

Nuevo método para la determinación de receptores de estrógenos y progesterona en líneas celulares mamarias humanas

N. Olea *, N. Devleeschower y G. Leclercq

Laboratoire de Cancérologie Mammaire
Institut Jules Bordet
Bruxelles (Belgique)

(Recibido el 18 de diciembre de 1984)

N. OLEA, N. DEVLEESCHOWER and G. LECLERCQ. *Improved Method for the Determination of Estrogen and Progesterone Receptor Levels in Human Mammary Cell Lines.* Rev. esp. Fisiol., 41, 373-380. 1985.

A method for the determination of estrogen and progesterone receptor levels in human mammary cell lines (MCF-7, Cama-1, ZR-75-1, Evsa-T and HBL-100) is described. Cells cultured as monolayers were incubated with the tritiated steroids, [^3H]-17 β -Estradiol or [^3H] ORG-2058. Binding of steroids to receptors was a function of cellular uptake. Incubation periods of 50 min were sufficient to attain maximum intracellular incorporation. The binding of 17 β -E $_2$ and ORG-2058 to MCF-7 cells, a phenomenon which is saturable at low concentrations for the radioactive ligand, is a linear function of the number of cells assayed (Interval: 2.5×10^4 to 1.5×10^6 cells per well). Binding data and their Scatchard plot allowed for the calculation of affinity and capacity values. Thus, for ER, $K_d = 2.0 \pm 0.5 \times 10^{-10}$ M and $n = 3.76 \pm 0.91$ Fmol/ μg DNA, and for PgR $K_d = 2.0 \pm 0.2 \times 10^{-10}$ M and $n = 14.02 \pm 2.30$ Fmol/ μg DNA (Mean $\pm$ SD). Binding specificity of 17 β -Estradiol and ORG-2058 to MCF-7 cells was analysed by means of study on the inhibitory effect of increasing concentrations of unlabelled competitors: 17 β -Estradiol, ORG-2058, Estrone, DES, R-5020, Cortisol, Androsterone and Testosterone. Only pharmacological doses of some of the mentioned molecules produce displacement of the hormone-receptor binding. This phenomenon appears to be related to the affinity of these chemical compounds for the receptor macromolecules to which estrogens and progesterone bind.

Key words: Breast cancer cell lines, Estrogen and Progesterone receptors, Whole cell assay.

Las técnicas utilizadas habitualmente para la determinación de receptores para hormonas esteroideas, estradiol y proges-

terona, en tejidos *blanco* de dichas hormonas, implican en la mayoría de los casos, la destrucción celular para el aislamiento de las fracciones nuclear y citosólica (7). Además, la subsiguiente puesta en contacto de las hormonas tritadas con las macromoléculas receptoras se realiza

* A quien debe dirigirse la correspondencia: Departamento de Radiología. Hospital Clínico Universitario. 18080 Granada (España).

en condiciones de experimentación lejanas de aquellas en las que se produce fisiológicamente la unión hormona-receptor.

En este trabajo se describe un método para la medida de tasas de receptor de estrógeno y progesterona sobre la línea celular MCF-7, muy utilizada como modelo de estudio para el cáncer de mama hormonodependiente (6, 8, 19). Las células intactas se someten a incubación con los esteroides marcados y el enlace de estas moléculas al receptor es función de su captación celular.

La metodología del ensayo puesta a punto para la línea celular MCF-7 ha sido aplicada igualmente a las líneas tumorales hormonodependientes Cama-1 y ZR-75-1, a la línea tumoral no hormonodependiente Evsa-T y a la línea celular mamaria no tumoral HBL-100.

Material y métodos

Cultivo celular. La línea MCF-7 obtenida a partir de un derrame pleural metastásico, de una enferma portadora de un adenocarcinoma de mama, ha sido ampliamente estudiada y posee receptores para muy diferentes hormonas, entre ellas los estrógenos y la progesterona. Las líneas celulares mamarias ZR-75-1, Cama-1 y Evsa-T son igualmente tumorales pero hormonodependientes sólo las dos primeras. La línea HBL-100 de origen mamario no tumoral es débilmente hormonodependiente.

