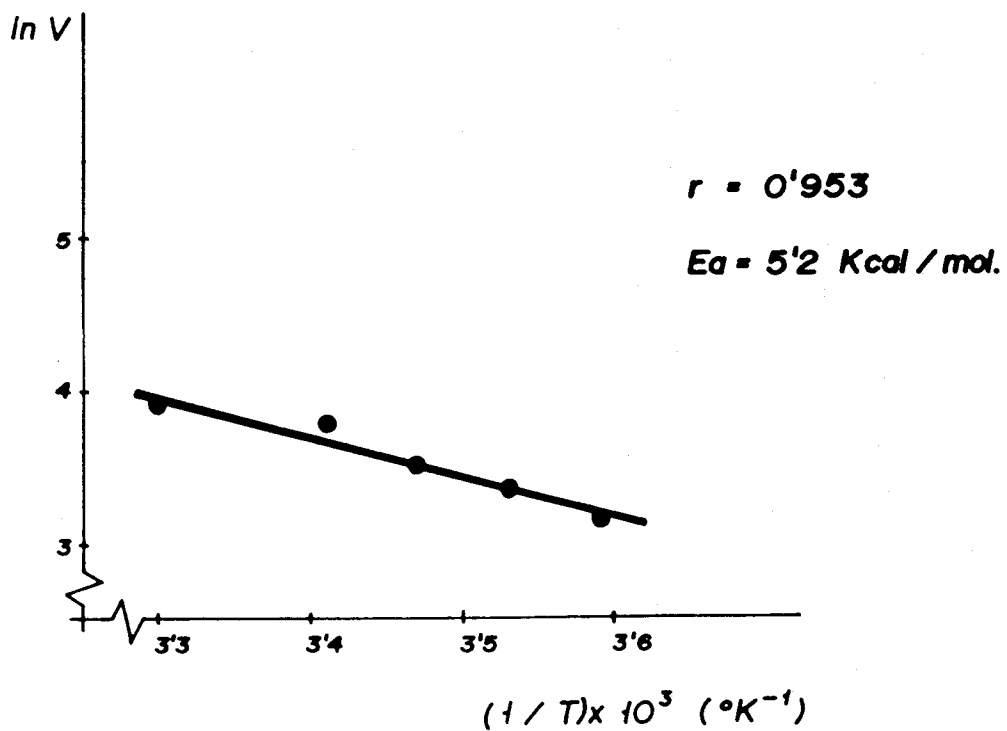
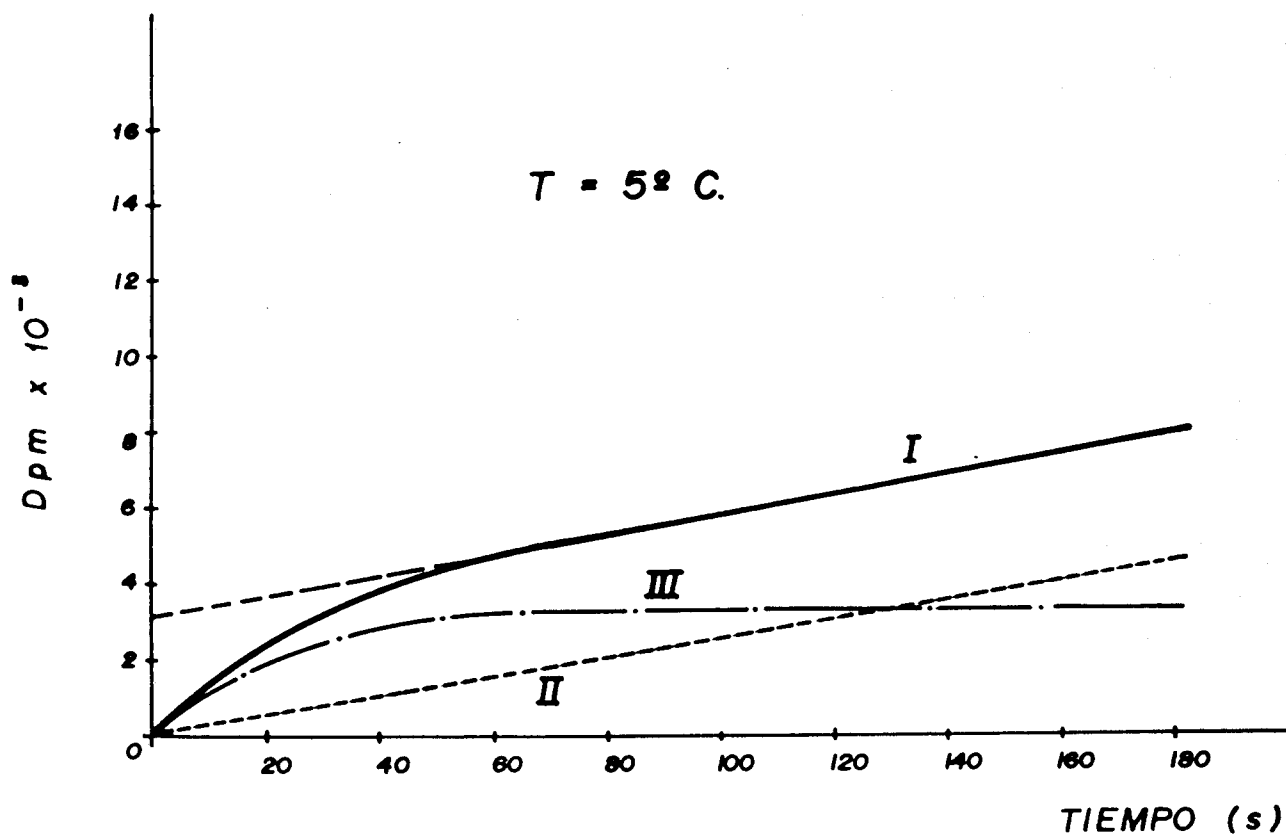


FIGURA. - 4.10

COMPONENTES DE LA CAPTACION ESPECIFICA DE $17\beta E_2$ POR LA CELULA UTERINA.



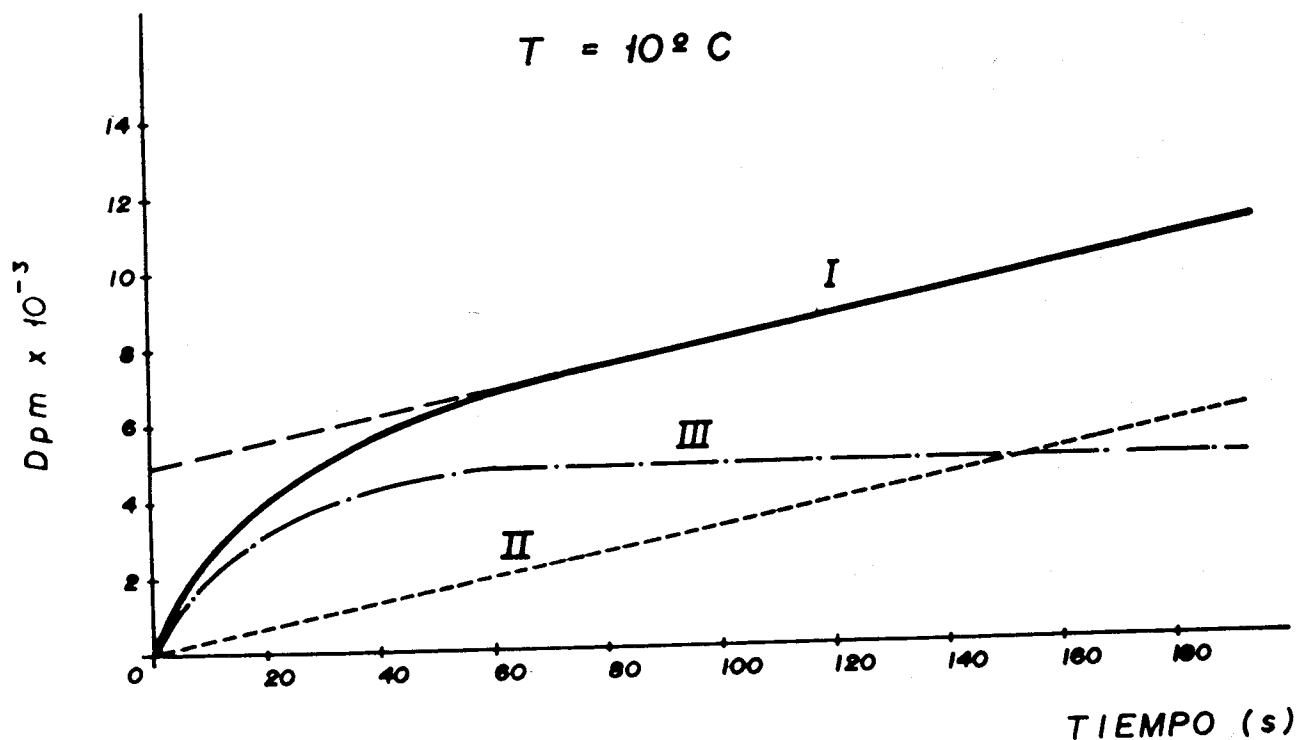
I . - CURVA EXPERIMENTAL

II . - FORMACION DEL COMPLEJO R - E

III . - DIFUSION DEL $17\beta E_2$

FIGURA. - 4 . 11

COMPONENTES DE LA CAPTACION ESPECIFICA DEL
 $17\beta E_2$ POR LA CELULA UTERINA.



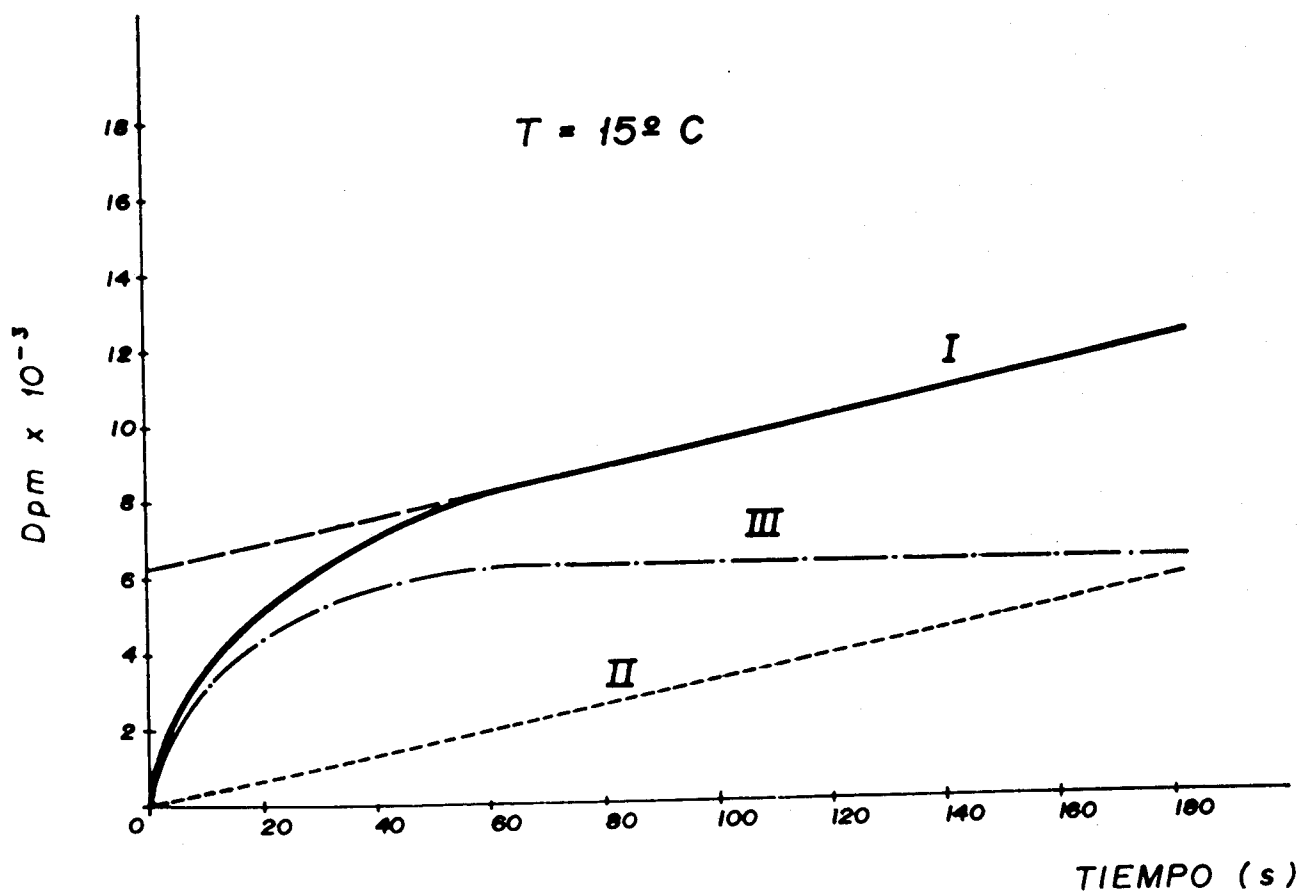
I . - CURVA EXPERIMENTAL

II . - FORMACION DEL COMPLEJO R - E

III . - DIFUSION DEL $17\beta E_2$

FIGURA. - 4.12

COMPONENTES DE LA CAPTACION ESPECIFICA DE
 $17\beta E_2$ POR LA CELULA UTERINA.



I . - CURVA EXPERIMENTAL

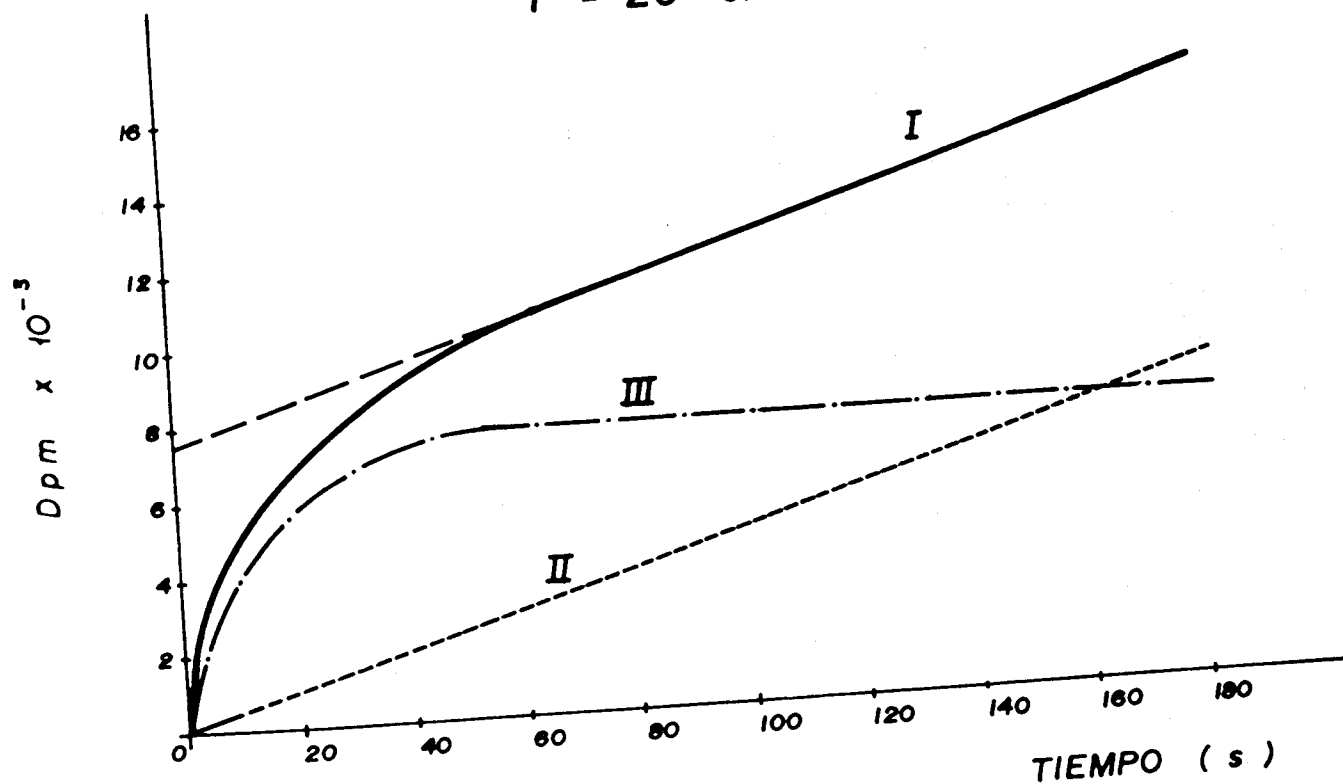
II . - FORMACION DEL COMPLEJO R - E

III . - DIFUSION DEL $17\beta E_2$

FIGURA. - 4. 13

COMPONENTES DE LA CAPTACION ESPECIFICA DEL
 $17\beta E_2$ POR LA CELULA UTERINA.

T = 20°C.



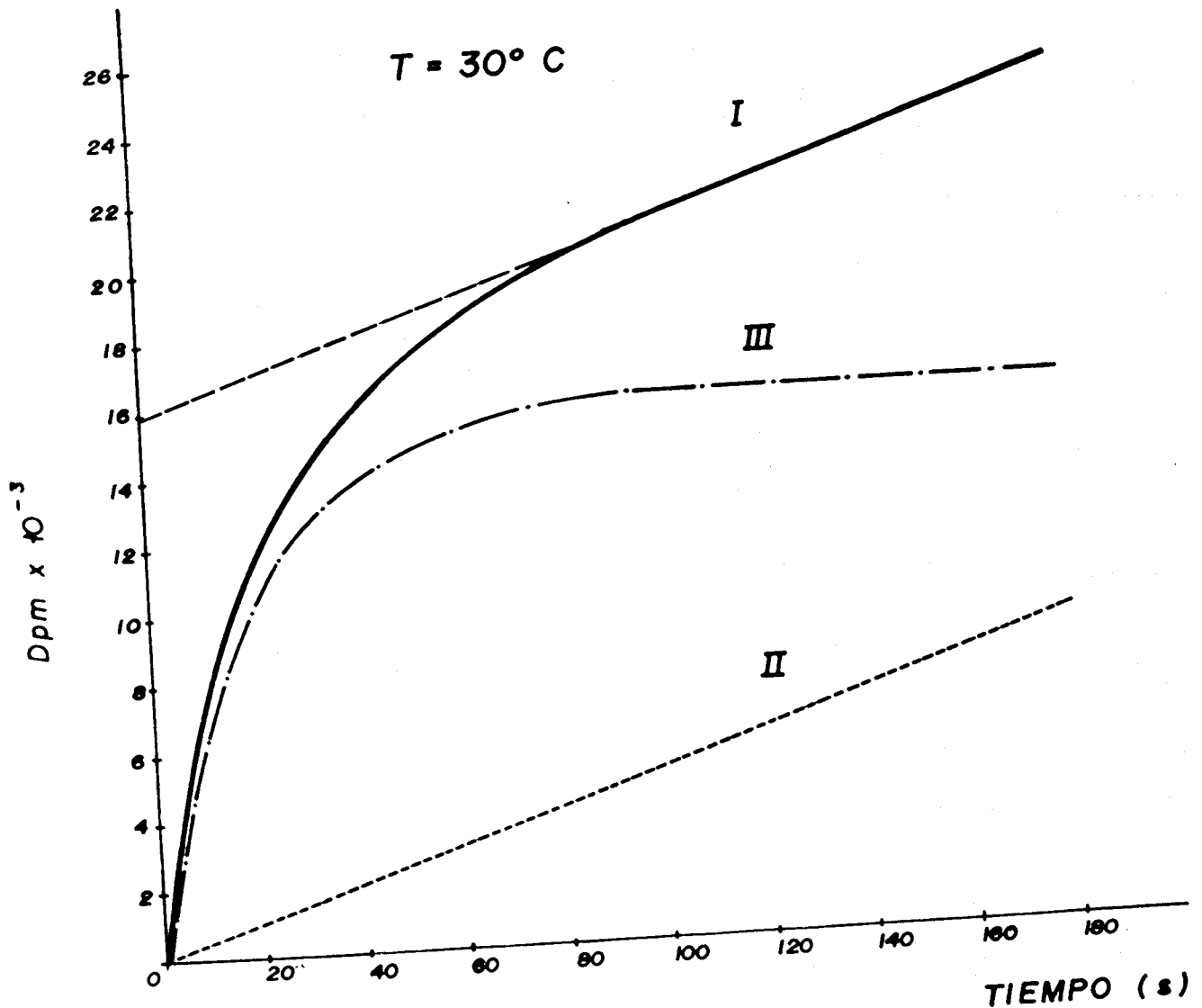
I . - CURVA EXPERIMENTAL

II . - FORMACION DEL COMPLEJO R - E

III . - DIFUSION DEL $17\beta E_2$

FIGURA. - 4 . 14

COMPONENTES DE LA CAPTACION ESPECIFICA DEL
 $17\beta E_2$ POR LA CELULA UTERINA.



- I . - CURVA EXPERIMENTAL
- II . - FORMACION DEL COMPLEJO R - E
- III . - DIFUSION DEL $17\beta E_2$

FIGURA. - 4.15

de acontecimientos bioquímicos, uno de los cuales es el que conduce a la formación del R-E, ésta situación no resulta observable a causa del continuo desplazamiento de las moléculas difundidas al espacio intracelular hacia la formación del complejo y la perturbación consiguiente del estado de equilibrio de la difusión pasiva del estrógeno tritiado. Sin embargo, mediante la descomposición de la curva experimental en dos componentes, es posible aproximarse al conocimiento del fenómeno considerado. Las constantes de equilibrio del reparto de estradiol entre la disolución y las células pueden ser fácilmente deducidas teniendo en cuenta la actividad específicamente enlazada y la actividad total puesta. Así para cada temperatura los valores de la K de equilibrio son (Tabla IV-12) y la re

=====
 TABLA IV-12
 =====

Constantes de equilibrio de la distribución intra y extracelular del $17\beta E_2$.

T	K
5	0,0280
10	0,0401
15	0,0531
20	0,0647
30	0,1468

presentación gráfica del logaritmo neperiano de K en función de la inversa de la temperatura absoluta demuestra que la entalpía del proceso permanece constante para el rango de temperaturas estudiado (figura 4.16). La difusión intracelular del

VARIACION DE K_{eq} EN FUNCION DE LA TEMPERATURA.

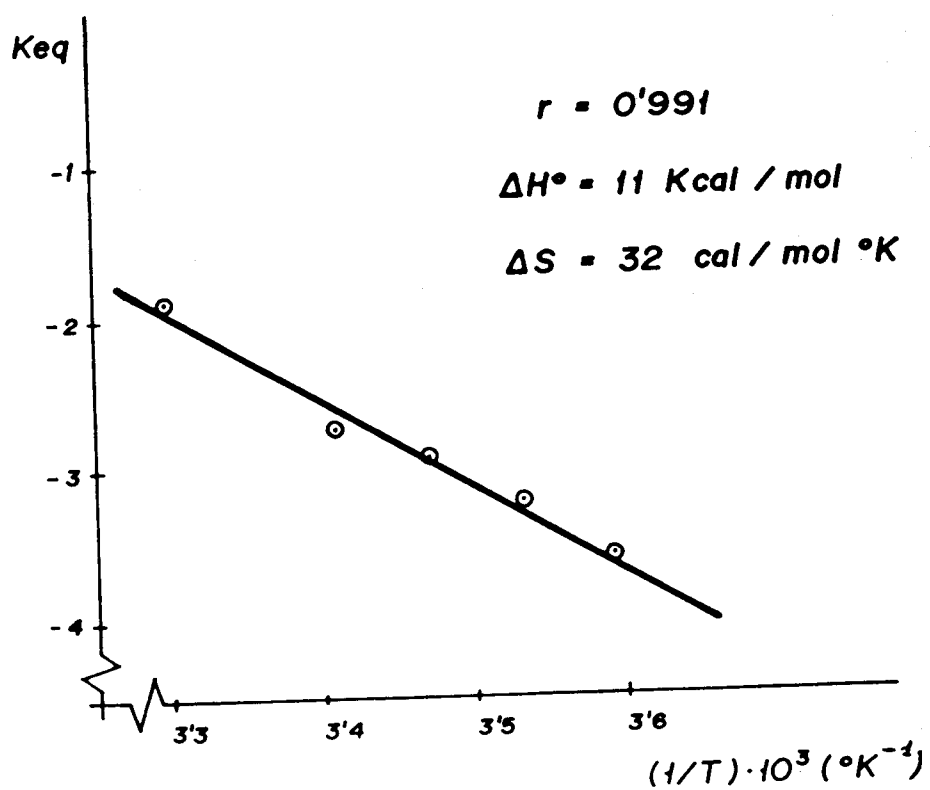


FIGURA. - 4 . 16

estradiol resulta ser, en consecuencia, un proceso endotérmico ($\Delta H = 11 \text{ Kcal/mol}$ y ΔS es igual a $32 \text{ cal/mol}^\circ\text{k}$) cuya velocidad crece con el aumento de la temperatura.

El estudio cinético del proceso de incorporación del $^{17}\beta\text{E}_2\text{-}^3\text{H}$ al interior de la célula uterina en función de la concentración de estradiol (figura 4.17) realizado en condiciones experimentales de presencia y ausencia de exceso de $^{17}\beta\text{E}_2$ frío nos ha permitido conocer como le influye la concentración de la hormona sobre la velocidad de captación específica del estradiol (fig. 4.18). El análisis de esta representación gráfica pone de manifiesto que a partir de cierto tiempo (~ 60 segundos en nuestras experiencias), la cantidad de hormona marcada crece linealmente con el tiempo (cinética de orden cero respecto al tiempo) y, además, que la pendiente de la porción lineal de las curvas representadas no muestra diferencias significativas cuando se comparan entre sí unas frente a otras. Parece pues que la velocidad de reacción, una vez que esta alcanza su valor máximo, es independiente de la concentración de sustrato, fenómeno que ocurre, por ejemplo, en las reacciones catalizadas enzimáticamente. De ello se deduce que el orden de reacción respecto a la concentración coincide con el orden de reacción respecto al tiempo, y, por ello podemos excluir que en la molécula receptora de estrógenos existan distintos sitios de enlace para el estradiol y que la ocupación de alguno de ellos facilite la entrada del sustrato a otros locus aceptores. No existe, por tanto, cooperatividad en el proceso de enlace R-E al menos para el rango de concentraciones estudiado por nosotros.

La representación de la figura 5.18 sugiere, por otra parte, la existencia de cierto grado de saturabilidad del enlace. Para investigar este fenómeno hemos acudido a la representación de la cantidad de $^{17}\beta\text{E}_2$ específicamente enlazada a la célula en función de la concentración de estradiol puesta en el ensayo para $t = 120 \text{ s}$. La Figura 4.19.a demuestra claramente

te que la existencia de este fenómeno de saturación es manifiesta incluso para tiempos de incubación tan precoces.

