

## Cinética de proliferación y de liberación de antígeno polipeptídico tisular en células MCF-7. Influencia hormonal

J. D. López-González\*, R. del Moral, N. Olea, J. M. Ruiz de Almodóvar y V. Pedraza

Departamento de Radiología  
Hospital Clínico Universitario  
Facultad de Medicina  
18012 Granada (España)

(Recibido el 26 de enero de 1989)

J.D. LOPEZ-GONZALEZ, R. DEL MORAL, N. OLEA, J. M. RUIZ DE ALMODOVAR and V. PEDRAZA. *Proliferation and Liberation Kinetics of Tisular Polypeptide Antigen in MCF-7 Cells. Hormonal Influence.* Rev. esp. Fisiol., 45 (3), 227-234, 1989.

The presence or absence of tisular polypeptide antigen (TPA) in the culture medium of hormone dependent breast cancer tumoral cells, the relationship between TPA concentration and cellular proliferative activity, have been investigated as well as whether TPA levels change in response to steroid preparations or the action of different antiestrogens. Results show that in MCF-7 cell line culture media, proteins antigenically related to TPA can be detected in concentrations which parallel the number of cells in culture. Consequently, TPA can be considered a cell proliferation marker. Hydroxy-tamoxifen at a concentration of  $10^{-7}$  M inhibited both cell proliferation and TPA antigen release, while the relative proportion between number of cells (valued by DNA quantification) and TPA concentration remained unchanged.

**Key words:** Breast cancer, MCF-7 cells, Tisular polypeptide antigen, Proliferation, Liberation, Hormonal influence.

El Antígeno Polipeptídico Tisular (TPA), fue identificado utilizando anti-suero de caballo frente a una determinada fracción insoluble de células tumorales (4). Mediante técnicas inmunoquímicas se ha demostrado la existencia de TPA en la práctica totalidad de los cánceres humanos (3). El TPA puede ser identificado también en tejidos normales altamente proliferativos —fetales o placentarios—, y su producción en los tejidos del adulto es baja o nula (2).

Ciertos datos sugieren, de manera indirecta, la existencia de alguna relación entre el TPA y las proteínas del citoesqueleto. Así, utilizando microscopia de fluorescencia se ha demostrado que las líneas celulares epiteliales Hela, MCF-7 y A-431, son reconocidas por anticuerpos anti-TPA, mientras que el enlace del anticuerpo no ocurre sobre células de origen no epitelial. Los patrones de fijación positiva coinciden con los filamentos intermedios tipo queratina y concretamente, los anticuerpos anti-TPA se fijan sobre las queratinas 8, 18 y 19 (32).

\* A quien debe dirigirse la correspondencia.

Por otra parte, la «transformación» celular *in vitro* se acompaña, a menudo, de alteraciones morfológicas (5). Algunas de las propiedades de las células transformadas pueden estar condicionadas por alteraciones citoplasmáticas que afectan a la delicada red de microtúbulos y microfilamentos que reciben el nombre de citoesqueleto (1, 6). Este armazón juega un papel fundamental en la definición del contorno y la forma de la célula (14), en la motilidad celular (15), en el crecimiento independiente del anclaje (24) y en la modulación de las proteínas celulares de superficie (22). Cuando se analiza el efecto del estradiol sobre líneas celulares tumorales dotadas de receptor estrogénico, además de los efectos mitógenos de la molécula, se ha demostrado que el  $17\beta$ -E<sub>2</sub> induce modificaciones progresivas de la forma celular que afectan a la longitud y a la densidad de los microvilli y al aspecto de la célula, que cambia su morfología para convertirse en una célula «secretora» capaz de liberar al medio de cultivo diversas sustancias proteicas (34). Estos efectos no han sido observados en células carentes del sistema receptor (29).

En tejidos «blanco» de la acción estrogénica, el estradiol regula la síntesis de determinadas proteínas (9, 10, 12, 23, 25, 26). En la línea celular de cáncer de mama humano MCF-7 se ha demostrado la existencia de una proteína producto de la estimulación estrogénica, el receptor de progesterona (16). El valor potencial de la investigación de este tipo de proteínas es doble, de un lado, en investigación clínica podrían configurarse como elementos predictivos de la hormonorespuesta al tratamiento, de otro, en investigación básica, se dispondría de un producto final a través del cual sería posible cuantificar la magnitud del estímulo.