Las células son subcultivadas semanalmente en sistema monocapa utilizando cajas de plástico Falcon que contienen como medio de cultivo MEM (Gibco, Glasgow) complementado con 10 % de suero de ternera fetal, 0,6 mg/ml de L-glutamina (Gibco), 40 µg/ml de gentamicina (Shering), 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin (Difco).

Preparación del suero libre de esteroides. El suero de ternera fetal es inactivado durante una hora a 56°C e incubado con una suspensión de carbón y dextrano (0,5 de carbón y 0,005 % de dextrano, Merck) durante 18 h a 4°C. Tras eliminar dicha suspensión mediante centrifugación, 2000 g durante 10 min, el suero es esterilizado en filtro millipore 0,22 µm. Este suero de ternera fetal inactivado (FCS-DCC) es almacenado hasta su uso a -20°C.

Análisis de receptores en la célula intacta. La captación específica del 17 β-estradiol y del ORG-2058 por las células en cultivo se ha determinado por el método de SHAFIE y BROOKS (17), modificado.

Las células cultivadas en cajas de plástico T-75 son tratadas con una solución de tripsina-EDTA (0,5 % de tripsina, 0,02 % de EDTA, Gibco) y sembradas uniformemente en discos de 35 mm de ø, en medio MEM suplementado con 10 % de FCS-DDC.

El análisis de receptor de estrógeno (RE) y de progesterona (RPG) se realiza al cuarto día de la siembra celular. El medio de crecimiento es aspirado y reemplazado por 1 ml de medio fresco que contiene las hormonas tritiadas, ya sea el 17β-(2,4,6,7-[H³])-estradiol (90 Ci/mol, Amersham, o bien [H³]-ORG-2058 (47 Ci/mol, Amersham) en concentraciones comprendidas entre 0,1-9 nM y 0,3-10 nM, respectivamente. Para la determinación de los enlaces no específicos se realiza un experimento paralelo en el que, conjuntamente a la molécula marcada, se incorpora al cultivo celular un exceso 200 veces superior en concentración de hormona fría (estradiol de Calbiochem u ORG-2058 de Amersham).

Tras 50 min de incubación en atmósfera de 5 % de CO₂ a 37°C, los discos celulares son lavados por tres veces con una solución de CNa al 0,9 % a 4°C. La extracción de la radiactividad incor-

porada a las células se hace mediante la solubilización de los esteroides marcados en 1 ml de etanol absoluto (Merck), durante 20 min a temperatura ambiente.

Una alícuota de la solución alcohólica es medida en contador β usando Aqualuma Plus (Lumac), como líquido de centelleo.

En los experimentos realizados para calcular la afinidad de diferentes hormonas esteroideas por los receptores de estrógeno y progesterona se utilizan los siguientes competidores fríos: estrona, DES, androsterona, testosterona, cortisol y R-5020 (Sigma).

Determinación del DNA. Las determinaciones de DNA son realizadas por triplicado en diferentes discos que contienen células incubadas en idénticas condiciones experimentales. El tapiz celular es lavado con medio de Earle's y las células despegadas con la solución de tripsina-EDTA. El DNA es precipitado y extraído en HClO_4 0,5 N a 70°C , durante 20 min. El contenido del DNA total es determinado por el método de BURTON (3) y los resultados se expresan en base a los parámetros de tendencia central: valor de la media y desviación estándar.

Resultados

Influencia del tiempo en la captación celular de los esteroides. Tanto el $[\text{H}^3]\text{-E}_2$ como el $[\text{H}^3]\text{-ORG-2058}$ son rápidamente captados por las células MCF-7. El nivel de incorporación intracelular de cada uno de los ligandos se estabiliza a los 30 y 25 min aproximadamente. A partir de los 60 min la captación del ORG-2058 disminuye. Un periodo inferior a 50 min parece ser insuficiente para alcanzar el equilibrio, mientras que periodos más largos pueden ocasionar metabolización excesiva de alguno de los ligandos (2).