De ello podemos concluir que si bien la permeabilidad de la membrana celular al estradiol no limita la incorporación de E_2 , -en su fase inicial las curvas de captación muestran pendientes claramente diferentes- una vez alcanzado cierto nivel de E_2 en el interior de la célula, la velocidad de formación del complejo R-E resulta limitada por, quizás, la concentración de, - proteína receptora. La realidad de este fenómeno puede ser sometida a estudio acudiendo, por vía de la representación de Scatchard (fig. 4.19.b) al cálculo de la capacidad de enlace máxima en función de la concentración de sustrato puesta en la reacción y utilizando este dato ($B_{Max} = 12.300$ dpm enlazadas específicamente) confirmar que los sitios de enlace para el estradiol en la estrofilina, son equivalentes en el orden del comportamiento biológico. En efecto, representación del $\log \frac{B/B_{Max}}{1-B/B_{Max}}$ en

función del $\log F$ (representación de Hill) es perfectamente lineal y ofrece como número de Hill el valor de 0,98 ($n_H = 0,98 \approx 1$) con lo que queda demostrada la ausencia de procesos de cooperatividad positiva o negativa para la reacción de enlace en su primera fase (figura 4.19.c).

CINETICA DE LA CAPTACION INTRACELULAR DEL $^{17}\beta E_2$. EFECTO DE LA CONCENTRACION DE SUTRATO.

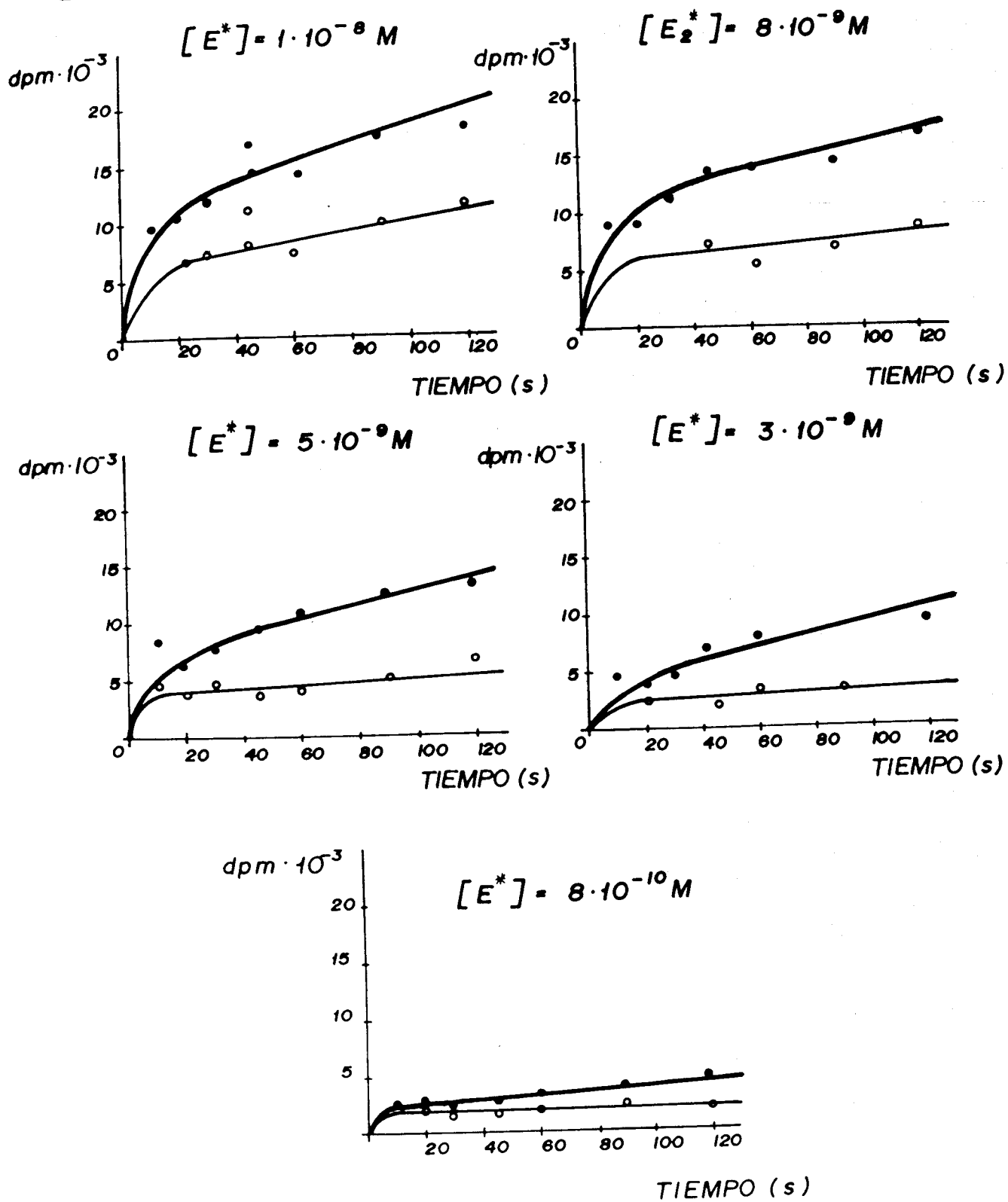
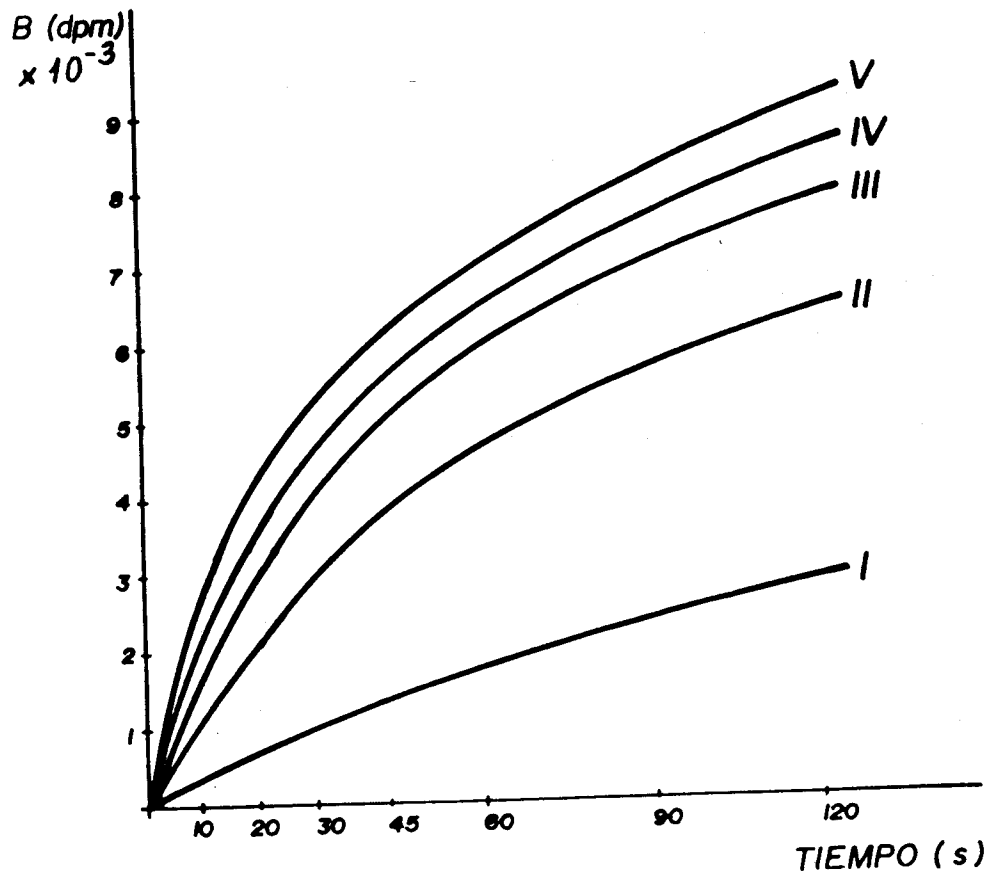


FIGURA. - 4.17

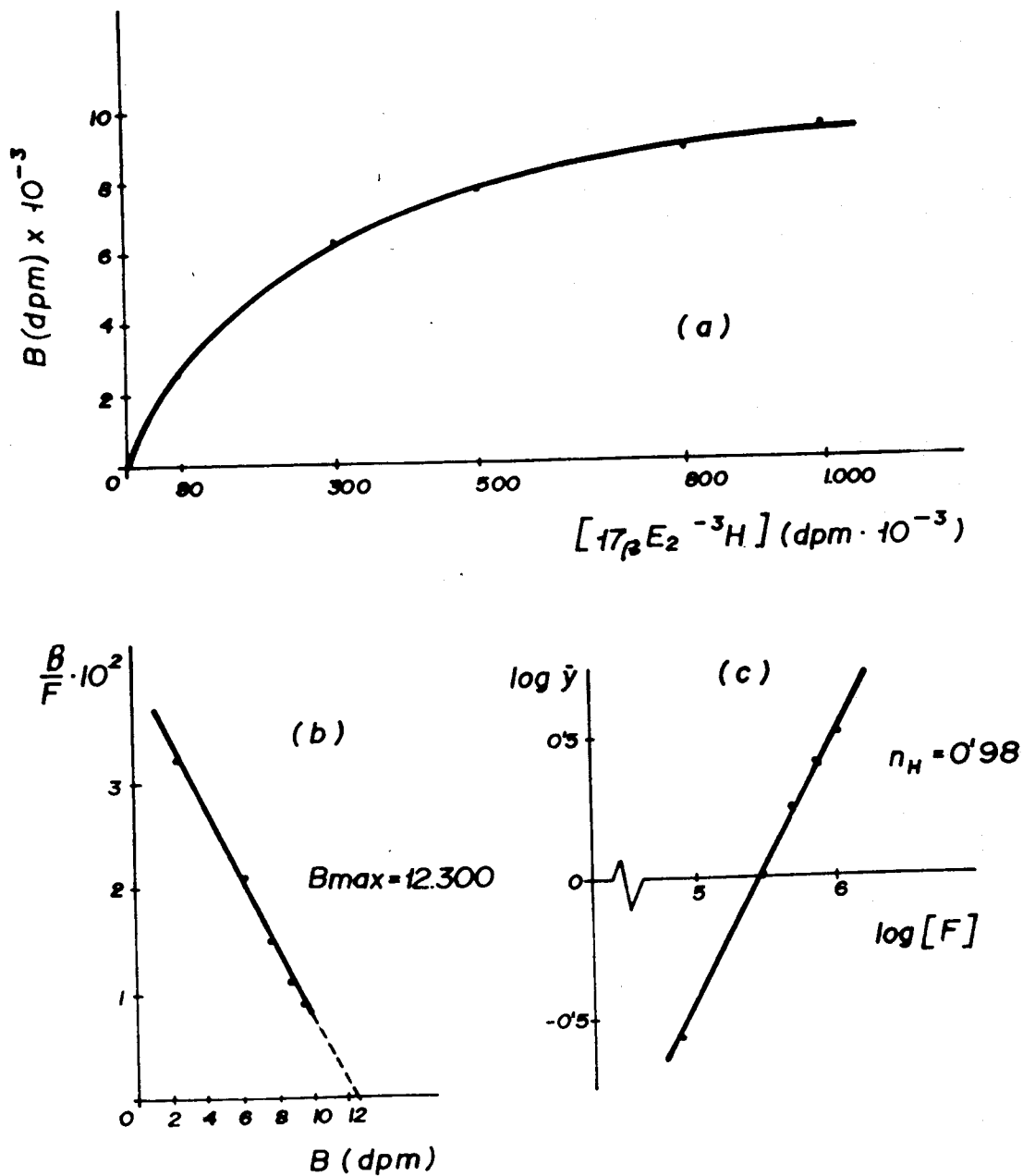
CAPTACION INTRACELULAR ESPECIFICA DEL
 $17\beta E_2$.



$[17\beta E_2 - ^3H]$: I = $8 \cdot 10^{-10} M$; II = $3 \cdot 10^{-9} M$;
III = $5 \cdot 10^{-9} M$; IV = $8 \cdot 10^{-9} M$ y V = $10^{-8} M$.

FIGURA. - 4.18

TRATAMIENTO DE LOS DATOS DE ENLACE R-E



a. - CURVA DE SATURACION

b. - TRANSFORMACION DE SCATCHARD

c. - TRANSFORMACION DE HILL

4.5. EL ENSAYO DE RE EN CELULAS INTACTAS

4.5.1. Linealidad de la Captación de $17\beta E_2$

La captación de $17\beta E_2$ por las células uterinas tanto en situación de presencia como de ausencia de competidor frío, es función lineal del número de células puesto en el ensayo (figura 4.20). En condiciones estandar, 37°C y 20 minutos para la temperatura y el tiempo de incubación, es posible cuantificar receptores estrogénicos en células intactas utilizando, como mínimo, un número de células próximo a 10^5 elementos/tubo. La proporcionalidad entre captación específica de $17\beta E_2$ y R-5020 y número de células MCF-7 en cultivo, ha sido descrita por Olea y col (180) estableciendo también que el ensayo WCA puede llevarse a cabo sobre cultivos celulares en condiciones de baja, media o alta densidad celular.

4.5.2. Degradación del Receptor

La cuantificación de receptores estrogénicos en citosol se efectúa normalmente en un medio tamponado a pH = 7,4 que incluye Ditiotreitól (DTT) en su composición. Los efectos del pH y de la adición de DTT han sido investigados por Rice y col (196). El valor de la tasa de RE en citosol disminuye con el tiempo de almacenamiento a 4°C y el máximo descenso ($\sim 50\%$ respecto al valor inicial) tiene lugar para periodos de tiempo inferiores a 48 horas cuando el pH del citosol se ajusta a 6 unidades. Cuando el medio tiene carácter básico (pH = 8,8) y en presencia de DTT la estabilidad del receptor aumenta considerablemente de forma que la degradación se reduce, aproximadamente, en un 20% al cabo de 15 días (174). La ausencia de DTT favorece la degradación de la proteína (88, 143).

LINEALIDAD DE LA CAPTACION DE $17\beta E_2 - ^3H$.

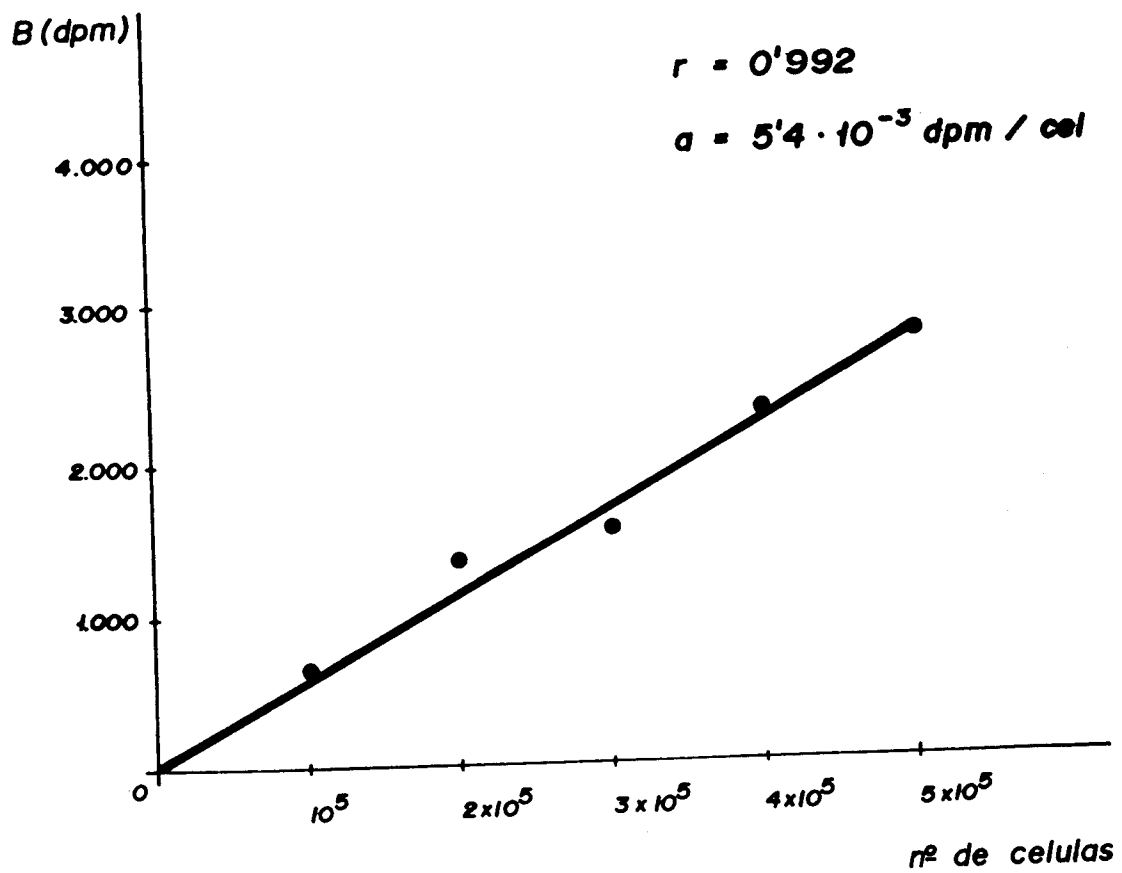


FIGURA. - 4.20

TERMOESTABILIDAD DEL RE (T = 37° C).

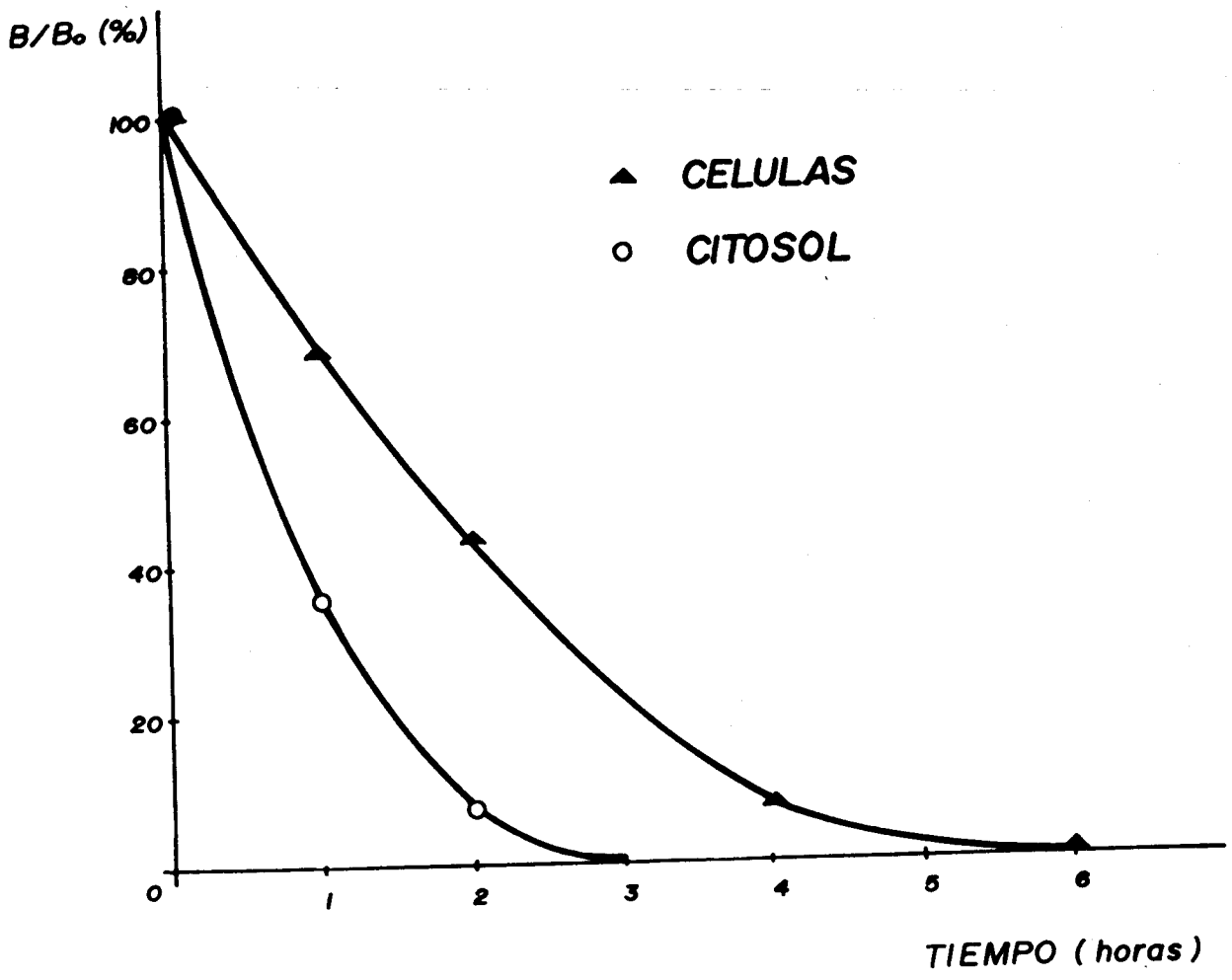


FIGURA - 4.21

TERMOESTABILIDAD DEL RE (T = 20° C)

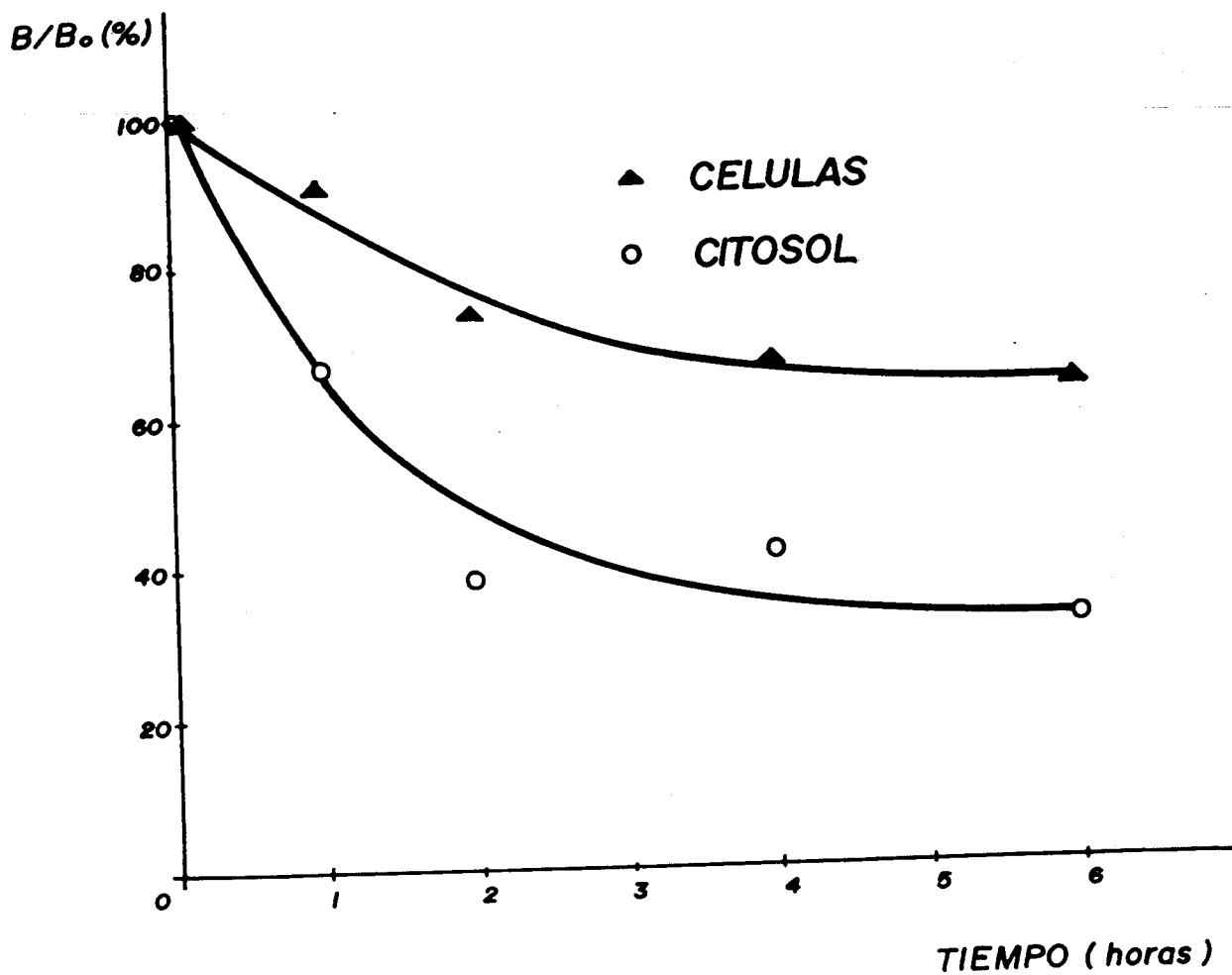


FIGURA - 4.22

TERMOESTABILIDAD DEL RE (T = 0° C).

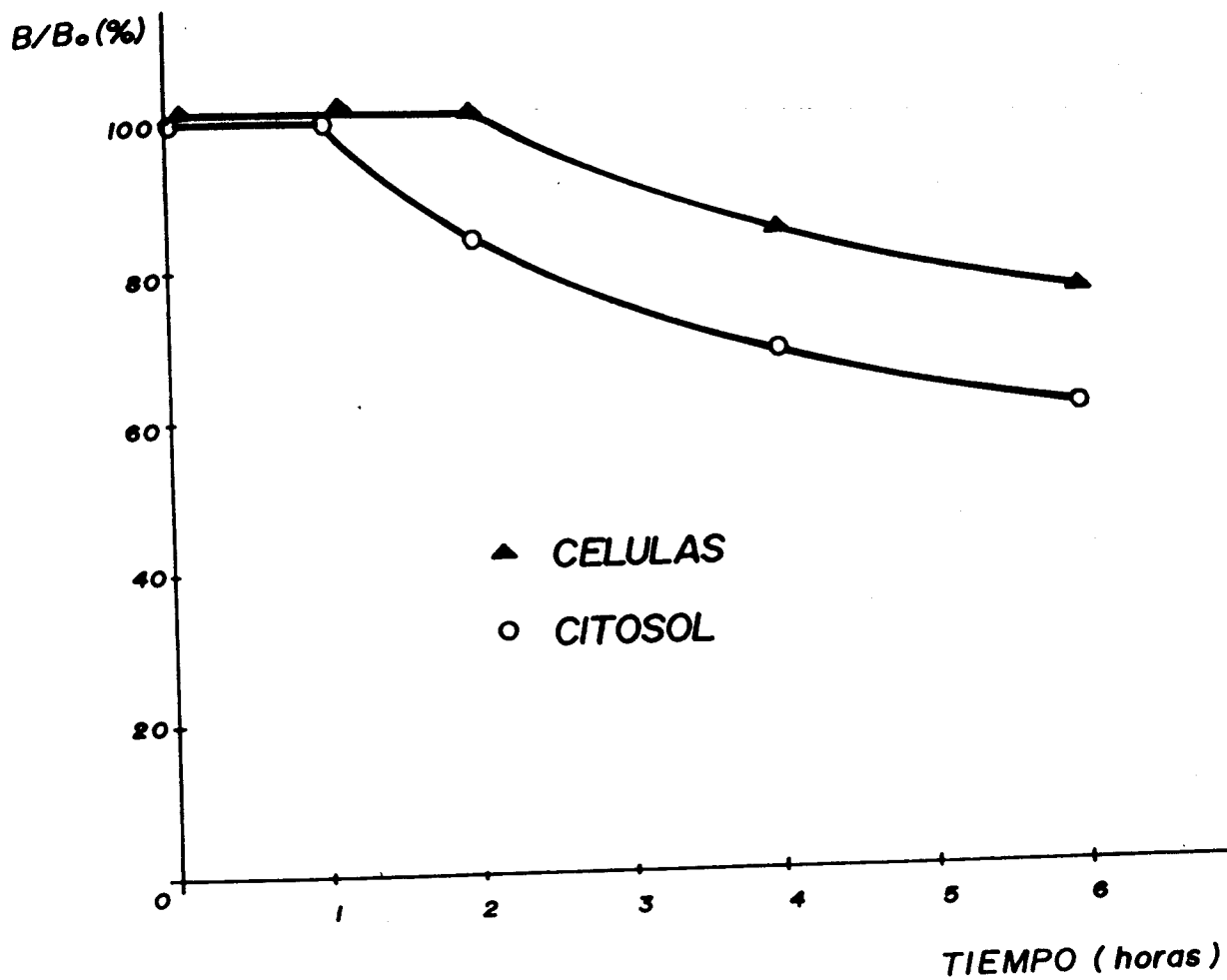


FIGURA - 4.23

Nuestras experiencias sobre estabilidad térmica del receptor a las temperaturas de 37°C (figura 4.21.), 20°C (figura 4.22) y 0°C (figura 4.23), en tampón TRIS-ClH y pH 7,4, utilizando monioglicerol como estabilizador de los grupos SH (17), ponen de manifiesto que la degradación de la estrofilina es claramente dependiente de la temperatura en la que se efectúa el almacenamiento del citosol. Así para T=37°C, la cantidad de RE cuantificados en la muestra, disminuye prácticamente a cero al cabo de 4 horas, se reduce, para ese mismo tiempo, al 40% cuando la temperatura es de 20°C e, incluso a 0°C, la degradación del receptor citosólico alcanza un 25% respecto a el valor cuantificado inicialmente. Estos procesos de degradación, dependientes de la temperatura, han sido explicados como degradaciones mediadas por enzimas proteolíticas intracelulares que aparecen libres en el citosol tras la homogeneización del tejido (17,59, 230). La utilización de agentes inhibidores de esta acción proteolítica como la leupeptina (230) o el molibdato sódico (59, 230) preserva la integridad del receptor e impide, al menos parcialmente, su degradación.