En este último sentido, el TPA puede responder, modificando su ritmo de síntesis, secreción o liberación, a las acciones hormonales que ejercen tanto estrógenos como antiestrógenos. La demostración de

la presencia o no de TPA en el medio de cultivo de la línea celular experimental de cáncer de mama MCF-7 y la determinación de la relación existente entre su concentración y el ritmo proliferativo de la población celular, así como el análisis de los cambios producidos en el medio (concentración de TPA e índice de crecimiento de la población celular) en respuesta a la influencia de hormonas esteroideas ( $17\beta$ -E<sub>2</sub>,  $17\alpha$ -E<sub>2</sub>, DES y E<sub>1</sub>), o preparados de acción antiestrogénica (OH-TAM), constituyen los objetivos del presente trabajo.

### Material y Métodos

**Hormonas.**— Se ha utilizado a concentraciones  $10^{-7}$  M, en MEM + FCS,  $17\beta$ -estradiol ( $17\beta$ -E<sub>2</sub>);  $17\alpha$ -estradiol ( $17\alpha$ -E<sub>2</sub>); dietilestilbestrol (DES) y estrona (E<sub>1</sub>) (todos ellos de Sigma) y, como sustancia de acción antiestrogénica, hidroxitamoxifeno (OH-TAM) (Ici-Pharma).

**Cultivos celulares.**— Como modelo experimental de cáncer de mama con carácter receptor estrogénico positivo se utiliza la línea celular MCF-7, establecida por SOULE *et al.* (7), a partir de una enferma posmenopáusica afecta de carcinoma ductal infiltrante metastásico.

La línea celular MCF-7 se ha cultivado en monocapa (discos COSTAR 3035, de 30 mm Ø), en atmósfera húmeda con 5 % CO<sub>2</sub> y 95 % de aire, a 37 °C, utilizando como medio nutriente Medio Esencial Mínimo con sales de Earle (MEM), suplementado con un 10 % de suero de feto de ternera inactivado térmicamente (FCS), y con antibióticos (penicilina 100 U/ml, estreptomycin 100 µg/ml y gentamicina 40 µg/ml).

Para la cuantificación del número de células presentes en el cultivo se ha utilizado la determinación del ácido desoxirribonucleico (DNA) mediante el método de BURTON (8).

**Cinética de liberación del antígeno polipeptídico tisular.**— Sobre discos Petri de 30 mm Ø se sembraron aproximadamente 50.000 células en 2 ml de MEM + 10 % FCS. Tanto el DNA como el TPA se cuantificaron a intervalos de 24 horas. El experimento finalizó a las 192 h (8 días) de la siembra. Las determinaciones de DNA y TPA se realizaron por quintuplicado. El análisis de TPA en el medio de cultivo celular se ha efectuado por radioinmunoensayo (Santeg Medical).

**Influencia de diversas hormonas esteroideas y de antiestrógenos sobre la liberación de TPA.**— La investigación de los efectos del 17β-estradiol, 17α-estradiol, estrona y dietilestilbestrol, sobre el crecimiento celular de la línea MCF-7 cultivada en monocapa, se realizó mediante un experimento en el que a las 24 horas de la siembra de aproximadamente 50.000 células por disco, se substituyó el medio de cultivo inicial (MEM + FCS 10 %) por MEM ± FCS 10 % suplementado con cada una de las hormonas a la concentración 10<sup>-7</sup> M. Los cambios de medio se han realizado a los 3 y 6 días del inicio del ensayo, y los resultados se valoraron al octavo día de cultivo. Todas las determinaciones se realizaron por cuadruplicado. El antiestrógeno OH-TAM se ensayó en las mismas condiciones experimentales.

**Resultados y Discusión**

**Cinética de liberación del antígeno polipeptídico tisular (TPA).**— Los resultados del estudio de liberación de antígeno TPA al medio de cultivo, en función del tiempo, para células MCF-7 se muestran en la tabla I, en donde se incluye el valor medio de la cantidad de células en µg de DNA y de la concentración de TPA en U/l correspondiente a cada uno de los ensayos realizados.

**Influencia hormonal sobre la liberación de TPA.**— Los valores de cantidad de

Tabla I. *Cinética de liberación del antígeno TPA. Línea celular MCF-7 (media ± D.S.).*

t (días)	DNA (µg)	TPA (U/L)	TPA (U)
1	—	—	—
2	—	530 ± 95	1,06
3	—	806 ± 128	1,61
4	2,6 ± 0,8	1.250 ± 164	2,50
5	3,7 ± 0,8	1.958 ± 193	3,92
6	5,8 ± 0,7	2.908 ± 225	5,82
7	8,6 ± 0,9	4.497 ± 289	8,99
8	13,2 ± 1,2	6.735 ± 431	13,47

DNA y de concentración de TPA en medios de cultivo de células MCF-7 sometidas a la acción de diversas sustancias de acción hormonal y antihormonal se exponen en la tabla II. El dato correspondiente al TPA resulta del análisis efectuado sobre alícuotas homogéneas de los sucesivos medios nutrientes que se utilizan para mantener las células en el cultivo. En todos los casos se especifica el valor medio y la desviación estándar de los cuatro ensayos correspondientes a cada grupo. Los resultados obtenidos se han comparado con un grupo de células MCF-7 no sometido a tratamiento hormonal ni a la acción de antihormonas (experimento control).

**Proliferación celular y cinética de la liberación del antígeno polipeptídico tisular.**— La velocidad de crecimiento de las

Tabla II. *Influencia de hormonas y antihormonas sobre la liberación de TPA (media ± D.S.).*

Hormona (10 <sup>-7</sup> M)	ADN (µg)	TPA (U/L)	TPA (U)
Control	13,0 ± 0,5	6.692 ± 301	13,38
17β-E <sub>2</sub>	12,4 ± 0,6	6.764 ± 242	13,49
17α-E <sub>2</sub>	13,0 ± 0,4	6.601 ± 278	13,20
E <sub>1</sub>	13,2 ± 0,5	6.972 ± 226	13,94
DES	13,0 ± 0,4	6.711 ± 218	13,42
OH-TAM	8,1 ± 0,2	4.126 ± 180	8,25

células MCF-7 en cultivo puede ser modulada por numerosas sustancias entre las que se encuentran los estrógenos, antiestrógenos, glucocorticoides, progesterona y andrógenos (7, 20). Sin embargo, cuando células procedentes de cáncer de mama humano RE (+) crecen en un medio nutriente suplementado con concentraciones óptimas de suero, insulina y otros factores de crecimiento, los esteroides parecen no ejercer ninguna acción que tenga como resultado la activación del ritmo mitótico del cultivo (18). Se ha observado, además, que la velocidad inicial de crecimiento de las células MCF-7 (17) resulta dependiente del número de células con el que se inicia el cultivo, hecho que puede estar en relación con la producción, por parte de las células, de factores mitógenos de acción auto o paracrina (21).

Pasada la fase inicial del cultivo y en condiciones de densidad de siembra y aporte de nutrientes adecuados se alcanza un crecimiento celular que se ajusta, respecto al tiempo, a una curva exponencial. Sobre esa zona es posible deducir el parámetro que corresponde al tiempo de duplicación,  $T_D$ . Las variaciones encontradas para el valor  $T_D$ , de unos experimentos a otros, pueden considerarse mínimas (31). Efectivamente, dejando fuera del estudio los datos de crecimiento celular correspondientes a la fase «lag» inicial, se ha calculado el parámetro que caracteriza a la proliferación de las células MCF-7 en MEM + 10 % de FCS a partir de los resultados recogidos en la tabla I. El ajuste, por mínimos cuadrados, de los puntos experimentales —(DNA, t)— a la ecuación «Ln DNA f(t)» (fig. 1) ofrece el siguiente resultado:

$$y = 0,494 + 0,409 x; (r = 0,999)$$

donde  $y = \ln(\text{DNA})$  y  $x = \text{tiempo}$ .

El tiempo de duplicación celular puede ser calculado en la forma siguiente:

$$T_D = \ln 2/K = 0,693/0,409 = 1,69 \text{ días} = 40,7 \text{ horas.}$$

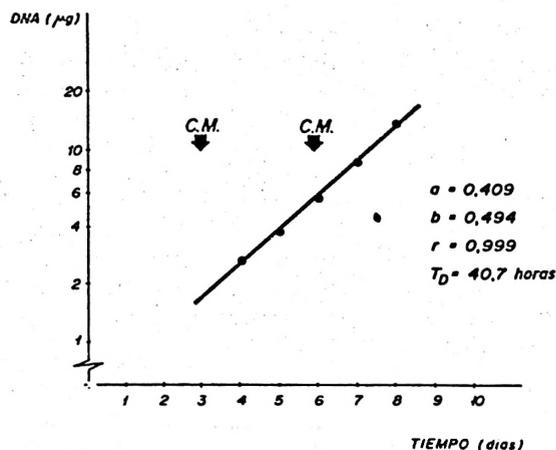


Fig. 1. Crecimiento de la línea celular mamaria MCF-7 ( $\mu\text{g}$  de DNA), cultivada en Medio Mínimo Esencial (MEM) suplementado con un 10 % de suero de feto de ternera (FCS).