La comparación entre citosol y células para evaluar la importancia de la degradación del receptor en función del tiempo de la temperatura, pone de manifiesto que la pérdida de sitios de unión para el estradiol en células intactas es un proceso que también resulta dependiente de la temperatura pero que la magnitud de esta degradación es, comparativamente, menor que la que ocurre cuando la experiencia se realiza sobre el citosol (figuras 4.21 a 4.23). En efecto, del análisis de esas representaciones gráficas se puede deducir que a 37°C la pérdida de RE es prácticamente absoluta cuando transcurren 4 horas ($[RE] < 10\%$ respecto al valor inicial) y la capacidad de enlace de las células se reduce al 65% al cabo de 6 horas a 20°C. A la temperatura de 0°C no existe degradación del receptor durante las dos primeras horas de almacenamiento mientras que la reducción de la cantidad de estrógeno enlazado es del orden del 25% al cabo de 6 horas.

Considerando que en experiencias sobre células intactas realizadas por nosotros en este trabajo, no se han establecido, en ningún caso, condiciones de esterilidad ni se han controlado las condiciones ambientales óptimas (pCO_2 y relación nº de células/ nutrientes) es fácil explicar los resultados de pérdida de receptor si se tiene en cuenta las modificaciones en la viabilidad celular ocasionadas por el crecimiento de microorganismos contaminantes en el medio de cultivo (al menos a las temperaturas de 20 y 37°C) y las modificaciones del pH de la suspensión celular condicionadas de un lado por procesos metabólicos celulares y de otro por la ausencia de regulación de la concentración de hidrogeniones en la que el CO_2 juega un papel fundamental.

Parece lógico pensar, por ello, que la manipulación del tejido hormonodependiente (útero de rata o conejo y cáncer de mama humano en nuestro caso) en condiciones de esterilidad y el mantenimiento de condiciones ambientales óptimas para el crecimiento celular (estufa de cultivo con sistemas reguladores de CO_2 , temperatura y humedad) permitan obtener resultados superiores a los que en este trabajo se presentan y de hecho, a la vista de lo aquí expuesto, se han iniciado en el Departamento, un grupo de experiencias encaminadas a mejorar este aspecto metodológico del ensayo.

4.5.3. Especificidad del Enlace

La especificidad del enlace Receptor-Estrógeno, permite a una determinada célula "blanco" desarrollar una acción en respuesta a una señal hormonal sin interferencia de otras señales. Así, hormonas de la misma clase, sus agonistas y sus antagonistas pueden competir eficazmente por enlazarse al receptor, sin que este hecho deba afectar a otros sistemas re-

ceptores. La forma estereoquímica de la molécula hormonal y la geometría del sitio de unión en el receptor son factores fundamentales que determinan la especificidad del enlace. El fenómeno de competencia entre la hormona marcada y la hormona fría ($17\beta E_2-^3H$ y $17\beta E_2$) ha sido utilizado, por otra parte, para determinar la magnitud de los enlaces específicos saturables por la hormona. Ello se consigue fácilmente mediante la inclusión en el medio de reacción de $17\beta E_2$ o Dietilestilbestrol (DES) (molécula agonista del estradiol cuya afinidad por el receptor es igual que la del $17\beta E_2-^3H$), compuestos que impiden la unión de la hormona marcada con el receptor. Otros esteroides (estrógenicos o no) presentan menor afinidad por el receptor .

Para el estudio de este fenómeno se pueden poner en ejecución distintos procedimientos (8) (58) (140) (180). En nuestro caso, utilizando células intactas de útero de rata y tratando de determinar el poder inhibitor de determinadas moléculas sobre el enlace entre el receptor y el $17\beta E_2$ e investigar simultáneamente la naturaleza competitiva o no competitiva, de esa inhibición, hemos sometido a análisis un conjunto de datos de enlace RE obtenidos mediante el empleo de distintas concentraciones de $17\beta E_2-^3H$ (rango $2.10^{-9}M$ a $3.10^{-10}M$) ; tanto en presencia como en ausencia no marcada. El objetivo esencial del estudio fue ver si la transformación doble recíproca de los datos de enlace obtenidos para cada una de las moléculas inhibitoras ensayadas mostraba diferencias significativas con los datos de enlace del estradiol en presencia y ausencia de estradiol frío.

Las figuras 4.24, 4.25 y 4.26 muestran gráficamente los resultados obtenidos en estas experiencias. Un primer análisis de las mismas, permite estimar de manera intuitiva la afinidad relativa por el receptor que posee cada una de las moléculas ensayadas. Considerando, en segundo lugar, la magnitud del desplazamiento del $17\beta E_2-^3H$ de su sitio de unión, ocasio

ESPECIFICIDAD DEL ENLACE
COMPETIDORES: $17\beta E_2$, $17\alpha E_2$ y T = TESTOSTERONA.

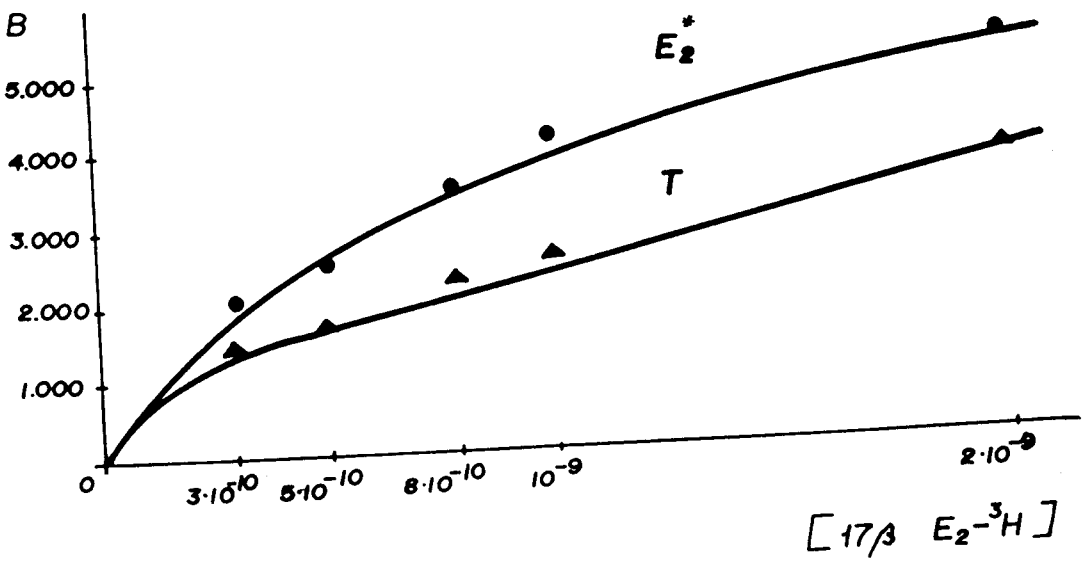
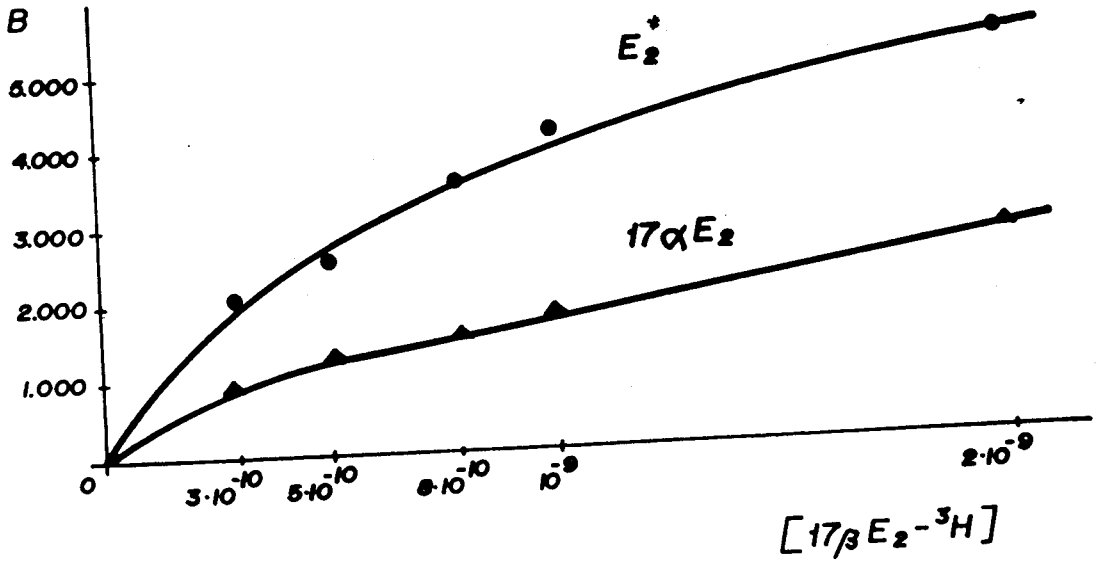
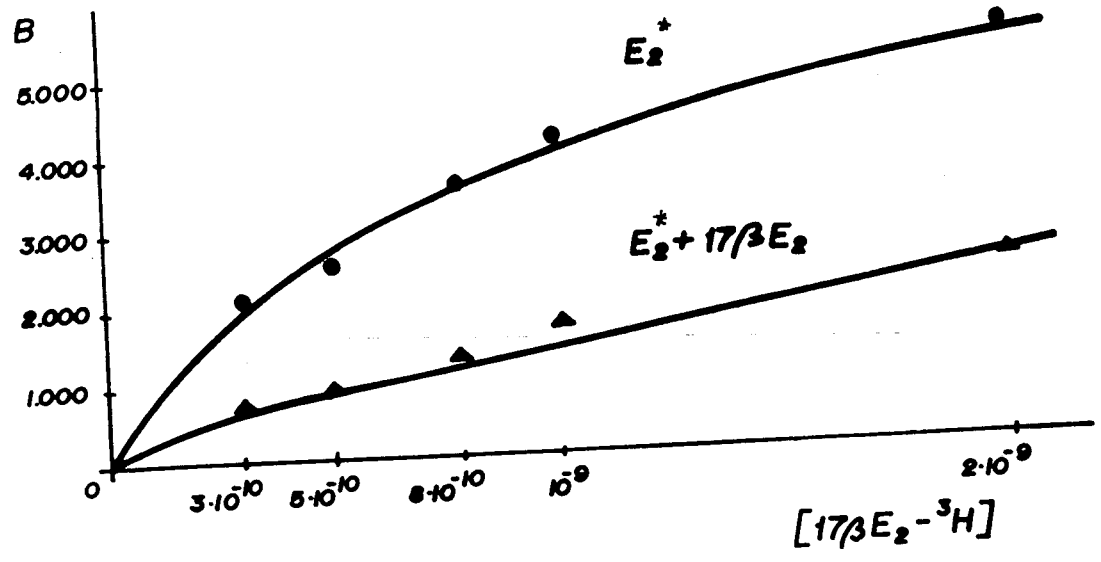
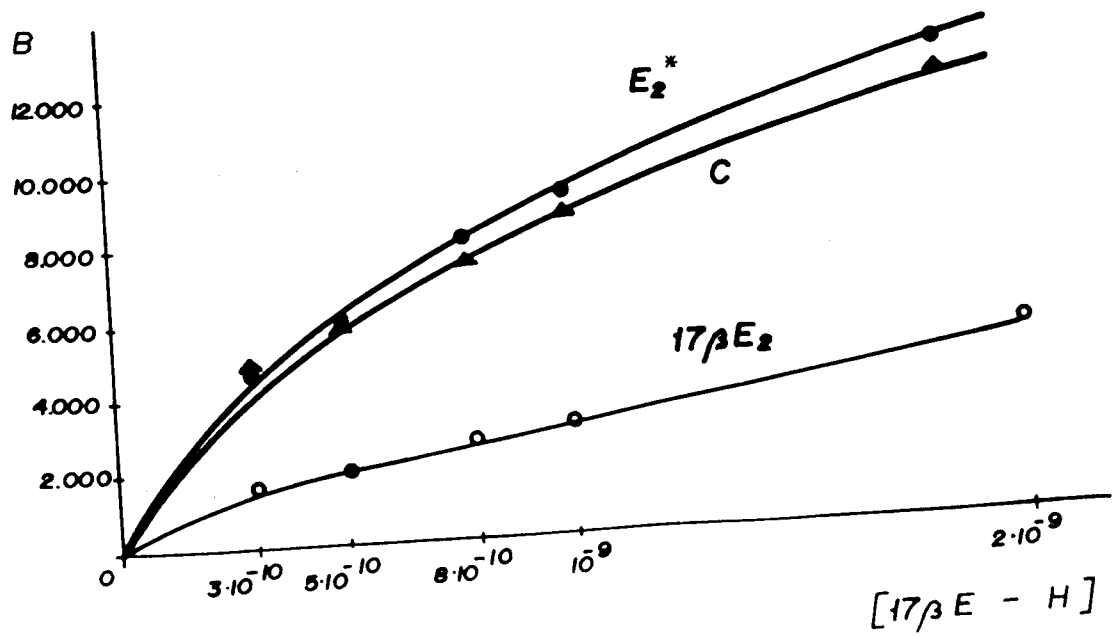
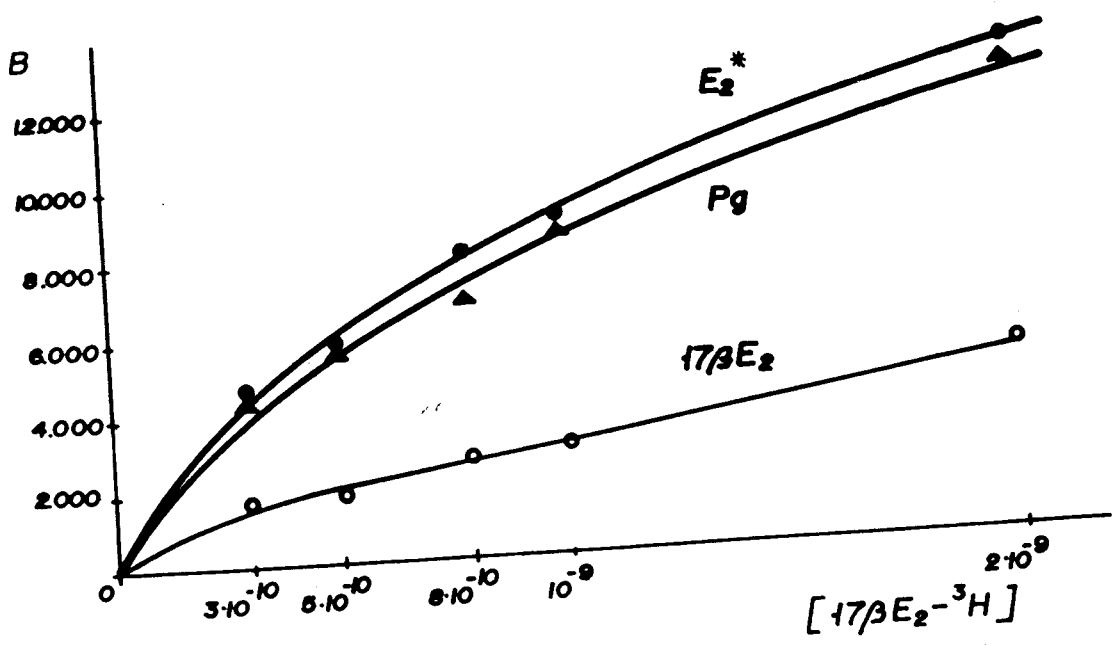
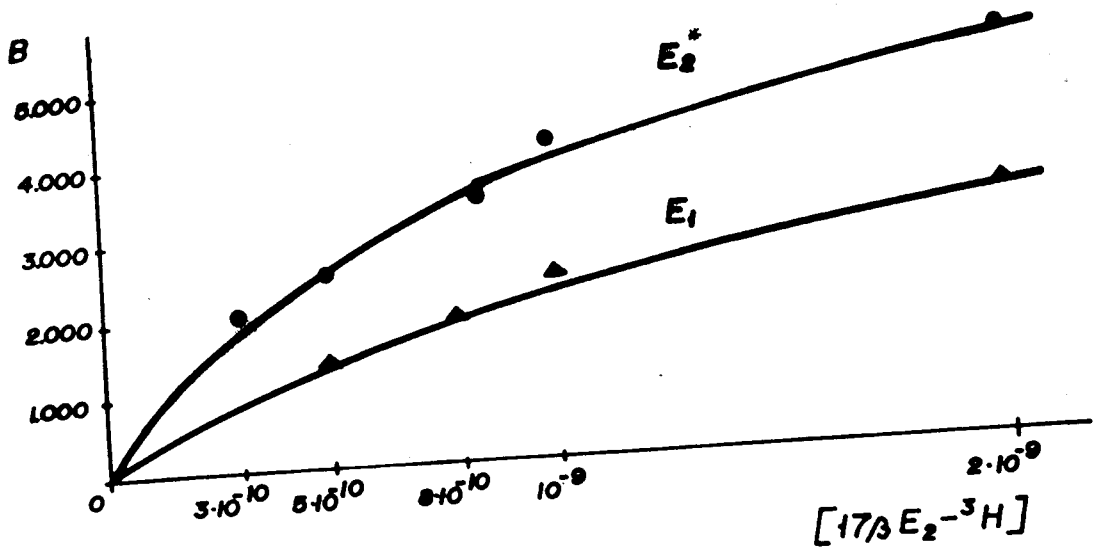


FIGURA. - 4.24

ESPECIFICIDAD DEL ENLACE
E = ESTERONA, Pg = PROGESTERONA y C = CORTICOSTERONA.



E₂ L₁ L₂ L₃ L₄ L₅ L₆ L₇ L₈ L₉ L₁₀ L₁₁ L₁₂ L₁₃ L₁₄ L₁₅ L₁₆ L₁₇ L₁₈ L₁₉ L₂₀ L₂₁ L₂₂ L₂₃ L₂₄ L₂₅ L₂₆ L₂₇ L₂₈ L₂₉ L₃₀ L₃₁ L₃₂ L₃₃ L₃₄ L₃₅ L₃₆ L₃₇ L₃₈ L₃₉ L₄₀ L₄₁ L₄₂ L₄₃ L₄₄ L₄₅ L₄₆ L₄₇ L₄₈ L₄₉ L₅₀ L₅₁ L₅₂ L₅₃ L₅₄ L₅₅ L₅₆ L₅₇ L₅₈ L₅₉ L₆₀ L₆₁ L₆₂ L₆₃ L₆₄ L₆₅ L₆₆ L₆₇ L₆₈ L₆₉ L₇₀ L₇₁ L₇₂ L₇₃ L₇₄ L₇₅ L₇₆ L₇₇ L₇₈ L₇₉ L₈₀ L₈₁ L₈₂ L₈₃ L₈₄ L₈₅ L₈₆ L₈₇ L₈₈ L₈₉ L₉₀ L₉₁ L₉₂ L₉₃ L₉₄ L₉₅ L₉₆ L₉₇ L₉₈ L₉₉ L₁₀₀

A.- ANDROSTENDIONA, Pr. - PREGNANOLONA
5α DHT. - 5α DIHIDROTESTOTERONA.

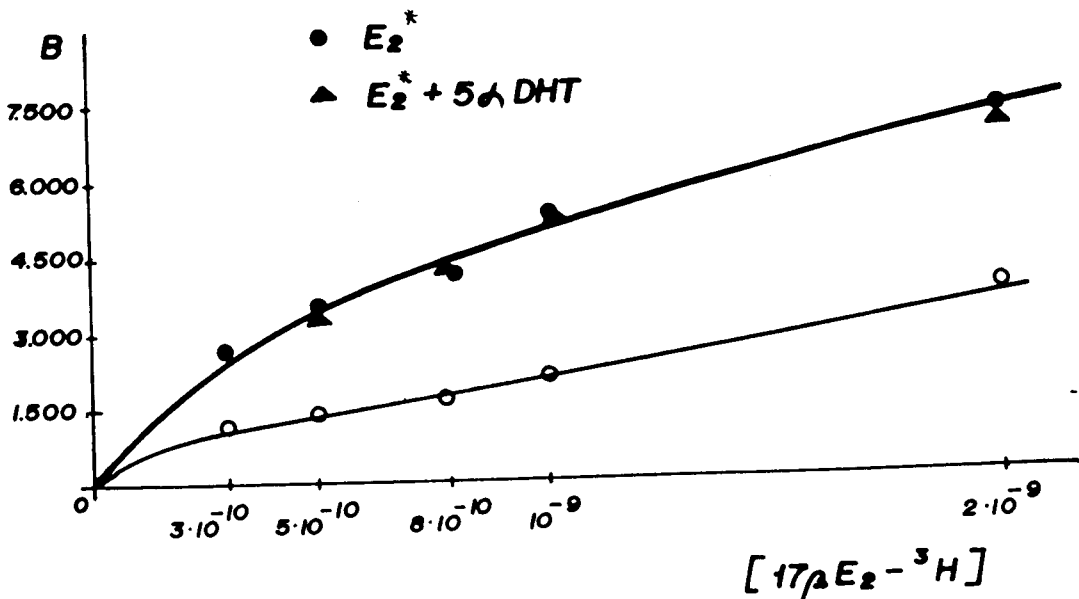
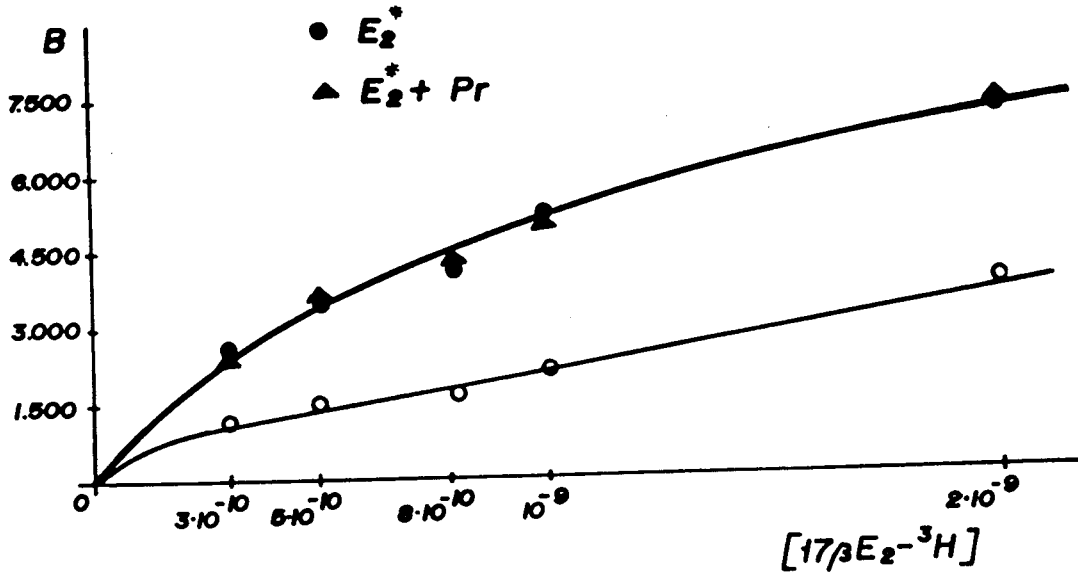
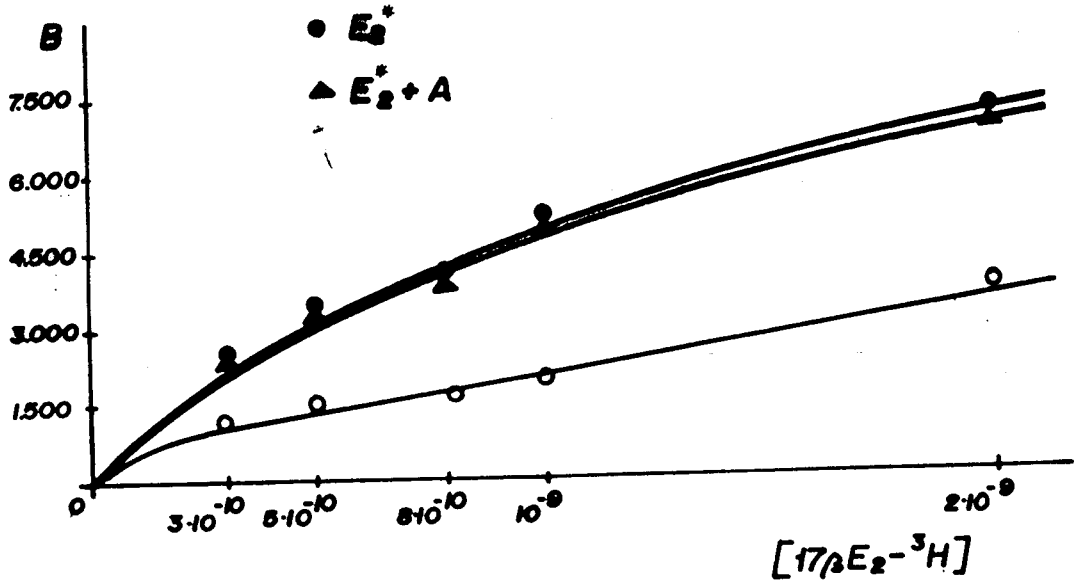


FIGURA.- 4. 26

nado por el competidor previa asignación del valor 100% al desplazamiento del estradiol tritiado por el estradiol frío, es posible determinar cuantitativamente y en términos comparativos las afinidades por el receptor de las moléculas descritas. Los resultados de este cálculo se ofrecen en la Tabla IV-13.