Este valor de  $T_D = 40,7$  horas está de acuerdo con el resultado obtenido por otros autores (31, 33) y corresponde también con el descrito por JAKESZ *et al.* (17) cuando la densidad de siembra inicial se ajusta a  $10^5$  células.

Las ecuaciones que rigen la cinética de crecimiento de las células *in vitro* permiten deducir la fracción de crecimiento de la población celular MCF-7 (28). Así, conociendo los valores del tiempo de duplicación ( $T^D = 40,7$  horas) y del tiempo de ciclo ( $T_C = 21,9$  horas) para la línea celular MCF-7 (27) se puede calcular la fracción de crecimiento del cultivo, que resulta ser de 0,45. Este resultado puede interpretarse suponiendo que sólo el 45 % de las células del cultivo se encuentran en el compartimiento proliferativo. El resto (55 %) no contribuye, aparentemente, al crecimiento de la población.

La liberación de antígeno TPA al medio de cultivo (tabla I) puede someterse a este mismo análisis. La ecuación que rige la liberación del TPA en función del tiempo es la siguiente:

$$y = 0,455 + 0,425 x; (r = 1,000)$$

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

$$T_D = 1,63 \text{ días} = 39,1 \text{ horas}$$

valor prácticamente equivalente al que corresponde al  $T_D$  de las células MCF-7.

*Liberación de TPA al medio de cultivo. Influencia hormonal.*— Ninguna de las sustancias estrogénicas ensayadas modifica los niveles de DNA, y por tanto no parece ejercer una acción proliferativa neta sobre la población MCF-7 (tabla II). Efectivamente, los resultados del experimento control (células MCF-7 no sometidas a ninguna acción hormonal exógena) coinciden con los encontrados en cada uno de los grupos experimentales.

La existencia de un efecto estimulador directo del estradiol sobre la línea celular MCF-7, traducible por un incremento del número de células presentes en el cultivo, constituye un claro ejemplo de controversia científica. Los primeros datos ofrecidos por LIPPMAN *et al.* (20) parecían demostrar que la hormona actuaba estimulando el crecimiento de la población. Sin embargo, distintos autores no confirmaron este hallazgo (13, 18). En nuestro caso, la observación del estímulo proliferativo del  $17\beta\text{-E}_2$  sobre la línea celular MCF-7 cultivada en MEM + FCS requiere ciertas condiciones especiales (31). Para DEVLEESCHOUWER *et al.* (11), un factor de fundamental importancia lo constituye el suplemento del suero que se adiciona al medio sintético de cultivo. El efecto positivo del  $17\beta\text{-E}_2$  se observa cuando las células MCF-7 crecen en MEM suplementado con suero humano libre de esteroides (tratado con carbón dextrano), pero no se observa un incremento en el número de células presente en los cultivos que se efectúan en MEM + FCS o MEM + NBCS (NBCS = suero de vaca recién nacida).

Por otra parte, distintos autores (19, 33,

34) han demostrado, tanto sobre MCF-7 como sobre otras líneas celulares de cáncer de mama RE (+) (T47D, CAMA-1, PCM42), la actividad del  $17\beta\text{-E}_2$  como mitógeno. La hipótesis de que los estrógenos actúan, al menos parcialmente, induciendo la secreción de factores autoestimuladores del crecimiento celular se apoya en el trabajo de WESTLEY y ROCHEFORT (34), resultante del cual ha sido la identificación de una glicoproteína de peso molecular 52 Kdalton que reproduce parcialmente los efectos *in vitro* del  $E_2$  sobre el crecimiento y sobre la forma de la superficie de las células MCF-7. El efecto proliferativo del estradiol es dosis dependiente (20) y su influencia puede verse a niveles de concentración tan bajos como  $10^{-10}$  M. Como quiera que el suero con el que se suplementa el medio de cultivo aporta estrógenos a este nivel de concentración, el tratamiento con carbón dextrano para eliminar esta sustancia parece fundamental, aunque puede no ser suficiente, puesto que en el suero quedan moléculas de estrógenos sulfo y gluco conjugados que, tras su transformación enzimática, son utilizadas por la célula MCF-7 (30).

En las condiciones experimentales de nuestro ensayo (cultivo en medio de MEM suplementado con 10 % de FCS no tratado con carbón dextrano) los esteroides endógenos procedentes del suero fetal activan a la población de células MCF-7 a su máximo nivel de proliferación hasta tal punto que el  $17\beta\text{-E}_2$  que se adiciona como suplemento ( $10^{-7}$  M) no parece ejercer, respecto al grupo control, ninguna acción inductora del crecimiento. Sin embargo, utilizando las mismas condiciones de cultivo, se ha demostrado que la hormona potencia la incorporación del nucleósido timidina tritiada ( $^3\text{HTdR}$ ) a células MCF-7 en una forma dependiente de la dosis de  $17\beta\text{-E}_2$  (18, 31, 33).

Los niveles de TPA cuantificados en el medio de cultivo de las células MCF-7 expuestas a la acción de  $17\beta\text{-E}_2$ ,  $17\alpha\text{-E}_2$ ,  $E_1$  y DES, no difieren de los que se deter-

minan en el medio de cultivo del grupo celular control. De aquí podría deducirse que el antígeno polipeptídico tisular es una proteína cuya secreción no resulta modulada por la presencia de estas sustancias.

Los resultados del OH-TAM, sobre el crecimiento de la población celular y sobre la secreción del antígeno polipeptídico tisular, muestran que inhibe la proliferación celular y la liberación de antígeno polipeptídico tisular (tabla II); tanto la cantidad de DNA como el TPA liberado se reducen, aproximadamente, al 60 % respecto al control.

Es evidente que una manera indirecta de valorar la hormonodependencia de la línea celular ensayada consiste en comprobar los efectos que producen los antiestrógenos sobre su crecimiento.

La actividad del OH-TAM como inhibidor de la proliferación celular en cultivos de células MCF-7 puede ser estadísticamente valorada utilizando el test de Cochran para la comparación de medias. El crecimiento celular (en términos de DNA), en los grupos de OH-TAM y Control ofrece un resultado de  $t_{exp} = 20,3$  de donde se deduce que la cantidad de células de uno y otro grupo difiere de manera estadísticamente significativa ( $p < 0,001$ ).

Este mismo razonamiento puede ser aplicado a los resultados de la cuantificación del TPA en el medio de cultivo celular. En este caso resulta  $t_{exp} = 16,4$  y nuevamente se demuestra que las diferencias encontradas no son resultado del azar ( $p < 0,001$ ).

Estos resultados autorizan a concluir que la liberación de TPA correlaciona estrechamente con la proliferación de los elementos celulares del cultivo de MCF-7. En efecto, el antígeno polipeptídico tisular «marca» de alguna manera el proceso de proliferación celular de la población MCF-7, siendo directa la relación observada entre las concentraciones de TPA y DNA. El hidroxitamoxifeno inhibe ambos fenómenos.

## Resumen

Se investiga la presencia o ausencia de Antígeno Polipeptídico Tisular (TPA) en el medio de cultivo de células tumorales hormonodependientes de cáncer de mama; la relación existente entre concentración de TPA y actividad proliferativa celular; la existencia o no de cambios en la concentración de TPA en respuesta a preparados esteroideos o de acción antiestrogénica diversos. Los resultados obtenidos permiten concluir que en el medio de cultivo de la línea celular MCF-7 es posible detectar la presencia de proteínas antigénicamente relacionadas con el TPA en un nivel de concentración que resulta directamente proporcional al número de células presentes en el cultivo. Por ello, el TPA puede ser considerado como un marcador de la proliferación celular. El hidroxitamoxifeno inhibe tanto la proliferación celular como la liberación del antígeno TPA aunque la proporción relativa entre número de células (estimada por la cuantificación del DNA) y la concentración de TPA permanece constante.