TABLA IV-13

Valores de la afinidad relativa entre el RE y distintas moléculas.

Molécula	Afinidad relativa %
17 β Estradiol	100%
17 α Estradiol	90%
Estrona	65%
Testosterona	55%
Progesterona	10%
Corticosterona	< 10%
Androstendiona	< 10%
Pergnanolona	0%
5 dihidrotestosterona	0%

Si bien los datos de la tabla anterior no pueden ser directamente comparados con los de afinidad relativa de moléculas esteroideas por el RE en células MCF-7, obtenidos por otros autores (181) puesto que en nuestras experiencias cambia el modo biológico y, en todos los casos, se emplea un exceso de molécula fría 200 veces superior a la concentración de 17 β E₂-³H, (condiciones que distan mucho de las fisiológicas), si es cie

to que existe una fuerte coincidencia en cuanto al orden, de más a menos inhibición del enlace, en el que las moléculas esteroideas, estrogénicas o no, se distribuyen. Así en el modelo MCF-7 la mayor capacidad de inhibición del enlace tras $17\beta E_2$ y DES corresponde a la estrona (no está ensayado el $17\alpha E_2$) y a continuación se ordenan: Organon 2058 (derivado sintético de la Progesterona), testosterona, androstendiona y cortisol. Por otra parte, la representación doble recíproca de los datos de enlace (figura 4.27) para las tres moléculas que producen mayor desplazamiento del $17\beta E_2\text{-}^3H$, demuestra que el $17\alpha E_2$ actúa a través de un mecanismo competitivo, esto es, tanto el ligando $17\beta E_2\text{-}^3H$ como el competidor $17\alpha E_2$ compiten por el mismo locus de unión. La capacidad de enlace máxima (intersección en el eje de ordenadas) no se modifica aunque la constante de asociación entre el receptor y el estradiol disminuye (intersección en el eje de abscisas). Por otra parte el mecanismo de inhibición del enlace por el que actúan tanto la estrona como la testosterona, parece indicar que la estrofilina posee, para estas moléculas, un "locus" de unión distinto del específico que corresponde al $17\beta E_2$. La inhibición en este caso, es no competitiva. La hormona radiactiva no se enlaza porque su sitio de unión resulta deformado tras el enlace del competidor. La constante de asociación entre R y E_2 no se modifica y el número de sitios de enlace para el $17\beta E_2$ disminuye (Tabla IV-14

Particular interés presentan los estudios de inhibición del enlace Receptor-Estradiol ocasionados por la presencia en el medio de reacción de los antiestrógenos Tamoxifeno e Hidroxi-tamoxifeno, por cuanto estas moléculas se emplean en clínica humana para el tratamiento de aquellos casos de cáncer de mama que conservan el mecanismo de hormonodependencia. Se sabe que el hidroxitamoxifeno desplaza al $17\beta E_2\text{-}^3H$ enlazado al receptor estrogénico citosólico y que la afinidad relativa de esta molécula por el receptor de estrógenos es del 100% (53). El tamoxifeno posee una afinidad de enlace relativa menor (53). Sin embargo, cuando el ensayo se realiza sobre células intactas, el grado de inhibición del enlace dista mucho de al

REPRESENTACION DOBLE RECIPROCA DE LA INHIBICION DEL ENLACE EN PRESENCIA DE DISTINTOS COMPETIDORES.

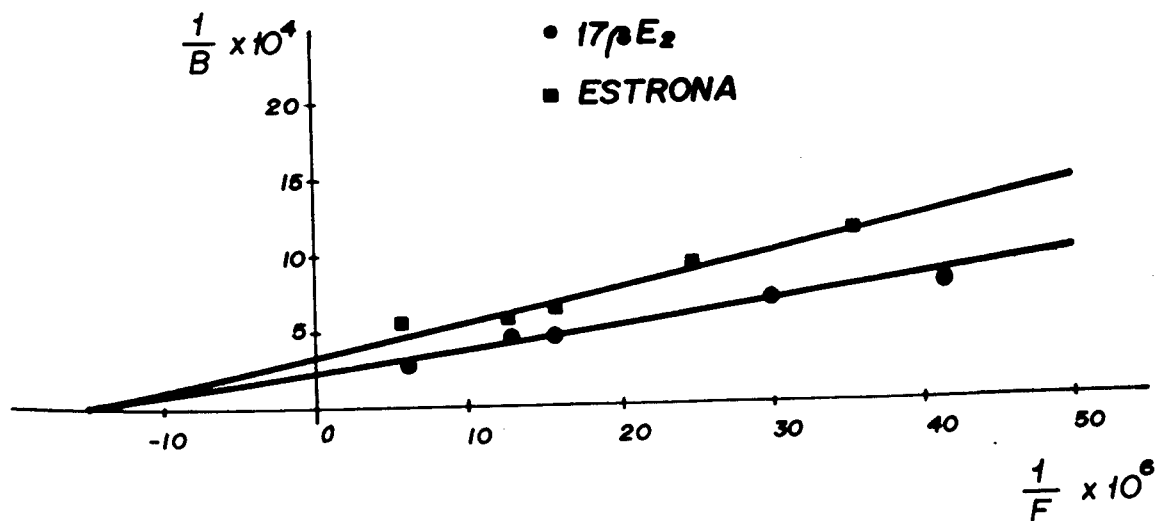
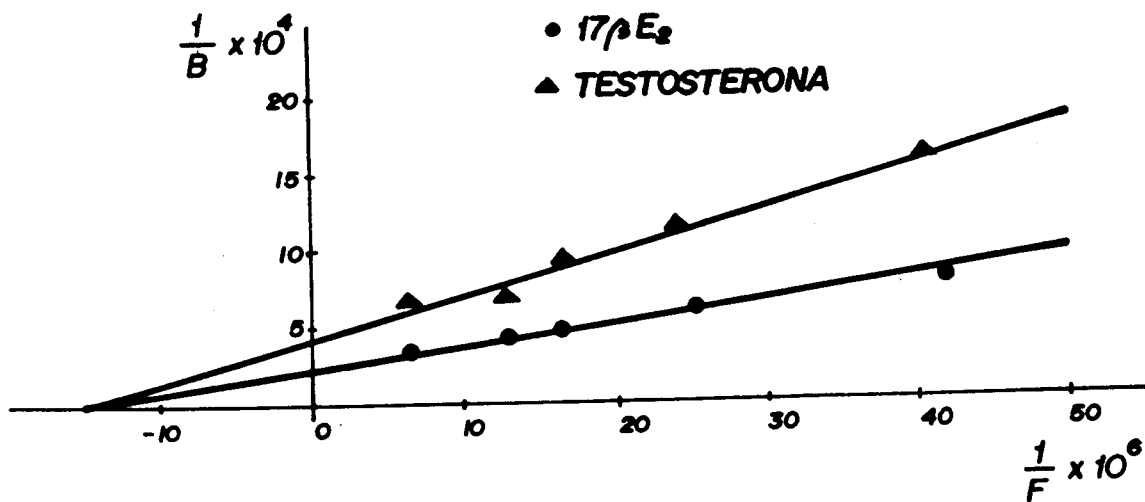
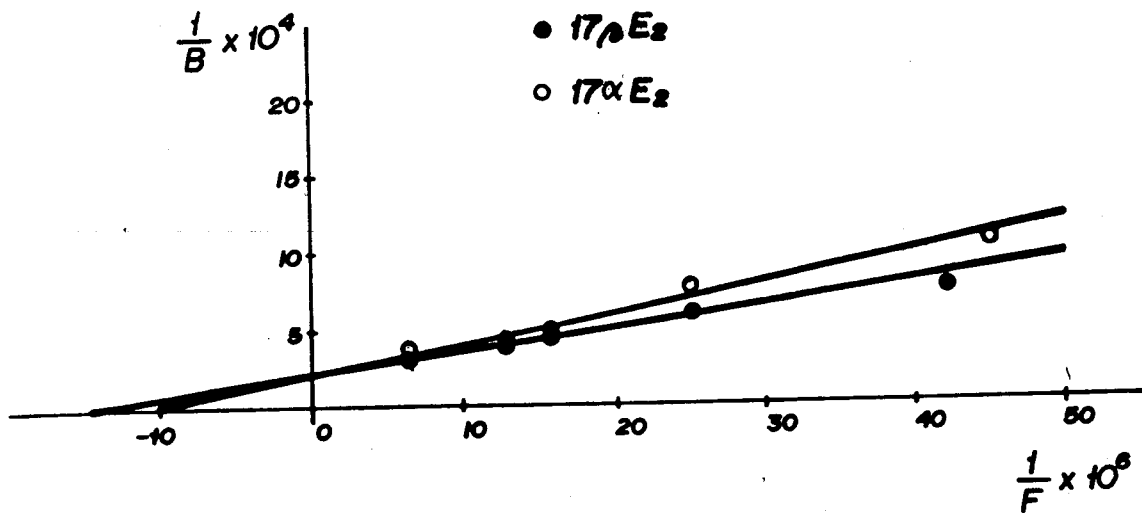


FIGURA. - 4.27

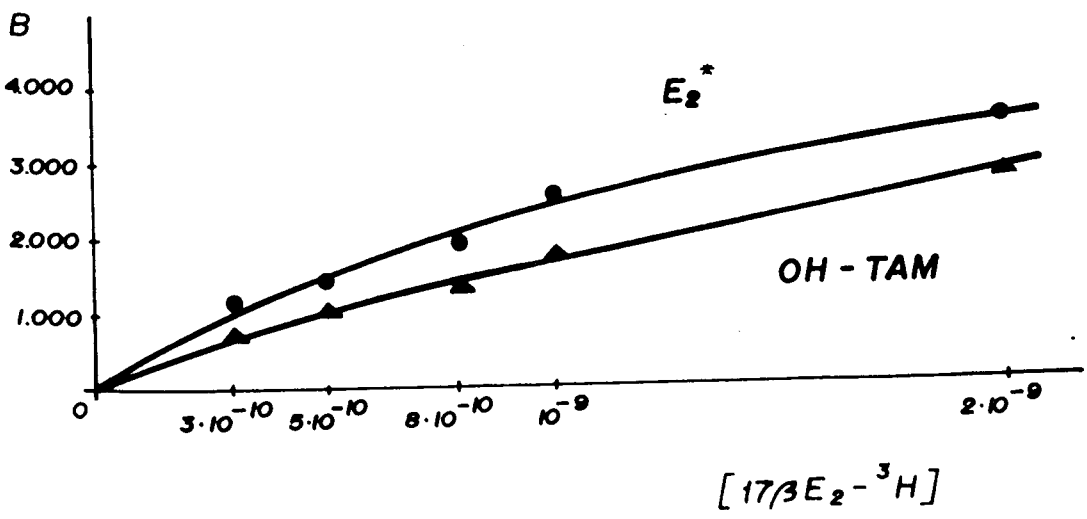
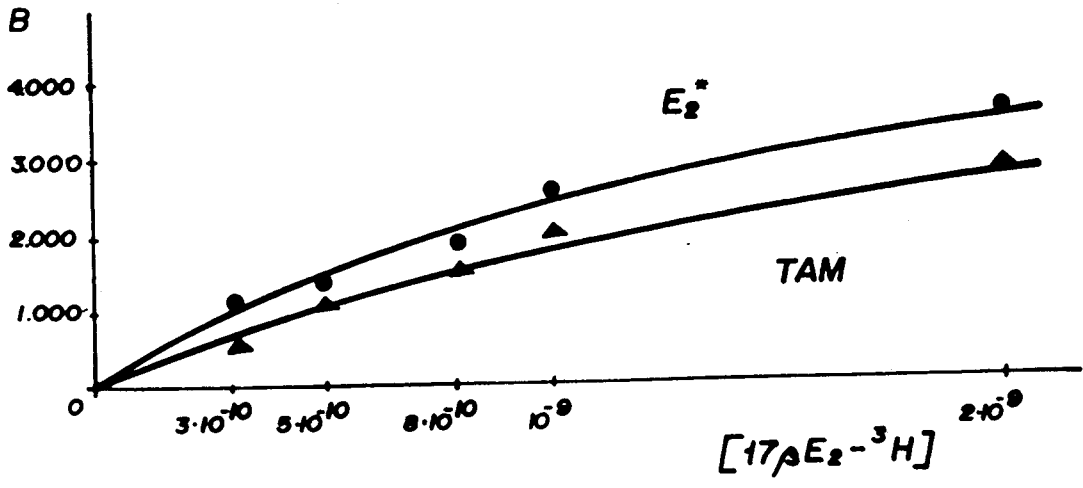
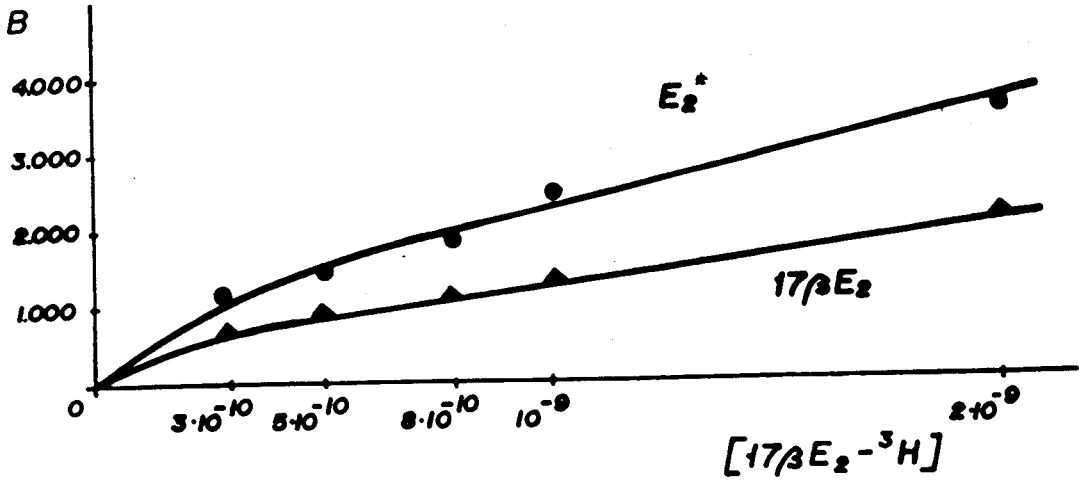
TABLA IV-14

Valores de capacidad máxima de enlace (B_{Max}) y constante de asociación (Kd).

	B_{Max} (dpm)	Kd (M/l)
E_2 $17\beta E_2$	4.500	$8,8 \cdot 10^{-10}$ -9
E_2 $17\alpha E_2$	5.000	$1,3 \cdot 10^{-9}$
E_2 T	2.400	$9,0 \cdot 10^{-10}$
E_2 E_1	3.500	$9,1 \cdot 10^{-10}$

canzar el valor del 100%. De acuerdo con nuestros resultados, la inhibición del enlace entre Receptor y $17\beta E_2-^3H$ (en presencia de un exceso, 600 veces superior a la concentración de hormona marcada, de cada uno de los antiestrógenos) resulta ser igual al 50% de el desplazamiento que produce el $17\beta E_2$ frío. (figura 4.28). Resultados parecidos a estos han sido recientemente reportados por Stoersel y Leclercq en células MCF-7 intactas (218). Para profundizar en el conocimiento de este fenómeno, hemos ensayado la competitividad de los antiestrógenos sobre el receptor de útero de conejo (figura 4.29) y el examen de la representación gráfica de los datos de enlace pone de manifiesto que efectivamente, para un exceso de 600 veces de los antiestrógenos no marcados, el desplazamiento del $17\beta E_2-^3H$ específicamente enlazado alcanza un nivel comparativo con el que se origina cuando como competidor se utiliza el estradiol frío.

INHIBICION DEL ENLACE R-E (CELULAS INTACTAS) EN PRESENCIA DE TAMOXIFENO (TAM) Y DE HIDROXI - TAMOXIFENO (OH - TAM).



INHIBICION DEL ENLACE R-E (CIOSUL) EN TILUCION -
TAMOXIFENO (TAM) Y DE HIDROXI-TAMOXIFENO
(OH-TAM).

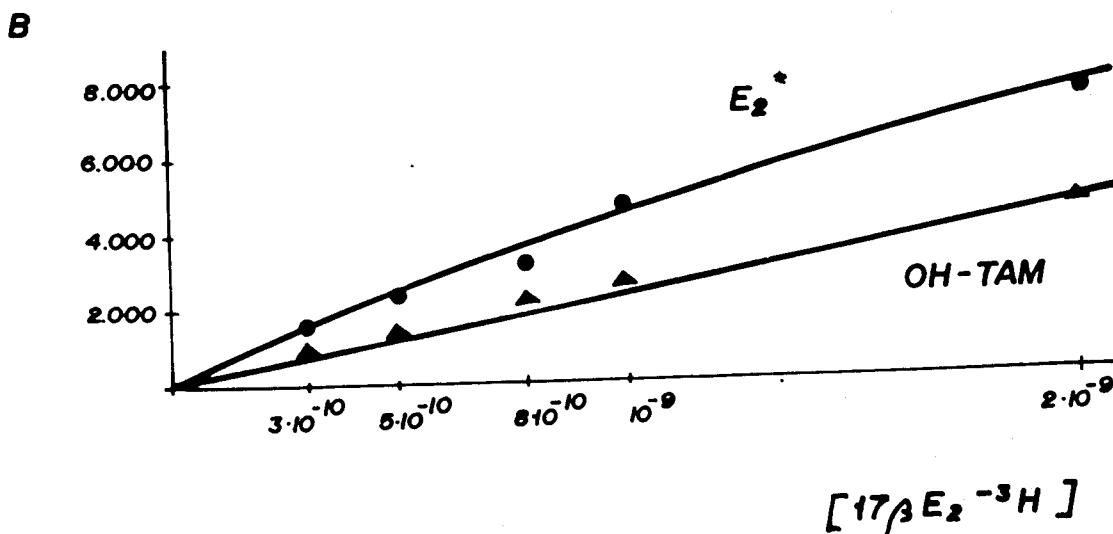
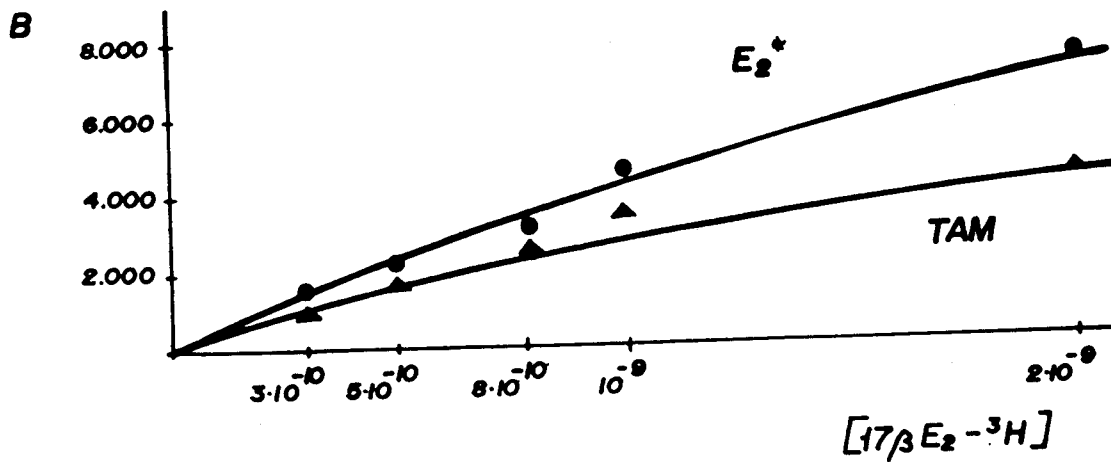
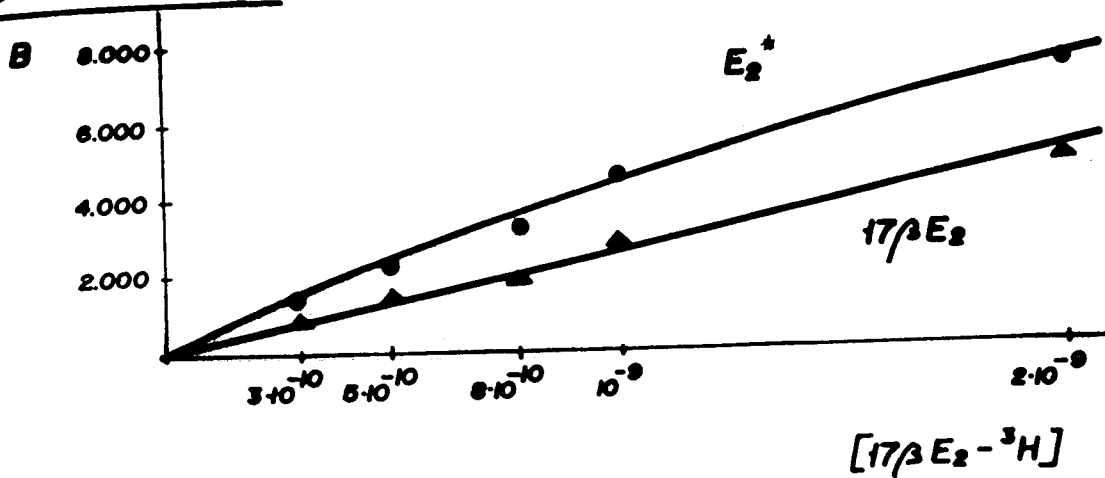


FIGURA. - 4.29

La representación de Scatchard de los datos de enlace específico (figura 4.30) pone de manifiesto que los resultados experimentales obtenidos para el Estradiol en presencia de TAM y de OH-TAM no se ajustan a una línea recta. Ello sugiere la existencia de un fenómeno de cooperatividad positiva para el proceso de enlace. En efecto, la representación de Hill (figura 4.31) de estos mismos datos, permite deducir la pendiente de la misma (número de Hill) que resulta ser de 1,61 para el TAM y de 1,26 para el OH-TAM. El valor superior a 1 encontrado para n_H en estas dos situaciones indica que la asociación del competidor a la macromolécula modifica la equivalencia de los sitios de unión para el estrógeno e induce la aparición de, al menos, dos clases de centros activos dependientes uno del otro. Así, la asociación de la hormona esteroidea con el receptor, en condiciones de baja concentración de estradiol resulta ser un proceso de baja afinidad, que satura uno de los locus específicos de unión. Para mayores concentraciones de hormona el enlace entre ésta y el receptor se realiza en condiciones de mayor afinidad. Desde un punto de vista formal el proceso puede ser explicado aceptando que el acoplamiento de la primera molécula de $17\beta E_2$ modifica la geometría del locus de unión con el ligando "abriendo" un segundo centro de enlace cuya afinidad por el estrógeno es mayor. Este hecho, que puede ser interpretado así en el citosol, resulta extraordinariamente complejo cuando se estudia el fenómeno sobre células intactas en las que los mecanismos de activación del receptor, translocación al núcleo y enlace del complejo RE a la cromatina se realizan sucesivamente.

Toda esta serie de acontecimientos bioquímicos en los que los antiestrógenos intervienen, de manera no bien conocida pero cuyo resultado final es impedir el desarrollo de la acción hormonal estrogénica, hacen que el tratamiento de los datos de enlace de acuerdo con la ecuación de Lineweaver-Bruck (figura 4.32) no ofrezca resultados que sea posible interpretar de manera inmediata puesto que los puntos experimen

REPRESENTACION DE SCATCHARD DE LOS DATOS DE ENLACE RE (CITOSOL) EN PRESENCIA DE TAM - OH-TAM.

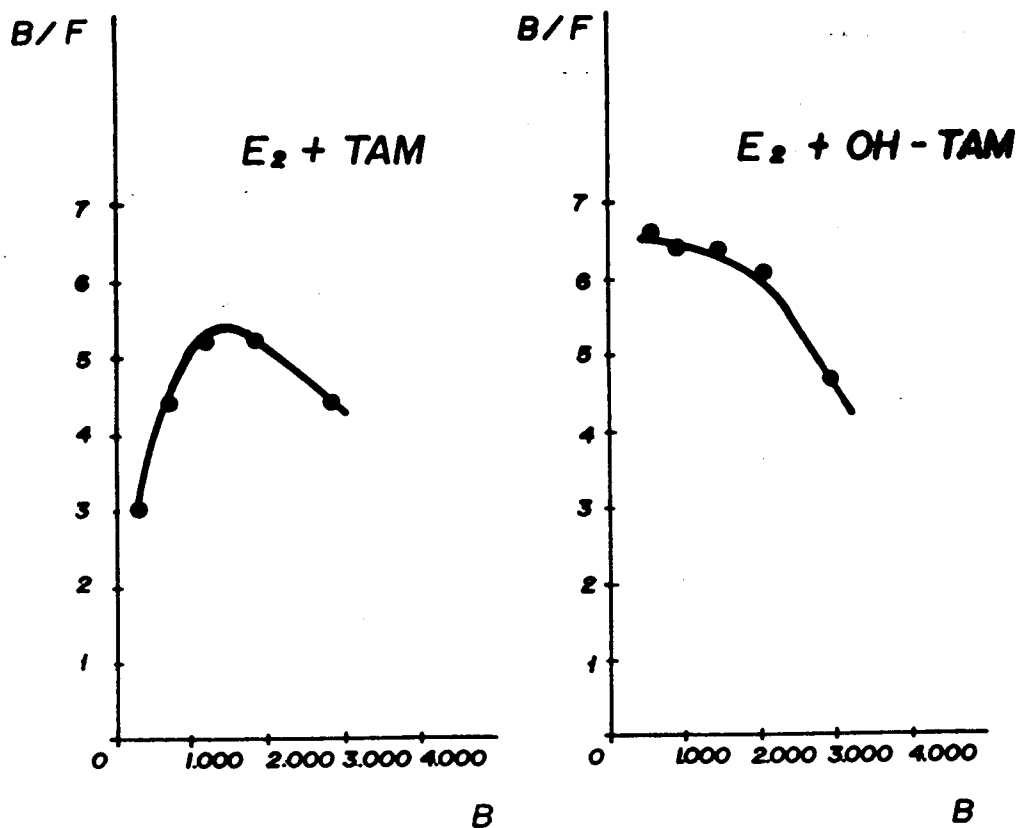


FIGURA. - 4.30

REPRESENTACION DE HILL DE LOS DATOS DE ENLACE RE (CITOSOL) EN PRESENCIA DE TAM Y OH-TAM.

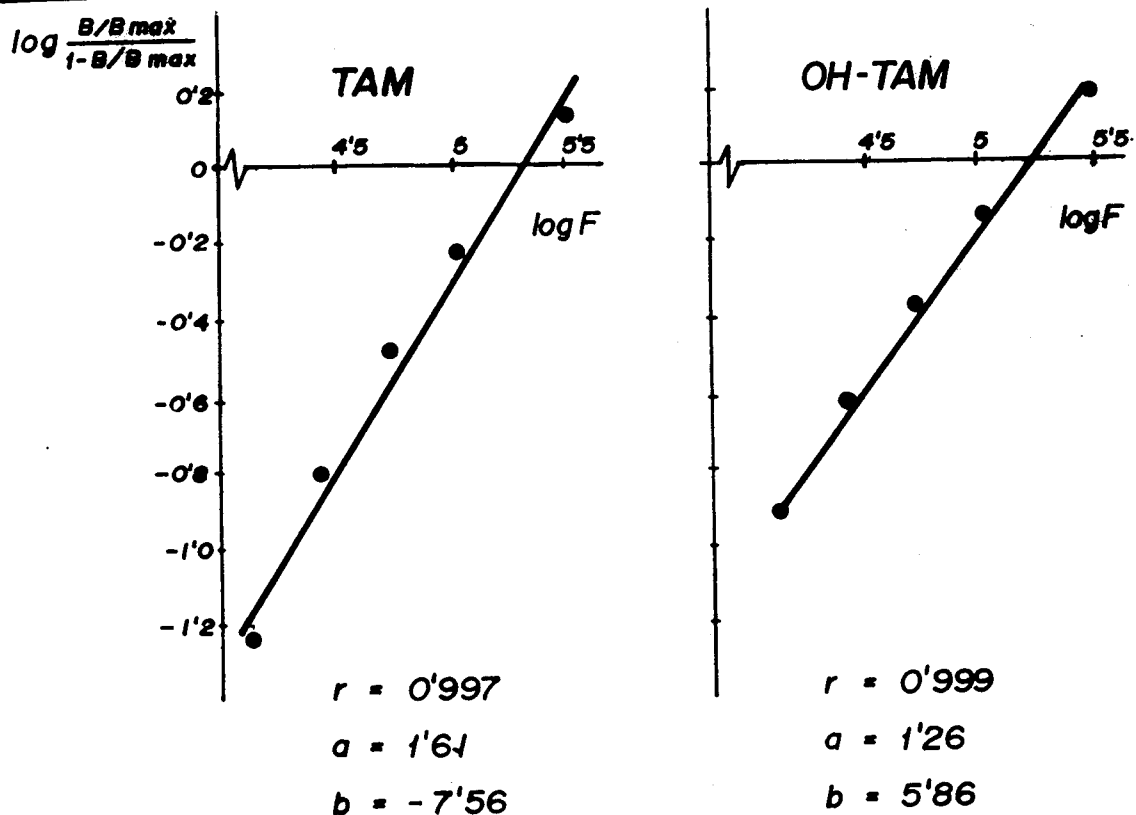


FIGURA. - 4.31

INHIBICION DEL ENLACE R-E₂ EN CELULAS INTACTAS. COMPETIDORES: TAM y OH-TAM.

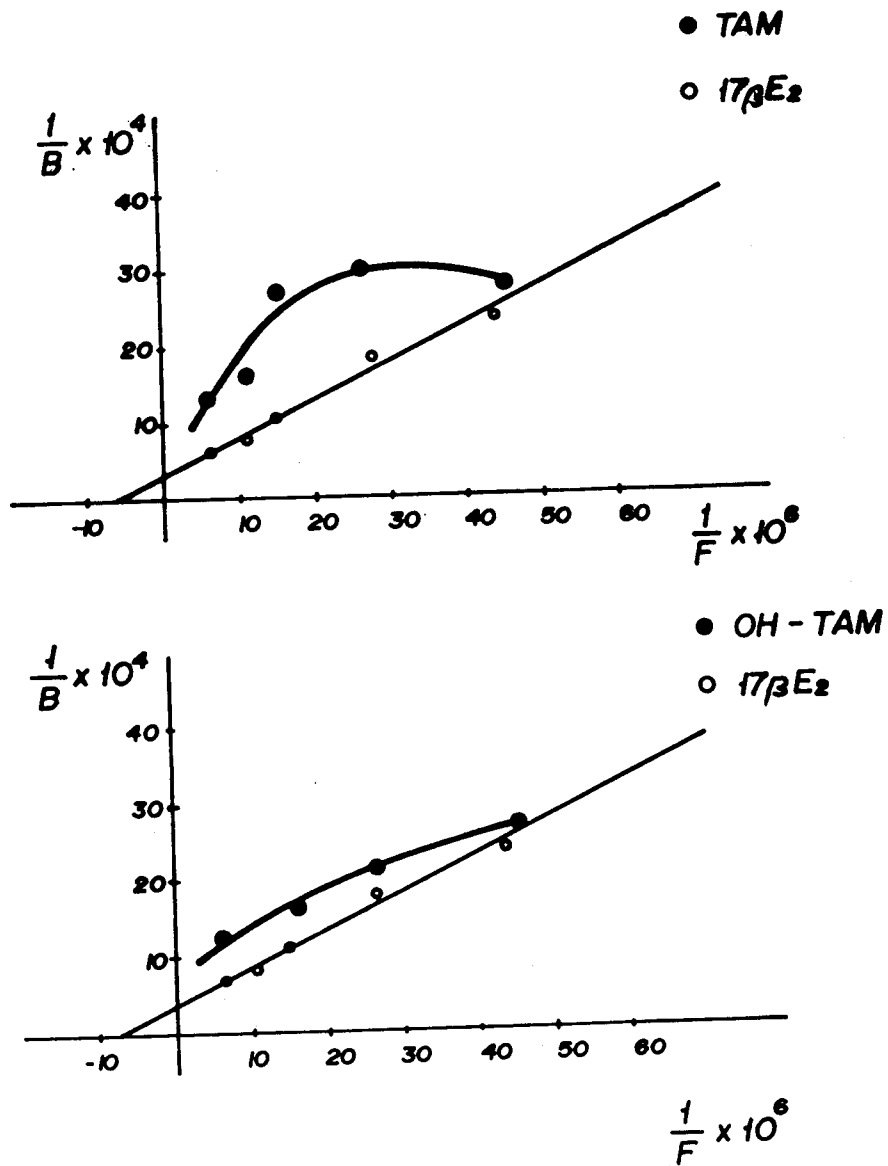


FIGURA. - 4.32

REPRESENTACION DEL HILL DE LOS DATOS DE ENLACE EN CELULAS INTACTAS. COMPETIDORES: TAM y OH-TAM.

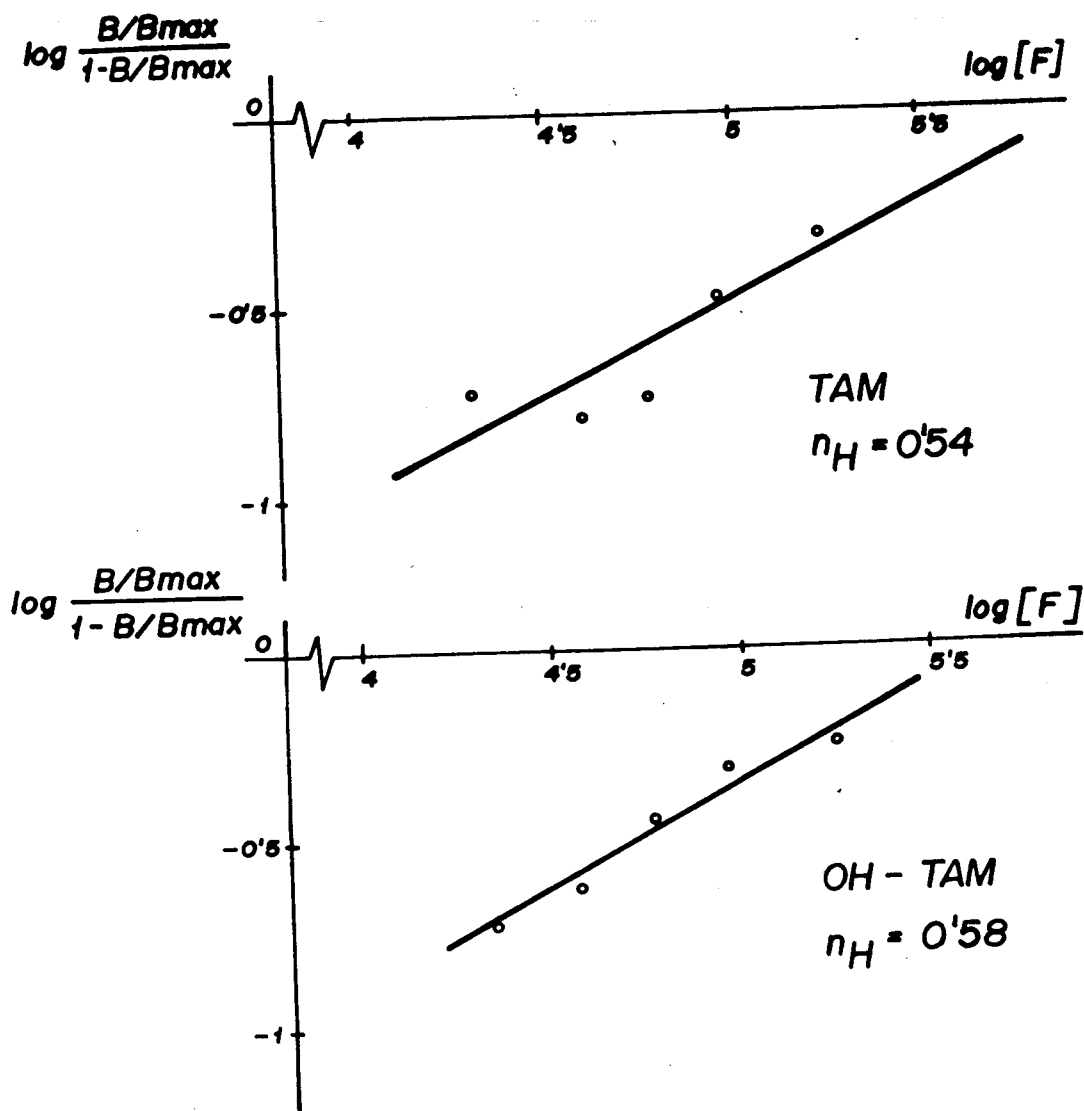


FIGURA. - 4.33

tales no se ajustan a una línea recta. Acudiendo de nuevo a la transformación de Hill es posible deducir de ella el valor de n_H (fig. 4.33) y el resultado obtenido (del orden de 0,5) -inferior a la unidad- induce a pensar en la existencia de un fenómeno de cooperatividad negativa cuando el proceso de enlace se estudia en relación a la presencia de sustancias con actividad antiestrogénica, TAM y OH-TAM, en el medio de incubación celular. Este hecho hace suponer, nuevamente, en la existencia de distintos locus de unión para el estradiol, no equivalentes, relacionados entre sí, de forma que una vez enlazada la molécula de estradiol al primer sitio aceptor, el enlace del ligando sobre el segundo lugar de unión resulta más difícil. De lo anterior se puede deducir que el receptor citosólico es un modelo simplista de los acontecimientos bioquímicos que desencadena en el interior de la célula. blanco, la hormona efectora y que es necesario diseñar experiencias más detalladas (la utilización de moléculas de TAM y OH-TAM marcadas con ^{14}C , simultáneo al empleo de $17\beta E_2-^3H$, utilizando una técnica de doble marcaje, podría ser un ejemplo de ellas) para esclarecer el mecanismo bioquímico de la interacción Receptor-estrógeno-antiestrógeno sobre células "blanco" intactas.

4.5.4. Comparación entre el Ensayo RE en Citosol y el Ensayo en Células Intactas

Una pregunta surge inmediatamente de los razonamientos anteriores: ¿el ensayo en citosol ofrece la misma información que el ensayo sobre células intactas?. Para despejar la interrogante hemos sometido a comparación ambos métodos realizados, paralelamente, experiencias sobre citosol obtenido utilizando la mitad de un útero de conejo y sobre una suspensión monoclular conseguida tras tratamiento enzimático de la mitad urinaria restante. Todos los ensayos se efectuaron por triplicado y la experiencia se repitió seis veces (figuras 4.34 a 4.39)

La tabla IV-15 recoge los valores de la máxima capacidad de enlace (B_{Max}) y de la constante de disociación (Kd) del proceso.

TABLA IV-15

Valores de B_{Max} y Kd en citosol y células

Experiencia	CITOSOL		CELULAS	
	B_{Max}	Kd. 10^{10}	B_{Max}	Kd. 10^{10}
I	537 (a)	6,4	8,3 (b)	20
II	414 (a)	7,2	4,7 (b)	11
III	130 (a)	8,1	14,2 (b)	18
IV	188 (a)	9,2	2,4 (b)	10
V	248 (a)	4,6	4,6 (b)	6
VI	125 (a)	14,0	1,5 (b)	9

(a) B_{Max} = fmol/mg Proteína citosol

(b) B_{Max} = fmol/Mg DNA

El análisis estadístico de los datos de B_{Max} y Kd demuestra que no existe correlación entre los valores de estos parámetros cuantificados por uno o por otro procedimiento. Esto quiere decir que el ensayo sobre células intactas y el ensayo de RE en citosol difieren en cuanto a los resultados cuantitativos de concentración de estrofilina (o capacidad máxima de enlace) y de afinidad entre receptor y estradiol. Este resultado no es -

CURVAS DE SATURACION Y REPRESENTACION DE SCATCHARD DE LOS DATOS EXPERIMENTALES EN CITOSOL Y CELULAS INTACTAS. Exp.- I.

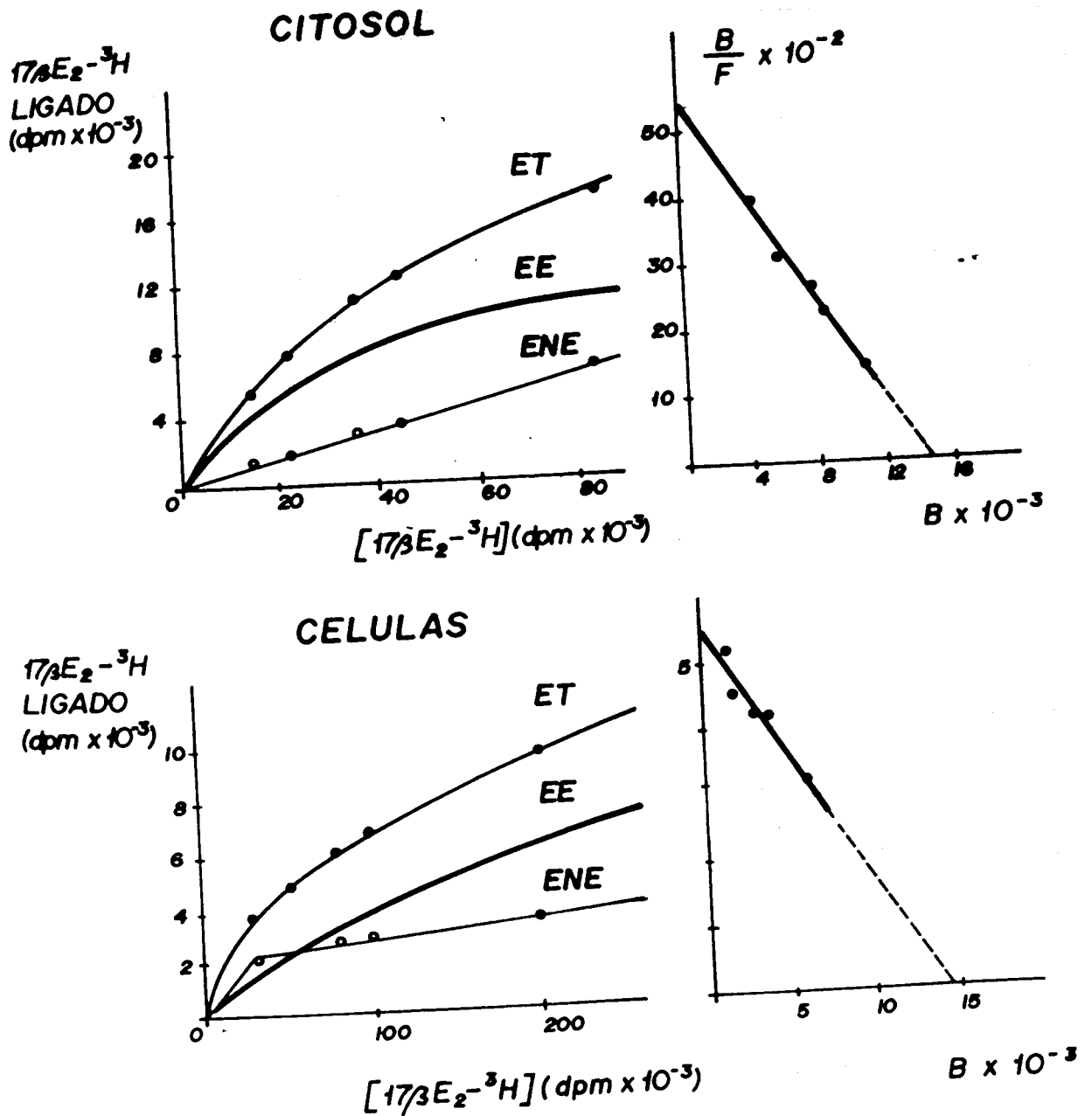


FIGURA. - 4.34

CURVAS DE SATURACION Y REPRESENTACION DE SCATCHARD DE LOS DATOS EXPERIMENTALES EN CITOSOL Y CELULAS INTACTAS. EXP. - II

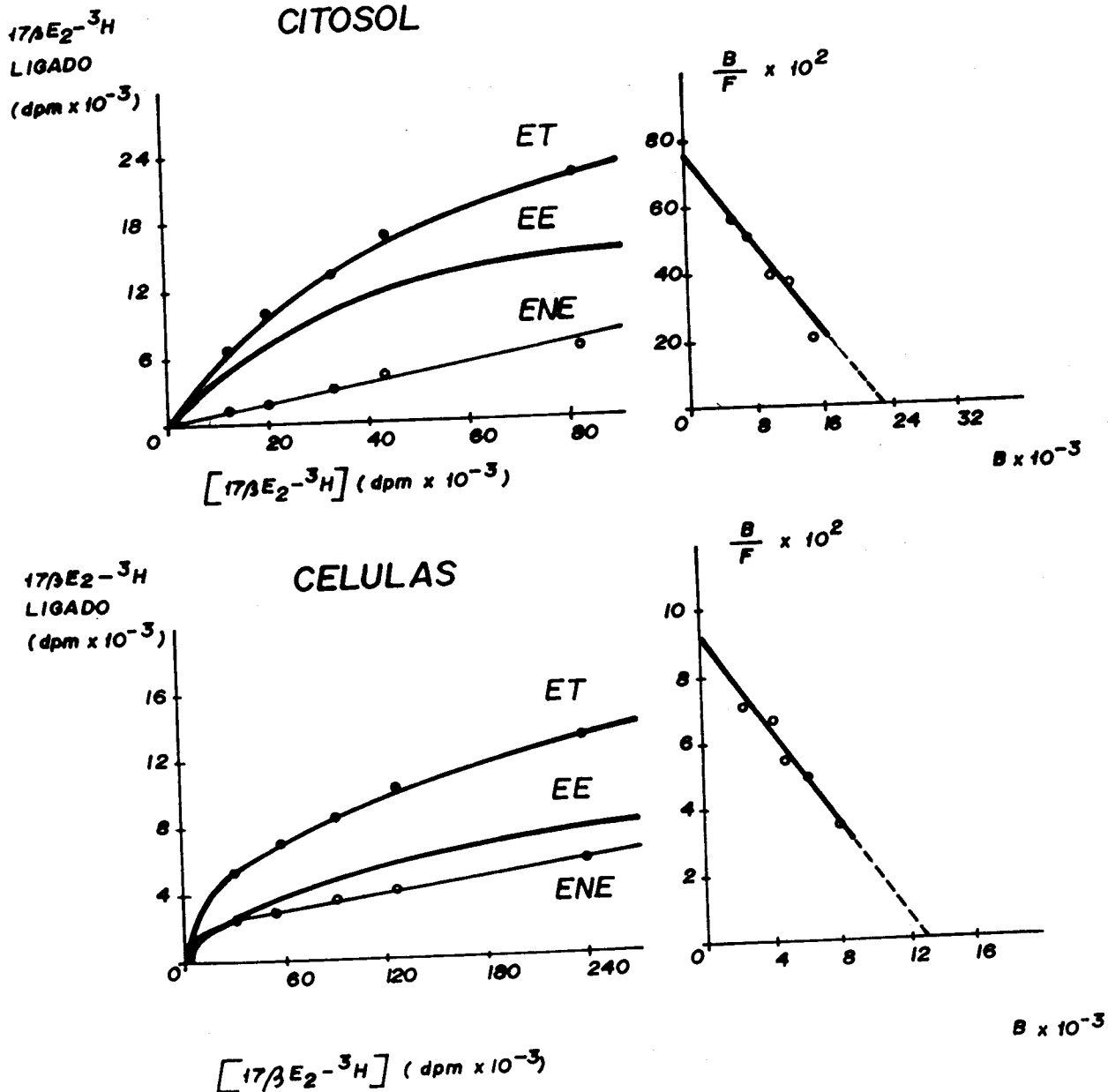


FIGURA. - 4.35

CURVAS DE SATURACION Y REPRESENTACION DE SCATCHARD DE LOS DATOS EXPERIMENTALES EN CITOSOL Y CELULAS INTACTAS. EXP. - III

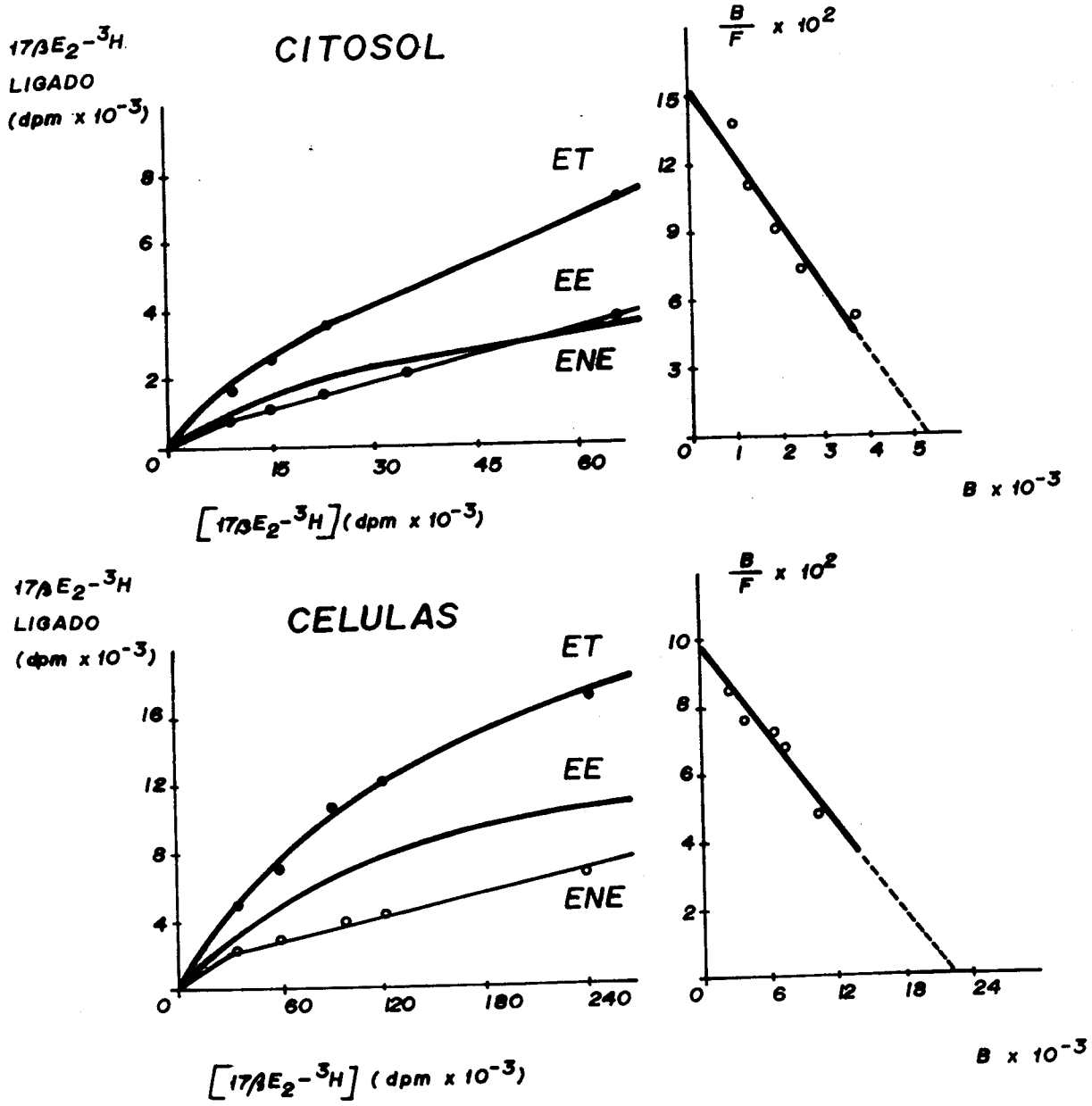


FIGURA. - 4.36

GRÁFICAS DE SATURACION Y REPRESENTACION DE SCATCHARD DE DATOS EXPERIMENTALES EN TOSOL Y CELULAS INTACTAS. EXP. - IV.