**Palabras clave:** Células MCF-7, Antígeno polipeptídico tisular, Proliferación, Liberación, Influencia hormonal.

## Bibliografía

1. Asch, B. B., Medina, D. y Brinkley, B. R.: *Cancer Res.*, 39, 893-907, 1979.
2. Björklund, B.: *Tumor Diagnostic*, 1, 9-20, 1980.
3. Björklund, B., Björklund, V., Wiklund, B. *et al.*: En «Immunological Techniques for Detection of Cancer» (Björklund, B.). Bonniers. Estocolmo, 1973, pp. 133-187.
4. Björklund, B., Lundblad, G. y Björklund, V.: *Int. Arch. Allergy*, 12, 241-261, 1958.
5. Brinkley, B. R., Beall, P. T., Wible, L. J. *et al.*: *Cancer Res.*, 40, 3118-3129, 1980.
6. Brinkley, B. R., Fuller, G. M. y Highfield, D. P.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 73, 4981-4985, 1975.
7. Broocks, S. C., Locke, E. R. y Soule, H. D.: *J. Biol. Chem.*, 248, 6521-6523, 1973.
8. Burton, K.: *Biochem. J.*, 62, 315-323, 1956.
9. Chambon, P., Benoist, C., Breathnach, R. *et al.*: En «From gene to protein: Information transfer in normal and abnormal cells» (Russell,

- T. R., ed.). Academic Press, Nueva York, 1979, pp. 55-83.
10. DeSombre, E. y Lyttle, C.: En «Perspectives in Steroid Research» (Bresciani, F., ed.). Raven Press, Nueva York, 1980, pp. 167-182.
  11. Devleeschouwer, N., Leclercq, G. y Heuson, J. C.: *J. Steroid. Biochem.*, 22, 147-154, 1984.
  12. Edwards, D., Adams, D., Savage, N. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 93, 804-809, 1980.
  13. Edwards, D., Murphy, S. y McGuire, W.: *Cancer Res.*, 40, 1722-1726, 1980.
  14. Golman, R. D. y Follet, E. A. C.: *Exp. Cell. Res.*, 57, 263-276, 1969.
  15. Golman, R. D. y Follet, E. A. C.: *Science*, 169, 286-288, 1970.
  16. Horwitz, K. B. y McGuire, W. L.: *J. Biol. Chem.*, 253, 2223-2228, 1977.
  17. Jakesz, R., Smith, C. A., Aitken, S. et al.: *Cancer Res.*, 44, 619-625, 1984.
  18. Jozan, S., Gay, G., Marqués, B. et al.: *Cell Tissue Kinet.*, 18, 457-464, 1985.
  19. Katzenellenbogen, B. S., Norman, M., Eckert, R. et al.: *Cancer Res.*, 44, 112-119, 1983.
  20. Lippman, M., Bolan, G. y Huff, K.: *Cancer Res.*, 36, 4595-4601, 1976.
  21. Lippman, M., Dickson, R., Bates, S. et al.: *Br. Cancer Res. and Treat.*, 7, 59-70, 1986.
  22. Nicholson, G. L.: *Biochem. Biophys. Acta*, 457, 57-68, 1976.
  23. Notides, A. y Gorski, J.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 56, 230-235, 1966.
  24. Pollack, R. y Rifkin, D.: *Cell*, 6, 495-506, 1975.
  25. Schimke, P., McLnight, S., Shapiro, D. et al.: *Recent Prog. Horm. Res.*, 31, 175-211, 1975.
  26. Smith, E. y Barker, K.: *J. Biol. Chem.*, 252, 3709-3714, 1977.
  27. Sutherland, R. L., Hall, R. L. y Taylor, W.: *Cancer Res.*, 43, 3998-4006, 1983.
  28. Valeriote, F. y Vieti, T. J.: En «Clinical Pediatric Oncology» (Suton, Vietti y Ferubach, eds.). C.V. Mosby Co., St. Louis, 1977, pp. 182-196.
  29. Vic, P., Vignon, F., Derocq, M. et al.: *Cancer Res.*, 42, 667-673, 1982.
  30. Vignon, F., Terqui, M., Westley, B. et al.: *Endocrinology*, 106, 1079-1086, 1980.
  31. Villalobos, M., Olea, N., Gorgojo, L. et al.: *Rev. esp. Fisiol.*, 43, 12-68, 1987.
  32. Weber, K., Osborn, M., Moll, R. et al.: *The EMBO J.*, 3, 2707-2714, 1984.
  33. Weichselbaum, R. R., Hellman, S., Piro, A. J. et al.: *Cancer Res.*, 38, 2339-2342, 1978.
  34. Westley, B. y Rochefort, H.: *Cell*, 20, 353-362, 1980.