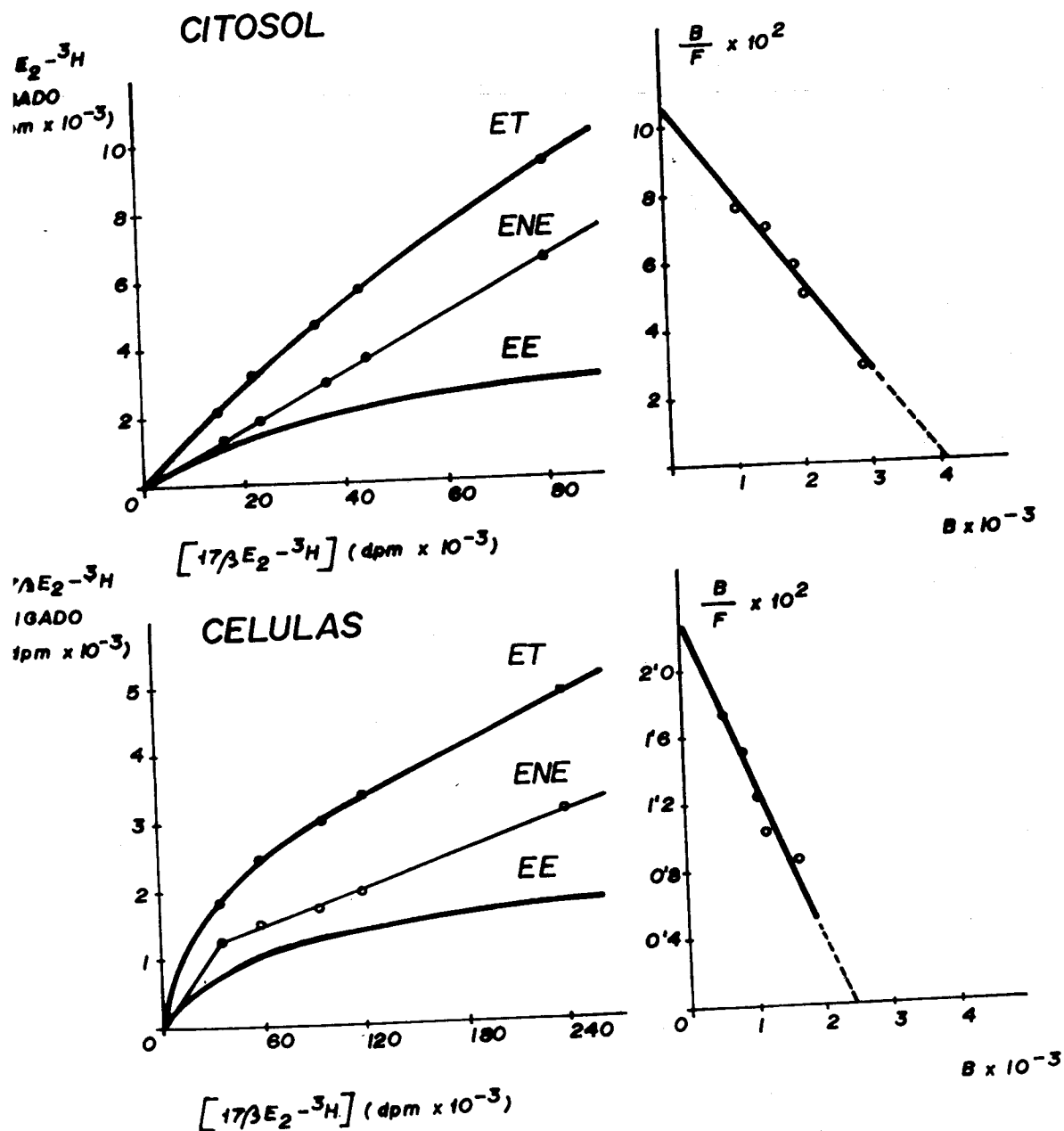
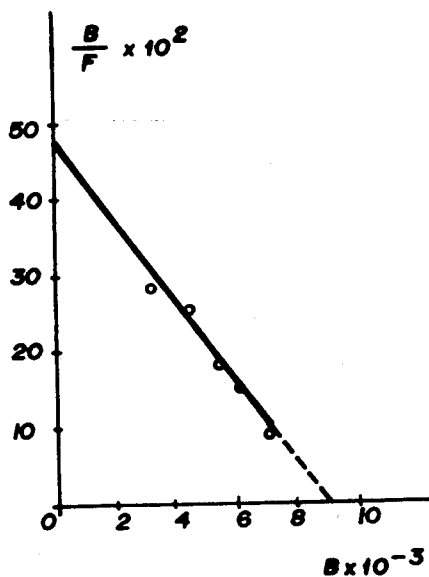
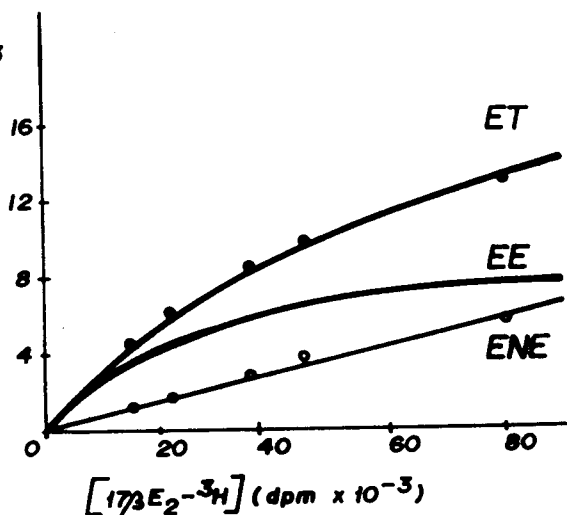


FIGURA. - 4.37

CURVAS DE SATURACION Y REPRESENTACION DE SCATCHARD DE LOS DATOS EXPERIMENTALES EN CITOSOL Y CELULAS INTACTAS. EXP.-V

CITOSOL

$^{17}\beta E_2-^3H$
LIGADO
dpm $\times 10^{-3}$



CELULAS

$^{17}\beta E_2-^3H$
LIGADO
dpm $\times 10^{-3}$

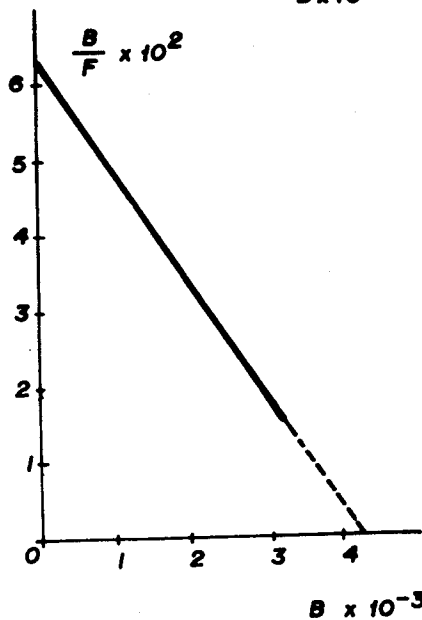
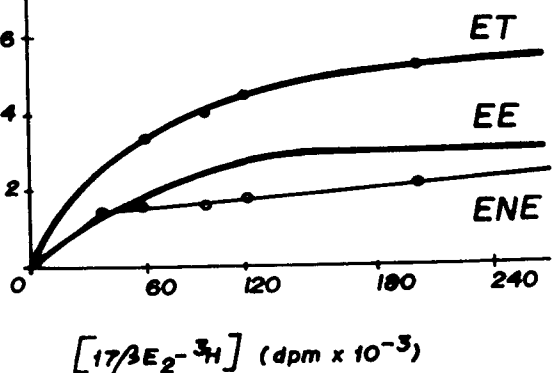


FIGURA. - 4.38

CURVAS DE SATURACION Y REPRESENTACION DE SCATCHARD DE LOS DATOS EXPERIMENTALES EN CITOSOL Y CELULAS INTACTAS. Exp. VI.

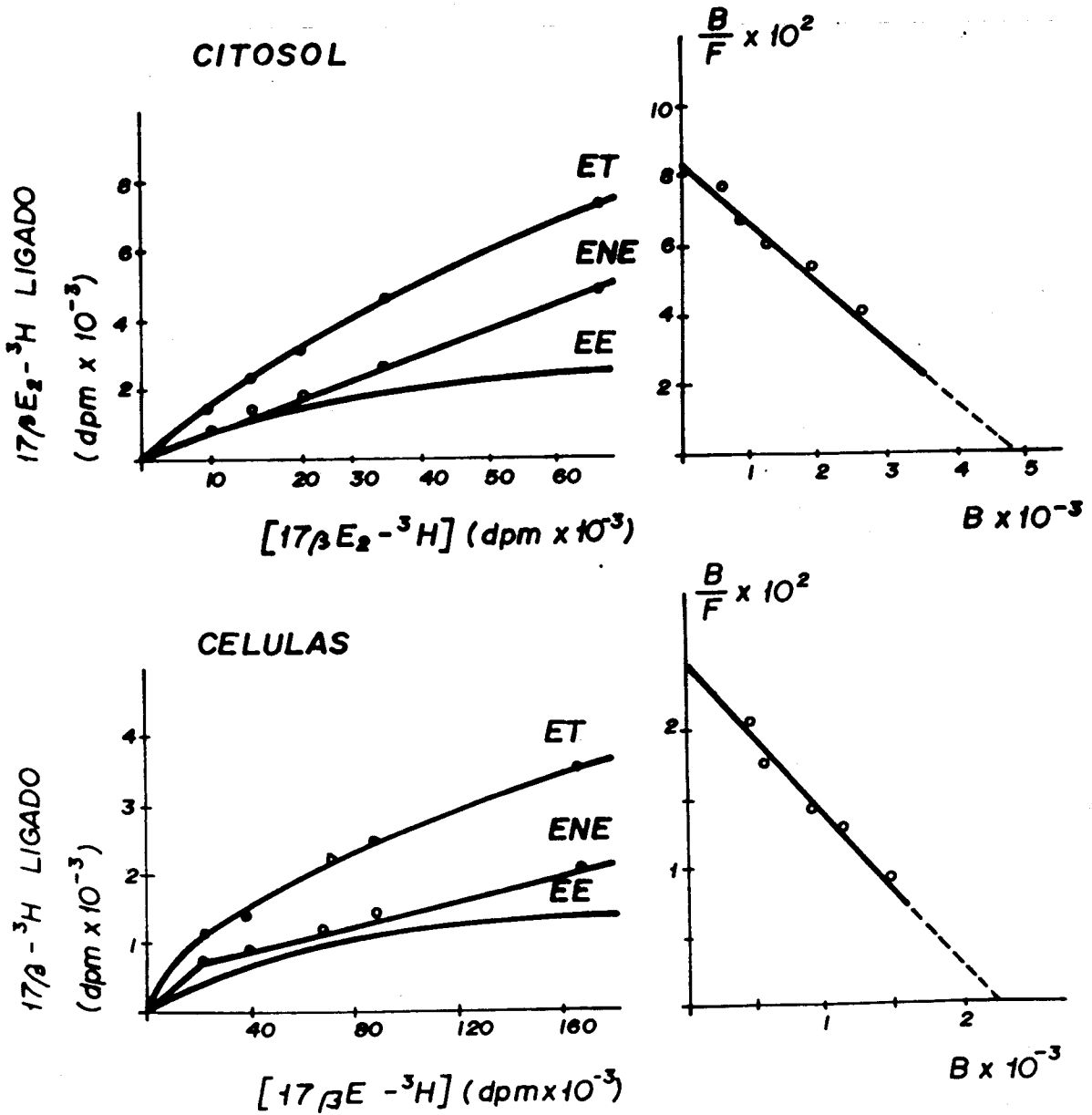


FIGURA. - 4.39

sorprendente hábita cuenta que el receptor citoplasmático es sólo una parte del receptor intracelular total o bien, aceptando las actuales hipótesis sobre localización intracelular del receptor (206,237,239, 253), la aparición de esta macromolécula en la fracción citosólica del homogeneizado tisular representa sólo un artefacto. (véase apartado 1.9).

Si bien el ensayo sobre células completas puede representar un avance metodológico importante en cuanto al estudio de los mecanismos de la hormonodependencia celular, no tenemos argumentos suficientemente serios como para considerar que, cuantitativamente, este ensayo supera al método tradicional y sólo la aplicación rutinaria del mismo a la oncología clínica, el seguimiento de las enfermas de cáncer de mama y la confrontación de los resultados del test en células intactas, con la respuesta a las manipulaciones terapéuticas hormonales de las pacientes, podrá esclarecer qué método permite una mejor aproximación al pronóstico de la enfermedad y al intento de predicción de la hormonodependencia del tumor.

4.5.5. El Control Negativo del Ensayo

Queda por resolver, por último, la siguiente cuestión: ¿Cuál es el resultado del ensayo RE sobre células no estrógeno-dependientes? Evidentemente si el test funciona, la respuesta a esta pregunta es obvia: El ensayo debe ser negativo. En efecto, utilizando una suspensión celular preparada a partir del riñón del conejo, los resultados obtenidos para la incorporación intracelular de $17\beta E_2-^3H$ son los mismos tanto en presencia como en ausencia de $17\beta E_2$ frío (tabla III-33 y figura 4.40). Este hecho, demostrativo en sí mismo, de la ausencia de moléculas capaces de enlazar específicamente al estradiol en tejidos no "blancos" de la acción estrogénica, válida el procedimiento ensayado en cuanto a la distinción cualitativa del carácter de hormonodependencia celular.

ENLACE DEL $17\beta E_2-^3H$ EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE $17\beta E_2$ EN CELULAS INTACTAS DE UTERO Y RIÑON DE CONEJO.

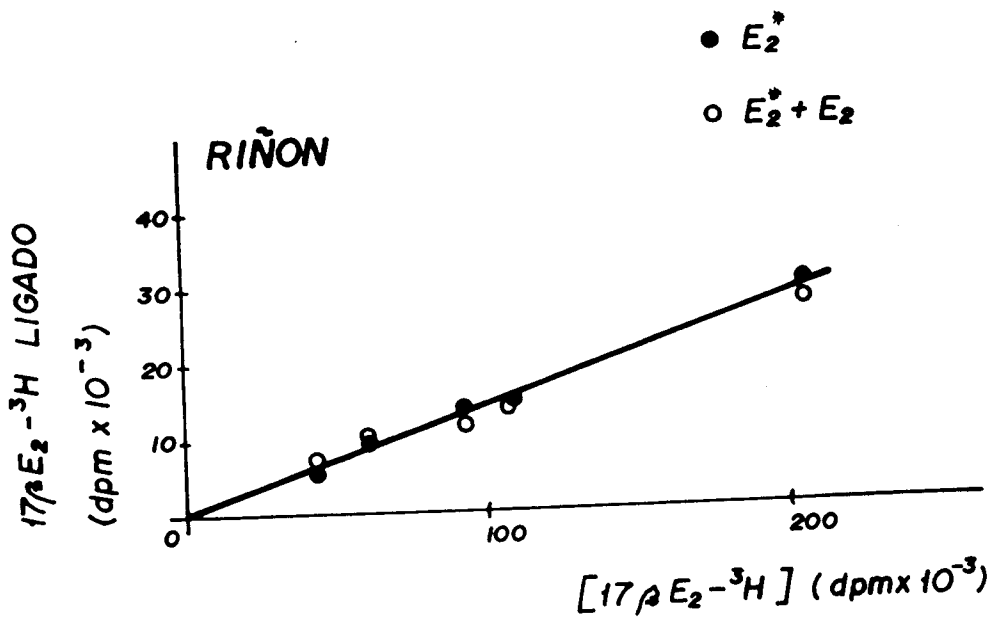
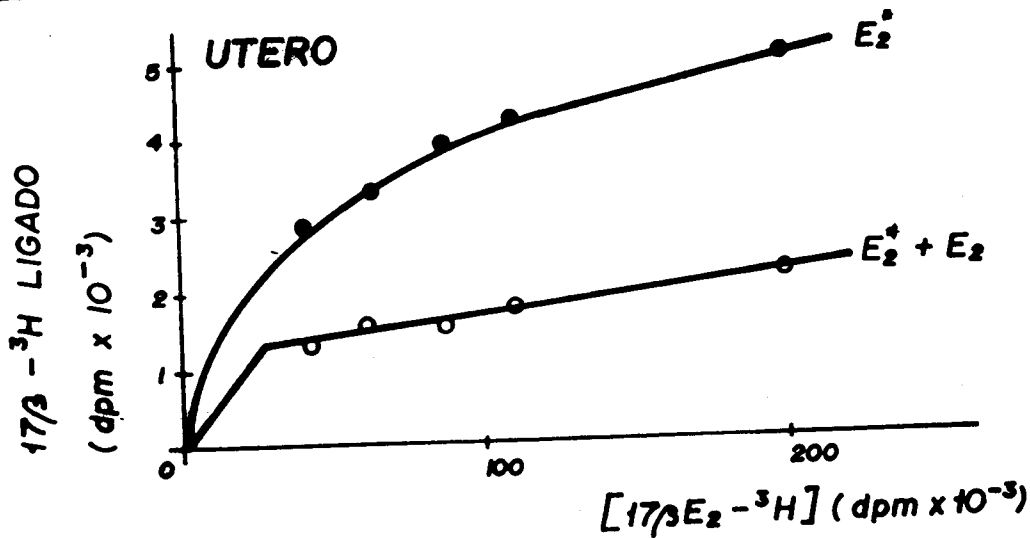


FIGURA. - 4.40

4.5.6. El Ensayo de RE sobre Células separadas por Centrifugación en "Percoll"

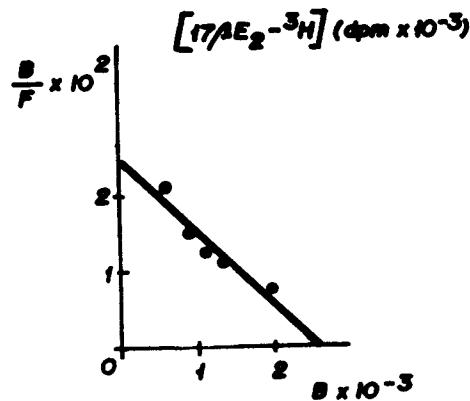
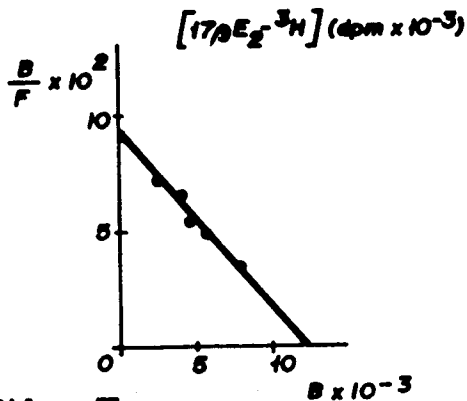
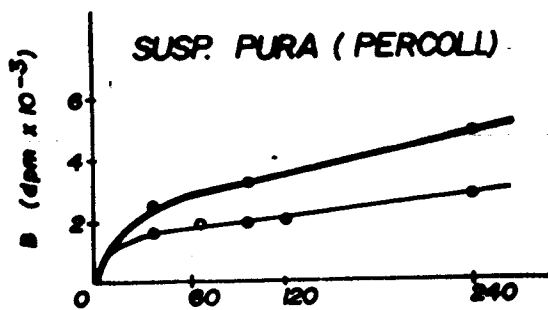
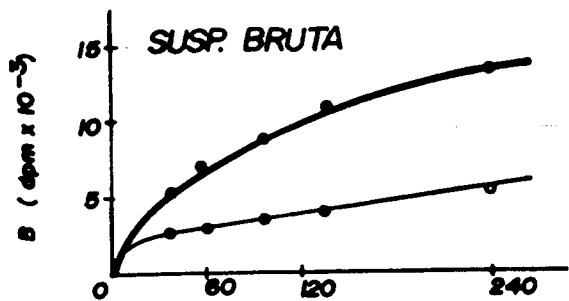
La propiedad celular que denominamos hormonodependencia no se modifica cuando las células son sometidas a centrifugación en gradiente de Percoll. Este procedimiento nos ha permitido separar las células uterinas "vivas" de células no viables y de otros componentes celulares que contaminan la suspensión. Los ensayos realizados (figura 4.41) apoyan este argumento y posibilitan la realización simultánea de otros ensayos conducentes a conseguir una mejor comprensión de la biología tumoral y de los mecanismos de respuesta celular a diversos esquemas terapéuticos.

4.5.7. El Ensayo de Receptores Estrogénicos en Cáncer de Mama Humano

Finalmente, la tabla IV-16 recoge los parámetros derivados del ensayo RE sobre células intactas y RE sobre citosol en los 8 casos de cáncer de mama incluidos en este trabajo. De su análisis es fácil comprobar que cuando el ensayo RE en citosol es positivo, el resultado del test en células intactas es también positivo cualquiera que sea el procedimiento de análisis (simple o múltiple) utilizado. La situación contraria RE citosol (-) muestra también una estrecha correlación con el carácter (+) o (-) que ofrece el ensayo en células salvo en el caso nº 1 en el que el valor de B_{Max} calculado por RE células es muy bajo y en el caso nº 6 en el que los resultados obtenidos en células no permiten decidir si el tumor era RE(+) o RE(-).

EFECTO DE LA SEPARACION CELULAR CON PERCOLL SOBRE EL ENSAYO DE RECEPTORES. CURVAS DE SATURACION Y TRANSFORMACION DE SCATCHARD.

EXPERIENCIA. - I



EXPERIENCIA. - II

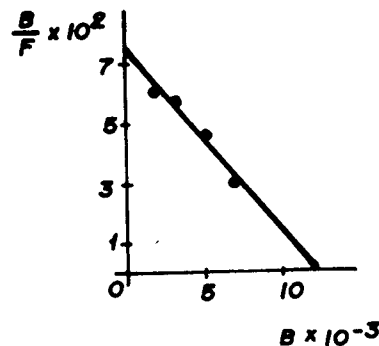
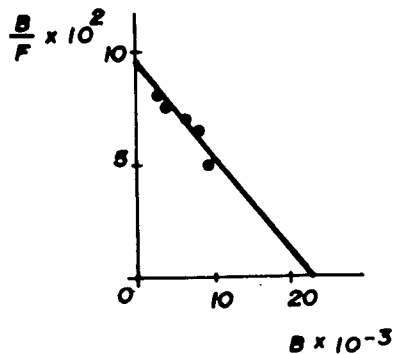
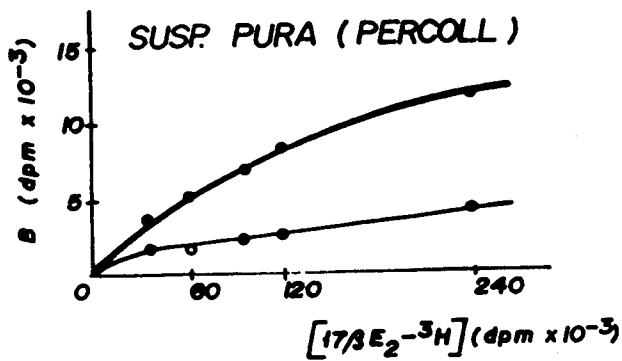
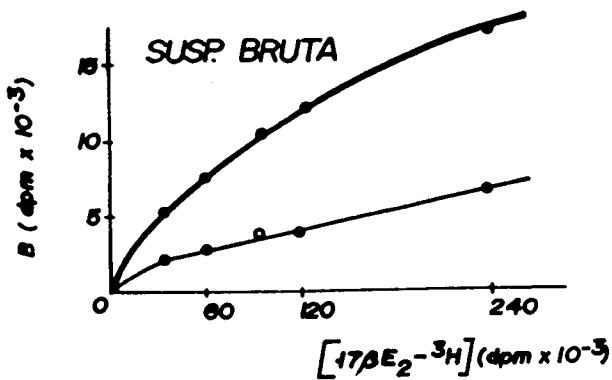


FIGURA. - 4.41

V. CONCLUSIONES

V. CONCLUSIONES

El análisis de los resultados obtenidos en este trabajo y su comparación con los encontrados en la literatura ha hecho posible, entre otros, el establecimiento de las siguientes conclusiones:

1.- El tratamiento enzimático de tejidos hormonodependiente seguido de disgregación mecánica suave, en las condiciones expresadas en esta memoria, constituye un método óptimo para la obtención de suspensiones celulares útiles para el ensayo de Receptores de Estrógenos sobre células intactas.

2.- El procedimiento clásico de determinación de receptores sobre citosol presenta problemas de precisión para bajos valores de concentración de Receptor. En efecto, en tal situación, el coeficiente de variación intra e inter ensayo -tanto para la máxima capacidad de enlace como para la constante de disociación del complejo RE- ha resultado muy elevado (c.v. \approx 25%).

3.- La proteína receptora presente, en concentraciones variables, en el espécimen biológico utilizado para los ensayos (citosol procedente de homogeneizado de tejidos hormonodependientes, tumorales o no) sufre un rápido proceso de degradación de cuyo mecanismo y/o características se puede afirmar que i) ocurre espontáneamente, ii) depende de la temperatura, iii) es influenciado por las condiciones físico-químicas del ensayo y iv) está mediado por la acción de enzimas proteolíticos endógenos.

4.- Aunque el valor de la máxima capacidad de enlace del estradiol a la proteína receptora puede estimarse con suficiente seguridad utilizando las representaciones de Scatchard o de Lineweaver-Burk, el mejor ajuste de los datos experimentales a l

ecuación doble recíproca debe conducir al empleo generalizado de esta última en el tratamiento de los datos de enlace obtenidos en los ensayos de determinación de RE sobre citosol.

5.- Teniendo en cuenta que la captación específica del estradiol por la célula intacta es un proceso que alcanza su valor máximo, para la temperatura de 37°C, a los 20 minutos de iniciada la experiencia, la prolongación del tiempo de incubación puede conducir por "transformación" del receptor (o degradación del mismo en ausencia de condiciones de esterilidad) al hallazgo de resultados Negativos Falsos que hagan considerar Hormono-independientes a una población celular que, en realidad opera bajo la dependencia de mecanismos hormonales.

6.- En la fase inicial de la captación intracelular del estradiol cabe distinguir dos etapas: a) La penetración del estrógeno en la célula proceso cuyas características ($E_a = 9 \text{ Kcal/mol}$, $H = 11 \text{ Kcal/mol}$, $S = 32 \text{ cal/mol} \cdot ^\circ\text{K}$) sugieren la existencia de un mecanismo de difusión pasiva sin la intervención de receptores de membrana o proteínas específicas de transporte y b) la formación del complejo RE ($E_a = 5,2 \text{ Kcal/mol}$), fenómeno limitado de velocidad, dependiente de la concentración de receptor saturable por la hormona.

7.- La cinética de formación del complejo RE revela que el proceso es de orden cero con respecto al tiempo e independiente de la concentración de ligando, circunstancia que permite excluir la existencia de fenómenos de cooperatividad para la reacción, al menos en su primera fase ($^nH = 0,98 \pm 1$), y admitir la equivalencia de todos los lugares de unión para el $17\beta \text{ E}_2$ existentes en el receptor.

8.- La utilización de células uterinas intactas como modelo de estudio de la hormonodependencia celular posibilita el análisis de los mecanismos de inhibición que ciertas moléculas esteroideas, estrogénicas o no, ejercen sobre el enlace Receptor.

-estradiol. Así, aplicando la ecuación de Lineweaver-Burk, hemos podido poner de manifiesto la existencia de mecanismos de inhibición simples (competitivos: DES y $17\beta E_2$ y no competitivos: Testosterona y Estrona) y mecanismos alostéricos complejos (antiestrógenos: TAM e OH-TAM).

Como los datos de enlace observados en la formación del complejo R-E, en presencia y ausencia de TAM e OH-TAM difiere significativamente para citosol ($n_H \approx 0,5$) y células intactas ($n_H \approx 1,5$) cabe concluir:

8.1.- Que el receptor citosólico no refleja con suficiente exactitud los acontecimientos bioquímicos intracelulares desencadenantes de la respuesta de los tejidos "blanco" a la acción hormonal.

8.2.- Que la proteína extraída en la fracción soluble del homogeneizado tisular no representa un modelo de estudio adecuado para el conocimiento de los mecanismos de interacción Receptor-Estrógeno-Antiestrógeno.

8.3.- Que, en consecuencia, el ensayo sobre células intactas debería imponerse metodológicamente, al menos en lo que a conocimientos básicos se refiere, en los laboratorios interesados en la investigación de la hormonodependencia celular.

Queda por determinar, en este sentido, si los resultados ofrecidos por el ensayo sobre células intactas se traducen, a nivel clínico, por una mayor precisión en la determinación del carácter hormonodependiente de algunos tumores y en consecuencia por, una mejor selección de pacientes para tratamiento hormonal. Mientras no se produzca este esclarecimiento parece legítimo utilizar, si es posible, ambos procedimientos en el intento de contribuir a la mejor calidad asistencial de los enfermos afectados de cáncer de mama.

VI. BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- 1.- ALLEGRA, J.C.; KORAT, O.; DO, H.M.T. et al (1.981).:
The regulation of progesterone receptor by 17β Estradiol and Tamoxifen in the ZR-75-1 Human Breast cancer cell line in defined medium.
J. Recep. Res. 2:17-27
- 2.- AMERICAN CANCER SOCIETY. (1.980).:
Cancer Facts and Figures.
American Cancer Society.
- 3.- ANDERSON, J.N.; CLARK, J.H.; PECK, E.J. (1.972).:
Oestrogen and nuclear binding sites: Determination of specific sites by [^3H] o estradiol exchange.
Biochem J. 126: 561-567
- 4.- ANTONIADES, K.; SPECTOR, H. (1.979).:
Correlation of estrogen receptor levels with histology and cytomo-phology in human cancer.
Am. J. Clin. Pathol. 71: 497-503
- 5.- ARMITAGE, P.; McPHERSON, C.K.; COPAS, J.C. (1.969).:
Statistical studies of prognosis in advanced breast cancer
J. Chron Dis, 22,343-360
- 6.- BEATSON, G.T. (1.896).:
On the Treatment of inoperable cases of carcinoma of man
Suggestion for a new method of treatment with illustrative cases.
Lancet, 2, 104-107

- 7.- BENRAAD, T.H.; KOENDERS, A. (1.980).:
Estradiol receptors activity in lyophilized calf uterus and human breast tumor tissue.
Cancer 46: 2762-2764

- 8.- BERGINK, E.W.; VAN MEEL, F.; TURPIJN, E.W. et al (1.983).:
Binding of Progestagens to Receptor Proteins in MCF-7 cells.
J. Steroids Biochem. 19: 1563-1570

- 9.- BISHOP, H.M.; BLANEY, R.W.; ELSTON, L.W. et al (1.979).:
Relation-ship of estrogen receptor status to survival in breast cancer.
Lancet 2: 283-284

- 10.- BLOCK, C.E.; ELLIS, R.S.; DESOMBRE, E. et al (1.978).:
Estrogen receptor in human breast cancer.
Ann. Surg. 188: 372-381

- 11.- BLOOM, N.; TOBIN, E.H.; SCHREIBMAN, B. et al (1.980).:
The role of progesterone receptors in the management of advanced breast cancer.
Cancer Res. 45: 2992-2997

- 12.- BOJAR, H.; STAIB, W.; BECK, K. et al (1.980)/:
Investigation on the Thermostability of steroid Hormone receptors in liophilized calf uterine tissue Powder.
Cancer 46: 2770-2774

- 13.- BONADONE, G.; ROSSI, A. et al (1.977).: Adjuvant chemotherapy with CMF in breast cancer with positive axillary nodes.
In "Adjuvant therapy of cancer" Elsevier, North Holland, Amsterdam.
- 14.- BORDIN, S.; PETRA, P.H. (1.980).: Immunocytochemical localization of the sex steroid binding protein of plasma in tissues of the adult monkey *Macaca nemestrina*.
Proc. Natn. Acad. Sci USA, 77: 5678-5682
- 15.- BORTHWICK, N.M.; SMELLIE, R.M.S. (1.975).: The effects of oestradiol-17 β on the ribonucleic acid polymerases of immature rabbit uterus.
Biochem. J, 147: 91-101
- 16.- 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
- 17.- BRAUNSBURG, H.; KILLEN, E.; RICHARDSON, S.G. (1.972) .: The effect of thiols on oestradiol binding by components of human malignant breast tumors.
Biochem. J. 130:38 p.

- 18.- BULBROOK, R.D.; GREWOOD, F.C.; HAYWARD, J.L. (1.960).: Selection of breast cancer patients for adrenalectomy or hipophysectomy by determination of urinary 17-Hidroxi- -corticosteroids and ethiocholanolone. Lancet. 1: 1154-1161.
- 19.- BULLER, R.E.; SCHRADER, W.; O'MALLEY, B.W. (1.975).: Progesterone binding components of chick oviduct. IX The kinetic of nuclear binding. J. Biol. Chem. 250: 809-818.
- 20.- BURTON, K. (1.956).: A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. Biochem. J. 62: 315-323.
- 21.- CAPONY, F.; ROCHEFORT, H. (1.975).: In vivo effect of anti-estrogen on the localization and repletion of estrogen receptor. Moll. cell. Endocrinol. 3: 233-236.
- 22.- CARTER, A.C. (1.977).: Diethylstilbestrol: Recommended dosages for different categories of breast cancer patients. Report of the cooperative Breast cancer Group. JAMA 237: 2079-2085.
- 23.- CARTER, S.; GLASTEIN, E.; LIVINGSTON, R. (1.982).: Principles of cancer treatment. McGraw - Hill Book Company.

- 24.- CHAN, L.; MEANS, A.S.; O'MALLEY, B.W. et al (1.973).: Rates of induction of specific translatable messenger - RNA's for ovalbumin and avidin by steroid hormones. Proc. Natl Acad. Sci. USA, 70: 1870-1874
- 25.- CHAN, L.; O'MALLEY, B.W. (1.976).: Mechanism of action of the sex steroid Hormones. N. Engl. J. Med. 10: 1322-1328.
- 26.- CHAMNESS, G.C.; HUFF, K.; McGUIRE, W.L. (1.975).: Protamine-precipitated estrogen receptor: A solid phases - ligand exchange assay. Steroids 25: 627-635.
- 27.- CHAMNESS, G.C.; McGUIRE, W.L. (1.975).: Extraction artifacts in the preparation of estrogen receptors. Methods Enzymol. 36: 176-182.
- 28.- CHAMNESS, G.C.; McGUIRE, W.L. (1.979).: Steroid receptor assay methods in human breast cancer. In "Steroid receptors and the management of cancer", Thomson E.B., Lippmann ME., eds. CRC Press Inc. Boca Raton, Floride, pag. 3-30.
- 29.- CHESTER, Z.; FEMERTY, P.; KELLIE, A.E. et al (1.975).: Estrogen receptor in primary breast tumor in relation to the stage and progression of the disease. In "Estrogen Receptors in Human Breast cancer". McGuire WL, Volmer EP, Carbone PP eds. Raven Press. New York.

- 30.- CHURCH, R.B.; McCARTHY, B.J. (1.970).: Unestable nuclear synthesis following estrogen stimulation
Biochim. Biophys. Acta, 199: 103-114.
- 31.- CLARK, J.H.; PECK, E.J. (1.976).: Nuclear retention of receptor-oestrogen complex and nuclear receptor sites.
Nature 260: 635-637.
- 32.- CLARK, J.H.; HARDIN, J.W.; UPCHURCH, S. et al (1.978).: Heterogeneity of estrogen binding sites in the cytosol of the rat uterus.
J. Biol. Chem. 253: 7630-7634.
- 33.- CLARK, J.H.; PECK, E.J. (1.979).: Female sex steroids. Receptors and function.
Springer Verlag Eds. New York.
- 34.- COHEN, M.E.; HAMILTON, T.H. (1.975).: Effect of estradiol-17 β on the synthesis of specific uterine non histone chromosomal proteins.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA; 72: 4346-4350
- 35.- COLE, M.P.; (1.968).: Suppression of ovarian function, in primary breast cancer
In "Prognostic Factors in Breast Cancer" Churchill, Livingstone, Eds. Edinburgh.

- 36.- COLE, M.P.; JONES, C.T.; JONES, C.T.A. et al (1.971).: -
A New antiestrogenic agent in late breast cancer. An ear-
ly clinical appraisal of ICI46474.
Brit. J. Cancer 25: 270-277.
- 37.- COLE, M.P.; JONES, C.T.A.; TODD, I.D.H. (1.972).: -
The treatment of advanced carcinoma of the breast with the
antiestrogenic agent tamoxifen (ICI46474). A Series of 96/
Patients.
Adv. Antimicrob. Antineoplas. Chemother. 2: 529-536.
- 38.- COOPERATIVE BREAST CANCER GROUP. (1.961).: -
Progress report. Results of studies by Cooperative Breast -
cancer group 1.956-60.
Cancer chemother Rep. 11: 109-123.
- 39.- COOPERATIVE BREAST CANCER GROUP. (1.964).: -
Testosterone propionate Therapy in breast cancer.
J.A.M.A. 188: 1069-1082.
- 40.- COOPERATIVE BREAST CANCER GROUP. (1.964).: -
Results of studies 1.961-63.
Cancer Chemother. Rep. Suppl. 1, 41: 1-22.
- 41.- COUNCIL ON DRUGS, SUBCOMMITTEE ON BREAST AND GENITAL CANCER
(1.960).: -
Androgens and estrogens in the treatment of disseminated ma-
mary carcinoma. Retrospective Study of 944 patient.
J.A.M.A. 172: 1271-1274.

- 42.- COURTENAY, V.D.; SELBY, P.J.; SMITH, J.E. et al (1.978).: Growth of human tumor cell colonies from biopsies using - two soft-agar techmignes.
Br. J. Cancer 38: 77-81.
- 43.- COWAN, S.; LOVE, C.; LEAKE, R.E.; (1.984).: The value of determinations of nuclear oestrogen receptors in breast cancer biopsies. In "Clinical interest of steroid hormone receptors in breast cancer" Leclercq G, Toma S, - Paridaens R, Heuson J.C., eds.
Springer-Verlag, Berlin, pag 50-60.
- 44.- COX, R.F.; HAINES, M.E.; CAREY, N.H. (1.973).: Modification of the template capacity of chick oviduct chromatin form-B RNA polymerase by estradiol.
Eur. J. Biochem. 32: 513-524.
- 45.- CUTLER, S.J.; CHRISTINE, B.; BARCLAY, T.H.C. (1.971).: Increasing incidence and decreasing mortality rates for - breast cancer.
Cancer 28: 1376-1380.
- 46.- DAHLQUIST, F.W. (1.978).: The meaning of scatchard and Hill plots. "Enzyme estructure Nielsen T.B. and Reynolds J.A. Cap. 13 eds..
Academic press. New York.

- 47.- DAXENBICHLER, G.; LECLERCQ, G.; THORPE, S.M. et al (1984).: Laboratories performing receptor assays. In "clinical interest of steroid hormone receptors in breast cancer". Leclercq G, Tema, S, Paridaens R, Heuson J.C. eds. Springer-Verlag, Berlin, pag 309-348.
- 48.- De ANGELO, A.B.; GORSKI, J. (1.970).: Role of RNA synthesis in the estrogen induction of a specific uterine protein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 66: 693-700.
- 49.- DELETTRE, J.; MORNON, J.P.; RAYNAUD, J.P. (1.980).: An approach the Mapping of the steroid hormone receptor. "Perspectives in steroids receptors". Brescian, F, eds. Raven Press, New York. pag 1-21.
- 50.- Del MORAL, R. (1.985).: Receptores de progesterona y cáncer de mama. Tesis doctor. Universidad de Granada. Trabajo en curso.
- 51.- De RYCK, L.M.H.; ROSS, J.B.A.; PETRA, P.H. et al (1.985). Estradiol entry into endometrial cells in suspension. J. Steroid. Biochem. 23: 145-152.
- 52.- De SOMBRE, E.R.; CARBONE, P.P.; JENSON, E.V. et al (1.97 Steroids in breast cancer. N. Eng. J. Med 301: 1011-1019.

- 53.- DEVLEESCHOUWER, N. (1.983).:
Evaluation de L'activite antitumorale de molecules se liant
an recepteur d'oestrogene dans les tumeurs mammaires.
These presentte en vue de l'obtention du grade de Docteur -
en Sciences Universite Libre de Bruxelles.
- 54.- EDWARDS, D.P.; CHAMNESS, G.C.; McGUIRE, W.L. (1.979).:
Estrogen and progesterone receptor proteins in breast can-
cer.
Biochin Biophys Acta 560: 457-486.
- 55.- ENGLE, L.W.; YOUNG, N.A.; TRALKA, T.S. et al (1.978).:
Human Breast carcinoma cells in continuons culture. Establi
hement and characteristics of three new lines.
Cancer Res. 38: 3352-3359.
- 56.- ENGELHOLM, S.A.; SPANG-THOMSEN, M.; BRUNNER, N. et al (1985)
Disaggregation of human solid tumours by combined mechanical
and enzymatic method.
Br. J. Cancer 51: 93-98.
- 57.- EORTC Breast cancer cooperative Group (1.973).:
Standard for the assessment of estrogen receptors in human
breast cancer.
Eur. J. Cancer 9: 379-381.
- 58.- EXPOSITO HERNANDEZ, J. (1.984).:
Caracterización bioquímica y métodos de estudio de los rec
tores de estrógenos. Ensayos experimentales y aplicaciones
clínicas.
Tesis Doctoral. Facultad de Medicina. Universidad de Grana
Julio 1.984.

- 64.- FISHER, E.R.; REDMOND, C.K.; LIV, H. et al (1.980).:
Collaborating NSABP investigators: Correlation of estrogen
receptor and pathologic characteristics of invasive breast
cancer.
Cancer Res. 45: 349-353.
- 65.- FOLCA, P.J.; GLASCOCK, R.F.; IRVINE, W.T. (1.961).:
Studies with tritium labelled hexoestrol in advanced breast
cancer.
Lancet 2: 796-803.
- 66.- FREIFELD, M.L.; FEIL, P.D.; BARDIN, C.W. (1.974).:
The in vivo regulation of the progesterone "receptor" in Gui
nea pig uterus: Dependence on estrogen and progesterone.
Steroids 23: 93-103.
- 67.- GAROLA, R.E.; McGUIRE, W.L. (1.978).:
A Hydroxylapatite micromethod for measuring Estrogen recep-
tor in human breast cancer.
Cancer Res. 38: 2216-2220.
- 68.- GAPINSKI, P.V.; DONEGAN, W.L. (1.980).:
Estrogen receptors and breast cancer: Prognostic and thera-
peutic implications.
Surgery 88: 386-393.
- 69.- GELEHRTER, T.D. (1.973).:
Mechanisms of hormonal induction of enzymes.
Metabolism, 22: 85-100.

- 59.- 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.
- 60.- EXPOSITO, J.; RUIZ DE ALMODOVAR, J.M.; OLEA, N. et al (1985).: Ensayo de Receptores de estrógenos en cáncer de mama. Utilización de una única concentración saturante de hormona radiactiva (SSD). Laboratorio. En prensa.
- 61.- EORTC BREAST CANCER COOPERATIVE GROUP (1.980).: Revision of the standars for the assessment of hormone receptors in human breast cancer. Report of the scond EORTC Workshop, held on 16-17 March 1.979, in the Netherlands cancer -- Institute. Eur. J. Cancer 16: 1513-1515.
- 62.- FISHER, B.; REDMOND, C. (1.977).: Studies of the National Surgical Adjuvant Breast Project. - In "Adjuvant Therapy of cancer". Elsevier, North Holland, Amsterdam.
- 63.- FISHER, B.; CARBONE, P. (1.982).: Breast cancer. In "Cancer Medicine" Holland, J. Frei, E. eds. P. 2025. Lea and Febiger, Philadelphia.

- 70.- GIORGI, E.P.; STEIN, W.D. (1.981).:
The transport of Steroids into Animal Cell in Culture.
Endocrinology 108-2: 688-697.
- 71.- GLASSER, S.R.; CHYTIL, F.; SPELSBERG, T.C. (1.972).:
Early effects of oestradiol-17 β on the cromatin and acti-
vity of the deoxyribonucleic acid-dependent ribonucleic -
acid polymerases (I and II) of the rat uterus.
Biochem J. 130: 947-957.
- 72.- GLICK, M.R.; BURNS, A.H.; REDDY, W.J. (1.974).:
Dispersion and isolation of beating cells from adult rat -
heart.
Anal. Biochem. 62: 32-42.
- 73.- GOLDENBERG, L.S. (1.973).:
Androgenia therapy for advanced breast cancer in women:
A report of the Cooperative Breast Cancer Group. J.A.M.A.
223: 1267-1274.
- 74.- GOLDENBERG, L.S. (1.969).:
Clinical trial of delta-L-Testolactone, medroxyprogesterone
and oxylone acetate in avanced female mamary cancer.
A report of the cooperative Breast Cancer Group. Cancer --
23: 1267-1273.
- 75.- GORSKI, J.; TOFT, D.; SHYMALA, G. et al (1.968).:
Studies on the interaction of estrogen with the uterus.
Recent prog. Horm. Res. 24: 45-80.

- 76.- GORGOJO, L. (1.986).:
Estudios sobre quimiosensibilidad y radiosensibilidad de
modelos tumorales "in vitro".
Tesis Doctoral. Facultad de Medicina. Trabajo en curso.
- 77.- GORGOJO, L.; OLEA, N.; VILLALBA, J. et al (1.985).:
Nuevo método para el ensayo "in vitro" de la Quimiosensi-
bilidad tumoral.
I Congreso Iberoamericano de Oncología. Madrid. Noviembre
1.985.
- 78.- GORSKI, J.; TOFT, D.; SHYAMALA, G. et al (1.968).:
Hormone receptors. Studies on the interaction of estrogen
with the uterus.
Recent Prog. Horm. Res. 24: 45-80.
- 79.- GORSKI, J. (1.964).:
Early estrogen effects on the activity of uterine ribonu-
cleic acid polymerasa.
J. Biol. Chem. 239: 889-892.
- 80.- GRILE, G.Jr. (1.965).:
Treatment of breast cancer by local excision.
Amer. J. Surg. 109: 400-409.
- 81.- HAHNEL, R.; PARTRIDGE, R.X.; GAVET, L. et al (1.980).:
Nuclear and cytoplasmic estrogen receptors and progesterone
receptors in breast cancer.
Eur. J. Cancer 16: 1027-1032.

- 82.- HAMBURGER, A.W.; DUNN, F.E.; TENCER, K.L. (1.983).:
Separation on Percoll density gradients of cells derived -
from malignant ascites in mice.
J. Natl. Cancer Inst. 70: 157-162.
- 83.- HAMBURGER, A.W.; DUNN, F.E.; WHITE, C.P. (1.985).:
Percoll density gradient separation of cells from human -
malignant effusions.
Br. J. Cancer 51: 253-258.
- 84.- HAMBURGER, A.W.; SALMON, S.E. (1.977).:
Primary bioassay of human tumor stem cells.
Science 197: 461-463.
- 85.- HAMBURGER, A.W.; WHITE, C.P. (1.982).:
Interactions between macrophager and human tumor clonoge--
nic cells.
Stem cells 1: 209-217.
- 86.- HAMBURGER, A.W.; WHITE, C.P.; DUNN, F.E. (1.983).:
Modulation of tumour colony growth by irradiated accessory
cells.
Br. J. Cancer 48: 675-681.
- 87.- HARRIS, G.S. (1.971).:
Nature of oestrogen specific binding sites in the nuclei -
of mouse uteri.
Nature (New Biol). 231, 246-248.

- 88.- HAWKINS, R.A.; HILLA, FREDMAN, B. (1.975).:
A simple method for the determination of oestrogen receptor concentrations in breast tumors and other tissues.
Clin. Chim. Acta. 64: 203-210.
- 89.- HECKER, E.; VEGN, I.; LEVY, C.M. et al (1.974).:
Clinical Trial of chomiphene in advanced breast cancer.
Europ. J. Cancer 10: 747-752.
- 90.- HEUSON. J.C. (1.975).:
Comparative trial of Nafoxidine and Ethinyl-Estradiol in advanced breast cancer. An EORTC Breast cancer Cooperative Group Study.
Brit. Med. J. 2: 711-717.
- 91.- HEUSON, J.C.; COUNE, A.; STAQUET, M. (1.972).:
Clinical trial of nafoxidine, an estrogen antagonist, in advanced breast cancer.
(E.O.R.T.C. Breast Cancer Group). Europ. J. Cancer 8: 387-394.
- 92.- HOFMANN, V.E.; BERENS, M.E.; FRUEH, U. (1.984).:
Tumor characteristic correlated with in vitro growth in the human tumor clonogenic assay (HTCA). In "Human Tumor Cloning".
Salmon S.E., Trent, J.M. eds. Grune and Stratton Incl. Orlando, Florida, pp 97-106.
- 93.- HORWITZ, K.B.; McGUIRE, W.L. (1.978).:
Actinomycin D Prevents nuclear processing of estrogen receptor.
J. Biol. Chem. 253: 6319-6322.

- 94.- HORWITZ, K.B.; McGUIRE, W.L. (1.980).:
Nuclear estrogen receptors: effect of inhibitors of processing and steady state levels.
J. Biol Chem 255: 9699-9705.
- 95.- HORWITZ, K.B.; McGUIRE, W.L. (1.978).:
Nuclear mechanisms of estrogen action effects of estradiol and antiestrogens on estrogen receptors and nuclear receptor processing.
J. Biol. Chem. 253: 8185-8191).
- 96.- HORWITZ, K.B.; McGUIRE, W.L. (1.978).:
Estrogen control of progesterone receptor in human breast cancer.
J. Biol. Chem, 253: 2223-2228.
- 97.- HORWITZ, K.B.; McGUIRE, W.L. (1.975).:
Specific progesterone "receptor" in human breast cancer.
Steroids 25: 497-505.
- 98.- HORWITZ, K.B.; McGUIRE, W.L.; PEARSON, O.H. et al (1.975).:
Predicting response to endocrine therapy in human breast cancer: A hypothesis.
Science 189: 726-729.
- 99.- HOWAT, J.M.T.; BARNES, D.M. (1.981).:
Oestrogen receptor status and management of breast cancer.
Lancet 1: 1317-1321.
- 100.- HUGGINS, C.; MAINZER, K. (1.957).:
Hormonal influences on mammary tumors of the rat.
J. Exper. Med. 105: 485-491.

- 101.- JENSEN, E.V. (1.967).:
Strogen receptors in hormone responsive tissue and tumors.
In "Endogenous Factors Influencing Host-tumor Balance".
University of Chicago, Illinois.
- 102.- JENSEN, E.V.; BLOCK, G.E.; SMITH, S. et al (1.971).:
Estrogen receptors and breast cancer response to adrenalectomy.
Natl. Cancer Inst. Monogr. 34: 55-70.
- 103.- JENSEN, E.V.; DeSOMBRE, E.R. (1.972).:
Mechanism of action of the female sexhormone.
Annu. Rev. Biochem. 41: 203-230.
- 104.- JENSEN, E.V.; DeSOMBRE, E.R.; JUNGBLUT, P.N. (1.967).:
Estrogen receptors in hormone-responsive tissue and tumors
In "Endogenous factors influencing host-tumor balance".
Wisler R.W, Dao, T.L., Woods S. eds.
University of Chicago. Illinois.
- 105.- JENSEN, E.V.; DeSOMBRE, E.R.; JUNGBLUT, P.W. (1.966).:
Proc. Second International Congress of Endocrinology on
Hormone steroids,
Martini L, Fraschimi F, Motta M, eds. Excerpta Medica
Fondation pp 492. Amsterdam.
- 106.- JENSEN, E.V.; JACOBSON, H.I. (1.962).:
Basic guides to mechanism of estrogen action.
Recent. Prog. Horm. Res. 18: 387-393.

- 107.- JENSEN, E.V.; JACOBSON, H.I. (1.960).:
Fate of steroids Estrogens in Target Tissues.
In "Biological Activities of Steroids in Relation to Cancer". Academic Press. New York.
- 108.- JENSEN, E.V.; JACOBSON, H.I.; FLESHER, J.V. y col (1.966).:
In Steroid Dinamics.
T. NaKao, G. Pincusqud J.W. Tait ed. Academic Press New -
York pp 133.
- 109.- JENSEN, E.V.; SMITH, S.; DeSOMBRE, E.R. (1.976).:
Hormone dependency in breast cancer.
J. Steroid Biochem. 7: 911-923.
- 110.- JENSEN, E.V.; SUZUKI, T.; KAWASHIMA, T. et al (1.968).:
A Two-step Mechanism for the interaction of estradiol with
rat uterus.
Biochem. 59, 632-638.
- 111.- KASID, A.; STROBL, J.S.; HUFF, K. et al (1.984).:
A novel nuclear form of estradiol receptor in MCF-7. Hu--
man breast cancer cells.
Science, Vol 225: 1162-1165.
- 112.- KATZENELLENBOGEN, B.S.; GORSKI, J. (1.972).:
Estrogen action in vitro; induction of the synthesis of a
specific uterine protein.
J. Biol. Chem. 247: 1299-1305.

- 113.- KEIGHTLEY, D.D.; CRESSIE, N.A.C. (1.980).:
Analysis of hormone receptor assay data by scatchard, reciprocal and woolf plots. In "Estrogen receptor assays in breast cancer" laboratory Discrepancies and Quality Assurance.
Sarfaty G.A., Nash A.R., y Keightley D.D. eds. Masson Publishing Inc. New York pp 210-224.
- 114.- KENNEDY, B.J. (1.958).:
Fluoxymesterone therapy in advanced breast cancer.
N. Engl. J. Med. 259: 673-679.
- 115.- KENEDY, B.J. (1.965).:
Diethylstilbestrol versus Testosterone propionate therapy in advanced breast cancer.
Surg. Gynecol. Obtet. 120: 1246-1251.
- 116.- KENNEDY, B.J. (1.970).:
Hormonal therapies in breast cancer: androgens versus estrogens. "In Breast Cancer Early and Late" Thyrteenth- Annual Clinical Conference on Cancer. M.D. Anderson Hospital and Tumor. Institute. Year Book. Med. Pub. Houston Texas. USA.
- 117.- KENNEDY, B.J. (1.970).:
Hormonal therapies in breast cancer: androgens versus estrogens. In "Breast Cancer Early and Late" thirteenth Annual Clinical Conference on Cancer. M.D. Anderson Hospital and Tumor Institute. Year Book Med. Pub. Houston. Texas. USA.

- 118.- KERN, W.H. (1.979).: Morphologic and clinical aspects of estrogen receptors in carcinoma of the breast. Surg. Gynecol. Obstet. 148: 240-242.
- 119.- KING, R.J.B. ed. (1.979).: Steroid Receptor Assays in human breast Tumors: Methodological and clinical aspects. Alpha Omega, Cardiff 1.979.
- 120.- KING, R.J.B.; BARNES, D.M.; HAWKINS, R.A. et al (1.978).: Measurement of oestradiol Receptors by five institutions on common tissue samples. Br. J. Cancer, 38: 428-430.
- 121.- KING, R.D.; BAMES, D.M.; HAWKINS, R.A. et al (1.978).: Measurement of estradiol receptor by five institutions - on common tissues sample. Br. J. Cancer, 38: 428-430.
- 122.- KING, R.V.; HAYWARD, J.L.; HAWKINS, R.A. et al (1.980).: Steroid receptors assays and prognostic aids in the treatment of breast cancer. In "Steroid Receptors and Hormone Dependent Neoplasia". Wittlif J.L. and Dapunt O. eds. Masson, New York.
- 123.- KING, R.B.J.; SOMJEN, D.; KAYE, A.M. et al (1.974).: Stimulation by oestradiol 17- β of specific cytoplasmic and chromosomal protein synthesis in immature rat uterus. Moll. cell. Endocrinol. 1: 21-36.

- 124.- KINNE, D.W.; ASHIKARI, R.; BUTLER, A. et al (1.981).: Estrogen receptor protein in breast cancer as predictor of recurrence.
Cancer 47: 2364-2367.
- 125.- KNIGHT, W.A.; LIVINGSTON, R.B.; GREGORY, E.J. et al -- (1.977).: Estrogen receptors as an independent pronostic. factor - for carly recurrence in breast cancer.
Cancer Res; 37: 4669-4671.
- 126.- KUTE, R.E.; HEIDEMAMN, P.; TTLIFF, J.L. (1.978).: Molecular heterogenity of cytosolic forms of estrogen re- ceptors in human breast tumors.
Cancer Res. 38: 4307-4313.
- 127.- KNOWLER, J.T.; SMELLIE, R.M.S. (1.973).: The oestrogen-stimulated syntesis of heterogeneons nucle- ar ribonucleic acid in the uterus of immature rats.
Biochem. J. 131: 689-697.
- 128.- KNOWLER, J.T.; SMILLIE, R.M.E. (1.971).: The synthesis of ribonucleic acid in immature rat uterus responding to oestradiol-17 β .
Biochem. J. 125: 605-614.
- 129.- KORENMAN, S.J.; DUKES, B.A. (1.970).: Specific estrogen binding by the cytoplasm of human breast carcinoma.
J. Clin. Endocrinol. 30: 639-647.

- 130.- KOENDERS, A.; BENRAAD, T.H. (1.981).: Preparation of lyophilized reference samples for quality control of steroid receptor measurement. Ligand. Rev. 3: 32-39.
- 131.- KOENDERS, A.; THORPE, S.M. (1.983).: Standardization of steroid receptors assays in human - - breast cancer. I. Reproducibility of Estradiol and Progesterone Receptor Assays. Eur. J. Clin. Oncol, 19: 1221-1229.
- 132.- KOENDERS, A.; THORPE, S.M. (1.983).: Standardization of steroid receptor assays in human - - breast cancer. II Samples with low Receptor content. Eur. J. Cancer. Clin. Oncol 19: 1467-1472.
- 133.- KOENDERS, A.; THORPE, S.M. (1.983).: Standardization of steroid receptor assays in human breast cancer. I Reproducibility of estradiol and progesterone receptor assays. Eur. J. Cancer. Clin. Oncol. 19: 1221-1227.
- 134.- KORSTEN, C.B.; PERSIJN, J.P. (1.972).: A simple assay for specific estrogen binding capacity in human mammary tumours. Z. Klin. Chem. Klin. Biochem 10: 1-7.
- 135.- KOREMAN, S.G. (1.975).: Estrogen receptor assay in human breast cancer. J. Natl. Cancer. Inst. 55: 543-549.

- 136.- KNIGHT, W.A.; LIVINGSTON, R.B.; GREGORY, et al (1.977).: Estrogen receptor as an independent pronostic factor for early recurrence in breast cancer.
Cancer Res. 37: 4669-4671.
- 137.- KING, W.J.; GREENE, G.L. (1.984).: Monoclonal antibodies localize oestrogen receptor in the nuclei of target cell.
Nature 307: 745-747.
- 138.- LAIDLER, K.J. (1.966).: Cinética de reacciones.
Ed. Alhambra S.A. Madrid. Pag 16.
- 139.- LEAKE, R.E. (1.976).: Current views on estrogen receptors.
Trends Biochem. Sci 1: 137-139.
- 140.- LECLERCQ, G.; DEVLEESCHOUWER, N.; HEUSON. J.C. (1.983).: Guide-lines in the design of new antiestrogens and cyto-sic-linked estrogens for the treatment of Breast Cancer.
J. steroid. Biochem. 19: 75-85.
- 141.- LECLERCQ, G.; HEUSON. J.C. (1.977).: Therapeutic significance of sex steroid hormone receptors in the treatment of breast cancer.
Eur. J. Cancer Clin. Oncol. 8, 1205-1212.

- 142.- LECLERCQ, G.; HEUSON, J.C. (1.979).:
Quantitative aspects of estrogens receptors in relation
to therapeutic response. In "Steroid Receptors and the -
management of cancer".
Thomson E.B. Lippman M.E. eds. CRC Press. Florida
- 143.- LECLERCQ, G.; HEUSON, J.C.; DEBOEL, M.C. et al (1.975).:
Oestrogen receptors in breast cancer: a changin concept.
Br. Med. J. 1: 185-189.
- 144.- LEGA, S.S.; DAVIS, H.L.; MUGICA, F.M.:
Hormonal therapy of breast cancer: New approaches and -
concepts.
Ann. Int. Med. 88: 69-79.
- 145.- LESSER, M.L.; ROSEN, P.P.; SENIE, R.T. et al (1.981).:
Estrogen and progesterone receptors in breast carcinoma -
correlations with epidemiology and pathology.
Cancer: 48: 299-309.
- 146.- LEVIZKI, A. (1.975).:
Subunit interactions in protein.
Enzimology 2: 1-41.
- 147.- LINEWEAVER, H.; BURK, D. (1.934).:
The determination of enzyme dissociation constants.
J. Am. Chem. Soc: 56, 658-666.
- 148.- LIPMAN, M.; KASID, A. (1.984).:
Role of Receptor Mediating steroid Hormone effects in hu-
man Breast cancer.
Cancer treatement Reports Vol 68, n° 1: 265-279.

- 149.- LIPPMAN, M.E.; DO, H.M.T.; HOCHBERG, B. (1.981).: Specific estrogen receptor binding and biological effects of 16- α -Iodoestradiol on human breast cancer cell.
Cancer Res. 41: 3150-3154.
- 150.- LOPEZ GONZALEZ, J. de D. (1.985).: TPA en células tumorales mamarias. Influencia de las hormonas esteroideas y de los antiestrógenos sobre su secreción.
Tesis Doctoral. Universidad de Granada. Trabajo en curso.
- 151.- LUCK, D.N.; HAMILTON, T.H. (1.972).: Early estrogen action: stimulation of the metabolism of high molecular weight and ribosomal RNAs.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA; 69: 157-161.
- 152.- LYTTLE, C.R.; DeSOMBRE, E.R. (1.977).: Generality of oestrogen stimulation of peroxidase activity in growth responsive tissues.
Nature 268: 337-339.
- 153.- MARTIN, P.M. SMERIDAN, P.J. (1.982).: Towards a new model for the mechanism of action of steroids.
J. Steroid, Biochem. 16: 215-229.
- 154.- MASON, B.H. (1.983).: Progesterone and estrogen receptor as prognostic variables in breast cancer.
Cancer. Res. 48: 2985-2991.

- 155.- McLAUGHLIN, W.H.; MILLUS, R.A.; GILL, L.M. et al (1.984).: The oil-microcentrifuge assay: A rapid and sensitive method for analyzing specific [³H]Estradiol binding in cultured cells.
J. Steroid Biochem, 20: 1129-1133.
- 156.- McGUIRE, W.L.; HORWITZ, K.; ZABA, D.T. et al (1.979).: Estrogen and progesterone receptors in human breast cancer. In "Steroid Receptor and the management of cancer". Thompson, E.B. and Lippman, M.E. eds. CRC Press. Florida.
- 157.- McGUIRE, W.L.; De La GARZA, M.; CHAMNESS, G.C. (1.977).: Evaluation of estrogen receptor assays in human breast cancer tissue.
Cancer Res. 37: 637-639.
- 158.- McGUIRE, W.L.; OSBORNE, C.R.; KNIGHT, W.A. et al (1.981). Estrogen and progesterone receptors in human breast cancer. In "Diagnosis and treatment of breast cancer". Lewison E.F., Montagne A.C.W. eds. Williams-Wilkins. Baltimore.
- 159.- McGUIRE, W.L. (1.978).: Hormones receptors and breast cancer.
Raven Press. New York.
- 160.- McGUIRE, W.L.; VOLLMER, E.P.; CARBONE, P.P. Eds. (1.975) Estrogen receptor in Human breast cancer.
Raven Press. New York.

- 161.- McGUIRE, W.L. (1.982).:
New Strategies for investigating Antiestrogen Action in
breast Cancer.
Cancer Research (Suppl.) 42: 3420-3423.
- 162.- McGUIRE, W.L.; VOLLMER, E.P.; CARBONE, P.P. eds (1.975).:
Estrogen receptor in human breast cancer.
Raven. Press. New York.
- 163.- McGUIRE, W.L. (1.973).:
Estrogen receptors in human breast cancer.
J. Clin. Invest. 52: 73-77.
- 164.- MAIRESSE, N.; GALAND, P. (1.977).:
Oestrogen-induced uterine protein: Presence of associated
phosphoprotein phosphatase activity beford oestrogen - -
treatment.
J. Endocr. 72: 81-85.
- 165.- MAIRESSE, N.; DEVLEESCHOUWER, N.; LECLERQ, G. et al (1981)
Estrogen-induced synthesis and secretion of proteins in
the human breast cancer cell line MCF-7.
J. Steroid Biochem.15: 375-381.
- 166.- MAIRESSE, N.; HEUSON, J.C.; GALAND, P. et al (1.977).:
Oestrogen-induced protein in rat mammary tumour and uteru
J. Endocr. 75: 331-332.

- 167.- MAYNARD, P.V.; BLAMEY, R.W.; ELSTON, C. W. et al (1.978).: Estrogen receptor assay in primary breast cancer and early recurrence of the disease. Cancer Res. 38: 4292-4295.
- 168.- MEAKIN, J.W. et al (1.977).: Ovarien irradiation and prednisone following surgery for carcinoma of the breast. In "Adjuvant therapy of cancer". Elsevier North Holland, Amsterdam.
- 169.- MEAKIN, J.W. (1.980).: Adjuvant endocrine therapy of breast cancer. In "Recent Results In Cancer Research". P. 178. Springer Verlag. Berlin.
- 170.- MEANS, A.R.; HAMILTON, T.H. (1.966).: Early estrogen action: concomitant stimulations within two minutes of nuclear RNA synthesis and uptake of RNA precursor by the uterus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA; 56: 1594-1598.
- 171.- MILGROM, E.; ATGER, M.; BAULIEV, E.E. (1.973).: Studies on estrogen entry into uterine cells and on estradiol-receptor complex attachment to the nucleus. Is the entry of estrogen into uterine cells a protein-mediated process? Biochim Biophys: Acta 320: 267-283.
- 172.- MUSLINER, T.A.; CHADER, G.J. (1.971).: Estradiol-receptor complex in a cell-free system. Biochem. Biophys Rev. Commun 45, 998-1003.

- 173.- MULLER, R.E.; WOTIZ, H.H. (1.979).:
An improved procedure for the preparation of rat uterine cell suspensions.
Steroids 33: 424-458.
- 174.- MULLER, R.E.; WOTIZ, H.H. (1.979).:
Kinetics of estradiol entry into uterine cells.
Endocrinology 105: 1107-1114.
- 175.- MUKHARJI, J.; ZACHARIAH, N.J.; CHAVAKJIAN, Z.H. et al -
(1.983).:
A fast and convenient method for Determinig Estrogen receptor using rabbit uterus as a standard,
Cancer Res. 43: 3143-3146.
- 176.- NATHANSON, I.T. (1.947).:
Endocrine aspects of cancer.
Recent. Prog. Horm. Res. 1: 261-266.
- 177.- NISSEN-MEYER, R. (1.964).:
Prophylactic, endocrine treatment, of carcinoma of the breast.
Clin. Radiol. 15: 152-159.
- 178.- NOTIDES, A.; GORSKI, J. (1.966).:
Estrogen-induced synthesis of a specific uterine protein.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA; 56: 230-235.

- 179.- NOTIDES, A.C.; HAMILTON, D.E.; AVER, H.E. (1.975).:
A kinetic analysis of estrogen receptor transformation.
J. Biol. Chem. 250: 3945-3957.
- 180.- OLEA-SERRANO, N.; DEVLEESCHOUWER, N.; LECLERCQ, G. et al
(1.985).:
Assay for estrogen and progesterone receptors of breast
cancer cell lines in monolayer culture.
Eur. J. Cancer. Clin. Oncol. 21: 965-973.
- 181.- OLEA, N.; DEVLEESCHOUWER, N.; LECLERCQ, G. (1.985).:
Nuevo método para la detección de RE y Pg en líneas celulares
mamarias humanas.
Rev. Esp. Fisiol. En prensa.
- 182.- OLOFSSON, P.; GARTNER, P.; OLSSON, L. (1.980).:
Separation of human bone marrow cells in density gradient
of polyvinylpyrrolidone coated silica gel (percoll).
Scand J. Haematol 24: 254-259.
- 183.- PANCO, W.B.; CLARK, J.H. (1.981).:
The effects of a second specific estrogen binding site
on estrogen receptor quantitation in human breast cancer
cytosol.
J. Steroid Biochem, 15: 383-386.
- 184.- PANKO, W.E.; McLEOD, R.M. (1.978).:
Uncharged nuclear receptors for estrogen in breast cancers.
Cancer Res. 38: 1948-1951.

- 185.- PANKO, W.B.; WATSON, C.S.; CLARK, J.H. (1.981).: The presence of a second, specific estrogen binding site in human breast cancer.
J. Steroid Biochem. 14: 1311-1316.
- 186.- PARIDAENS, R.; SYLVESTER, R.J.; FERRAZZI, E. et al (1980) Clinical significance of the quantitative assessment of estrogen receptors in advanced breast cancer.
Cancer 46: 2889-2895.
- 187.- PAVELIC, Z.P.; SLOCUM, H.K.; RUSTUM, Y.M. et al (1980).: Colony growth in soft agar of human melanoma, sarcoma and lining carcinoma cells disaggregated by mechanical and enzymatic methods.
Cancer Res. 40: 2160-2165.
- 188.- PERTOFT, H. (1.970).: Separation of cells from a mast cell tumour on density gradients of colloidal silica.
J. Natl Cancer Inst. 44: 1251-1257.
- 189.- PITOT, H.C.; YATUIN, M.B. (1.973).: Interrelationships of mammalian hormones and enzyme levels in vivo.
Physiol. Rev. 53: 228-325.
- 190.- POULSEN, H.S. (1.981).: Oestrogen receptor assay-limitation of the method.
Eur. J. Cancer 17: 495-501.

- 191.- POULSEN, H.S. (1.981).: Estrogen Receptors in human breast cancer: Comparative - Features of the hydroxylapatite and Dextran Coated Charcoal Assay.
Eur. J. Cancer. Clin. Oncol. 18: 1075-1079.
- 192.- RAAM, S.; GELMAN, R.; COHEN, J.L. et al (1.981).: Estrogen receptor assay: Interlaboratory and Intralaboratory variations in the measurement of receptors using dextran-coated charcoal technique: A study sponsored by E.C.O.G.
Eur. J. Cancer 17: 643-649.
- 193.- RAO, G.S. (1.980).: Mode of entry of steroid and thyroid hormones into cell.
Mol. Cel. Endocrinol, 21: 97-108.
- 194.- RASEY, J.S.; NELSON, N.J. (1.980).: Response of an in vivo-in vitro tumor to X-rays and cytotoxic drugs: effect of tumor disaggregation methods on cell survival.
Br. J. Cancer 41 (suppl. IV): 217-222.
- 195.- RAVDIN, R.G.; LEWISON, E.F.; SLACK, N.M. (1.970).: Results of a clinical trial concerning the or prophylactic oophorectomy for breast cancer.
Surg. Gynecol. Obstet. 131: 1055-1062.
- 196.- RICE, R.G.; MADRAY, S.; ROCCHID, R. et al (1.982).: The effect of Dithiothreitol on the Estrogen Receptor.
Anticancer Research 2: 141-144.

- 197.- RICH, M.A.; FURMANSKI, P.; BROOKS, S.C. (1.978).: Prognostic value of estrogen receptors determinations in patients with breast cancer. Cancer. Res. 38: 4296-4298.
- 198.- SAEZ, S.; NASSIF, E.; CHEIX, F. et al (1.981).: Hormone receptors in human breast tumors In "Diagnosis - and treatment of breast cancer". Lewison E.F., Montagne A.C.W. eds. Willians Wilkins, Baltimore.
- 199.- SAMAAAN, N.A.; BUZDAR, A.V.; ALDINGER, K.A. et al (1.981). Estrogen receptor: as a pronostic factor in breast cancer. Cancer 47: 554-560.
- 200.- SATO, B.; NISHIZAWA, Y.; NOMA, K. et al (1.979).: Estrogen-independent nuclear binding of receptor protein of rat uterine citosol by removal of low molecular weight inhibitor. Endocrinology 104: 1474-1479.
- 201.- SAULOV, E.C.; WITTLIFF, J.L. et al (1.977).: Further Studies of biochemical predictive test in breast. Cancer. Cancer 39: 539-541.
- 202.- SATO, B.; NOMURA, Y.; NAKAO, K. et al (1.981).: DNA binding ability of estrogen receptor from human breast cancer. J. Steroid Biochem 14: 295-303.

- 203.- SCATCHARD, G.; (1.949).:
The attraction of proteins for small molecules and ions.
Ann. N. Y. Acad. Sci. 51: 660-672.
- 204.- S'EFALOFF, A. (1.975).:
Clinical evaluation of tumor responses to endocrine therapy. In "Estrogen receptors in human breast cancer". -
McGUIRE W.L., CARBONE, P.P., VOLLMER, E.P. eds. Raven --
Press, New York. USA.
- 205.- SHAFIE, S.; BROOKS, S.C. (1.979).:
Characteristics of the dextran-coated charcoal assay for
estradiol receptor in breast cancer preparation.
J. Lab. Clin. Med. 94: 784-792.
- 206.- SHERIDAN, P.J.; ANSELMO, V.C.; BUCHANAN, J.M. et al --
(1.979).:
Equilibrium: the intracellular distribution of steroid receptors.
Nature 281: 579-582.
- 207.- SHERMAN, M.R.; TUAZON, F.B.; MILLER, L.K. (1.980).:
Estrogen receptor cleavage and plasminogen activation by
enzymes in human breast tumor cytosol.
Endocrinology; 106: 1715-1727.
- 208.- SUYAMALA, G.; GORSKI, J. (1.967).:
Interrelationship of estrogen receptors in nucleus and
cytosol
J. Cell. Biol 35: 125A (Abstract).

- 209.- SIITEPI, P.K.; MURAI, J.T.; HAMMOND, G.L. et al (1.982).:
The serum transport of steroid hormones.
Recent Prog. Horm. Res. 38: 457-510.
- 210.- SILFVERSWARD, C.; WALLGREN, A.; NORDENSKJOLD, B.; et al
(1.984).:
Estrogen receptor analysis on fine needle aspirates from
Human breast carcinoma. In "Clinical Interest of Steroid
Hormone Receptor: in Breast cancer"
Leclerq, G, Tinea, S, Paridaens R and Heuson J.C. eds. -
Springer-Verlag, Berlin, pag 41-44.
- 211.- SLOCUM, H.K.; PAVELIC, Z.P.; RUSTUM, J.M. et al (1980).:
An enzymatic method for disaggregation of human solid tu-
mors for studies of clonogeneity and biochemical determi-
nants of drug action. In "Cloning of Human Tumor stem-
-cells.
Salmon S.E. ed. Allan R. Liss. New York. pp 339
- 212.- SOMJEN, D.; KAYE, A.M.; LINDER, H.R. (1.974).:
Synthesis of specific estradiol-induced protein by survi-
ving rat uteri and cell-free uterine extracts.
Mol. Cell. Endocrinol. 1: 77-88.
- 213.- SOULE, H.D.; VASQUEZ, J.; LONG, A. et al (1.973).:
Human cell line from a pleural effusion derived from a -
breast carcinoma.
J. Natl. Cancer. Inst. 51: 1409-1416.

- 214.- STEGGLES, A.W.; KING, R.J.B. (1.970).:
The use of protamine to study $[6,7-^3\text{H}]$ Oestradiol-17 β -
Binding in Rat uterus.
Biochem 118: 695-701.
- 215.- STEGGLES, A.W.; SPELSBERG, T.C.; GLASSER, S.R. et al --
(1.971).:
Soluble complexes between steroid hormones and target- -
-tissue chromatin.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 68: 1479-1482.
- 216.- STEIN, G.S.; SPELSBERG, T.C.; KLEINSMITH, L.J. (1.974).:
Nonhistone chromosomal proteins and gene regulation.
Science 183: 817-824.
- 217.- STOLL, B.A. (1.980).:
Clinical experience with tamoxifen in advanced breast -
cancer.
In " Recent Results in Cancer Research" Springer Verlag,
Berlin.
- 218.- STOERSEL, S.; LECLERCQ, G. (1.986).:
Competitive binding assay for estrogen receptor in monolay
er culture: Measure of receptor activation potency.
Comunicación Personal (Trabajo pendiente de publicación).
- 219.- SUZUKI, M.; KURAMOTO, H.; HAMANO, M. et al (1.980).:
Effects of oestradiol and progesterone on the alkaline
phosphatase activity of a human endometrial cell line.
Acta. Endocr. Copenh. 93: 108-113.

- 220.- SYNE, J.S.; MARKAVERICH, B.M.; CLARK, J.H. (1.962).:
Estrogen binding-sites in the nucleus of normal and ma-
lignant human tissue: Characteristics of the multiple -
nuclear binding sites.
Cancer Res. 42: 4449-4454.
- 221.- SZEGO, C.M.; PIETRAS, R.J. (1.985).:
Subcelular distribution of oestrogen receptor.
Nature, 317: 88-89.
- 222.- TALLEY, R.W.; HAINES, C.R.; WATERS, M.N. et al (1973).:
A dose-response evaluation of androgens in the treatment
of metastatic breast cancer.
Cancer 32: 315-320.
- 223.- TAYLOR, C.M.; BLANCHARD, B.; ZAVA, D.T. (1.984).:
A simple method to determine whole cell uptake of radiola
belled oestrogen and progesterone and their subcellular -
localization in breast cancer cell lines in monolayer cul
ture.
J. Steroid Biochem. 20: 1083-1088.
- 224.- TERCERO, J.C.; NELSON, J.C.; CHI, E. et al (1.981).:
 16α (^{125}I)- β -Estradiol compared with (^3H)- β -estradiol -
as the tracer in ER assays.
Clin Chem. 27: 1915-1917.
- 225.- TERENIUS, L. (1.967).:
SH-groups essential for estrogen uptake and retention in
the mouse uterus.
Molec. Pharmac. 3: 423-428.

- 226.- THIBONDEAV, S.N.; FREEMAN, L.; JIANG, N.S. (1.981).: Simultaneous measurement of estrogen and progesterone receptors in tumor cytosol with use of ¹²⁵I-estradiol and ³H-R5020.
Clin. Chem. 27: 687-691.
- 227.- THORSEN, T. (1.980).: Occupied and unoccupied oestradiol receptor in human breast tumour cytosol.
J. Steroid Biochem. 13: 405-408.
- 228.- THORSEN, T.; STOA, K.F. (1.979).: Nuclear uptake of oestradiol-17 β in human mammary tumor tissue.
J. Steroid Biochem. 10: 595-599.
- 229.- TILZER, L.; McFARLAND, R.T.; PLAPP, F.V. et al (1.981).: Different ionic forms of Estrogen Receptors in rat uterus and human breast carcinoma.
Cancer Res. 41: 1058-1063.
- 230.- TILZER, L.L.; McFARLAND, R.T.; PLAPP, F.V. et al (1.981).: Different ionic forms of estrogen receptor in rat uterus and human breast carcinoma.
Cancer. Res. 41: 1058-1063.
- 231.- TOFT, D. (1.972).: The interaction of uterine estrogen receptors with DNA.
J. Steroid Biochem. e, 515-522.

- 232.- TOFT, D.; HISHIGORI, H. (1.979).: Stabilization of the avian progesterone receptor by inhibitors.
J. Steroid Biochem. 11: 413-416.
- 233.- TOFT, D .O.; GORSKI, J. (1.966).: A receptor molecule for estrogens Isolation from the rat uterus and preliminary characterization.
Proc. Nat. Acad. Sci. 55: 1574-1579.
- 234.- VON HOFF, D .D. (1.984).: Plating efficiencies of human tumors in capillaries versus Petri Dishes. In "Human Tumor Cloning".
Salmon S,E, Trent J.M., eds. Grune and stratton Inc. Orlando, Florida pp. 153-161.
- 235.- VIGNON, F.; DEROCQ, D.; CHAMBON, M. et al (1.983).: Estrogen-induced protein secreted by the MCF-7 human -- breast cancer cell stimulate theis proliferation.
C.R. Acad. Sc. Paris. 296 (III): 151-156.
- 236.- WAGNER, R. (1.971).: Hormone Receptors. In "Shering Workshop on Steroids".
Pergamon Press. S 373.
- 237.- WALSH, R.J.; POSNER, B.I.; KOPRIWA, B.M. et al (1978).: Prolactin binding sites in the rat brain.
Science 201: 1041-1046.

- 238.- WARD, H.W.C. (1.973).:
Antiestrogen therapy for breast cancer; a trial of tamoxifen at two dose levels.
Brit. Med. J. 1: 13-21.
- 239.- WELSHONS, W.V.; LIEBERMAN, M.E.; GORSKI, J. (1.984).:
Nuclear localización of unoccupied oestrogen receptors.
Nature 307: 747-749.
- 240.- WESTLEY, B.; ROCHEFORT, H. (1.979).:
Estradiol induced proteins in the MCF-7 human breast cancer cell line.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 93: 410-416.
- 241.- WESTLEY, B.; ROCHEFORT, H. (1.980).:
A secreted glycoprotein induced by estrogen in Human --
breast cancer cell lines.
Cell, 20: 353-362.
- 242.- WILLIAMS, D.; GORSKI, J. (1.972).:
Kinetic and equilibrium analysis of estradiol in uterus -
A model of binding site distribution in uterine cell.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 69: 3464-3468.
- 243.- WILLIAMS, D.; GORSKI, J. (1.972).:
Association behavior of the oestradiol binding protein -
complex with the nuclear fraction.
Acta. Endocrinol. Copenh. Suppl. 168: 420-435.

- 244.- WILLIAMS, L.; GORSKI, J. (1.973).:
Isolation and characterization of free cell suspensions
of immature rat uterus.
Biochemistry 12: 297-305.
- 245.- WOLK, H. (1.974).:
A dose response evaluation of delta-L-Testolactone.
Cancer 33: 9-17.
- 246.- WRANGE, O.; NORDENSKJÖLD, B.; GUSTAFSSON, J.A. (1.978).:
Cytosol estradiol receptor in human mammary carcinoma: An
assay based on isoelectric focusing in polyacrylamide -
gel.
Anal. Biochem. 85: 461-475.
- 247.- WRANGE, O.; HUMLA, S.; RAMBERG, I. et al (1.984).:
Estrogen and progestin receptor analysis in human breast
cancer by isoelectric focusing in slabs of polyacrylamide
Gel.
In "Clinical Interest of steroid Hormone Receptors in Bre
ast Cancer". Leclercq, G. Toma S, Paridaens R, Heuson J.C
eds. Sringer-Verlag, Berlin pag. 32-40.
- 248.- YAMAMOTO, K.R. (1.974).:
Characterization of the 4S and 5S forms of the estradiol
receptor protein and their interaction with deoxyribonu-
cleic acid.
J. Biol. Chem. 249: 7068-7075.

- 249.- YAMAMOTO, K.R.; ALBERTS, B.
On the specificity of the binding of the estradiol receptor protein to deoxyribonucleic acid.
J. Biol. Chem. 249, 7076-7086.
- 250.- ZAVA, D.T.; HARRINGTON, N.Y.; McGUIRE, W.L. (1.976).:
Nuclear estradiol receptor in the adult rat uterus: A new exchange assay.
Biochemistry 15: 4292-4297.
- 251.- ZAVA, D.T.; WYLER-VONBALLMOOS, A.; GOLDBIRSCH, A. et al (1.982).:
A Quality control study to assess the interlaboratory variability of routine estrogen and progesterone receptors assays.
Eur. J. Cancer. Clin. Oncol. 18: 713-721.
- 252.- ZAVA, D.T.; McGUIRE, W.L. (1.977).:
Estrogen receptor-unoccupied sites in nuclei of breast tumor cell line.
J. Biol. Chem. 252: 3703-3708.