Análisis de receptores en las células intactas. La incorporación intracelular en la línea MCF-7 de $[\text{H}^3]\text{-E}_2$ y del $[\text{H}^3]\text{-ORG-2058}$ es un fenómeno saturable a bajas concentraciones de ligando radiactivo. Para evidenciar la existencia de macromoléculas receptoras capaces de unirse con alta afinidad a los esteroides marcados se han analizado gráficamente las curvas de saturación de la captación celular con el método de SCATCHARD (16). El tratamiento matemático de los datos de enlace se realizó utilizando el procedimiento de ajuste por mínimos cuadrados, obteniéndose los parámetros de la pendiente, ordenada y abscisa en el origen que permiten la deducción de la capacidad de enlace y de la constante de

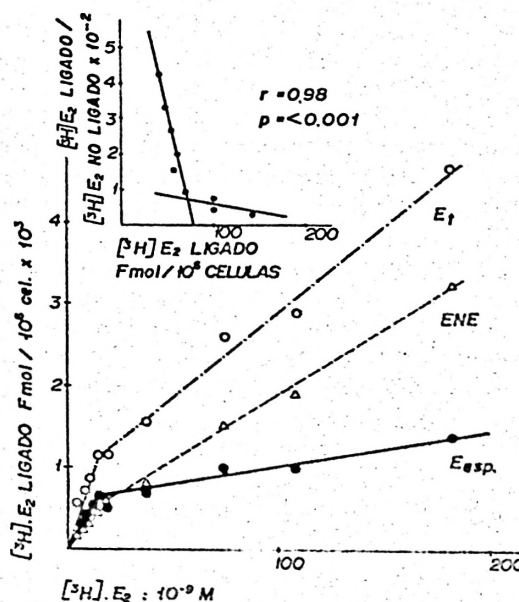


Fig. 1. Ensayo de receptores hormonales. Curva de saturación para el 17 β -estradiol y transformación de Scatchard de los datos de enlace específico.

Las células MCF-7 en monocapa, son incubadas durante 50 min con concentraciones de 0,1 a 9 nM de $[\text{H}^3]\text{-E}_2$ y un exceso del mismo esteroide no marcado. Los resultados son expresados en femtomoles de $[\text{H}^3]\text{-E}_2$ ligado por número de células empleado en el ensayo.

Tabla 1. Afinidad relativa (%) de diferentes esteroides por los receptores de estrógenos y progesterona.

Las células MCF-7 cultivadas en monocapa son incubadas durante 50 min con 1×10^{-9} M de $[H^3]$ -E₂ ó $1,3 \times 10^{-9}$ M de $[H^3]$ -ORG-2058 y concentraciones variables (10^{-3} — 10^{-9} M) de diferentes esteroides no marcados. La radioactividad incorporada es extraída con etanol absoluto y medida en contador de centelleo líquido.

	RE	RPg
17 β -estradiol	100	0,80
Dietilestilbestrol	100	0,07
Estrona	2,5	ND
ORG-2058	0,07	100
R-5020	ND	100
Androsterona	0,002	0,002
Testosterona	0,03	0,3
Cortisol	0,002	0,15

ND = No realizado.

disociación, y el coeficiente de correlación lineal. En la figura 1 se muestra la representación gráfica de la cantidad de $[H^3]$ -E₂ extraída de las células en función de la concentración de dicha hormona. La curva E_{esp}, indicativa de una función de saturación se obtiene mediante la sustracción de los valores de enlaces no específicos (ENE), a los valores del enlace total (E_t).

La representación de Scatchard permite calcular la capacidad del enlace del sitio aceptor de $[H^3]$ -E₂ resultando un valor de 75 fmol/10⁶ células. La constante de disociación aparente del proceso es de 2×10^{-10} M. Es necesario hacer notar la presencia de un segundo sitio aceptor del 17 β -estradiol, cuya función no es bien conocida (5), que presenta una mayor capacidad de enlace pero una más baja afinidad.

Un idéntico análisis aplicado a los valores obtenidos en la captación intracelular del $[H^3]$ -ORG-2058 permite construir la curva de saturación (fig. 2) así

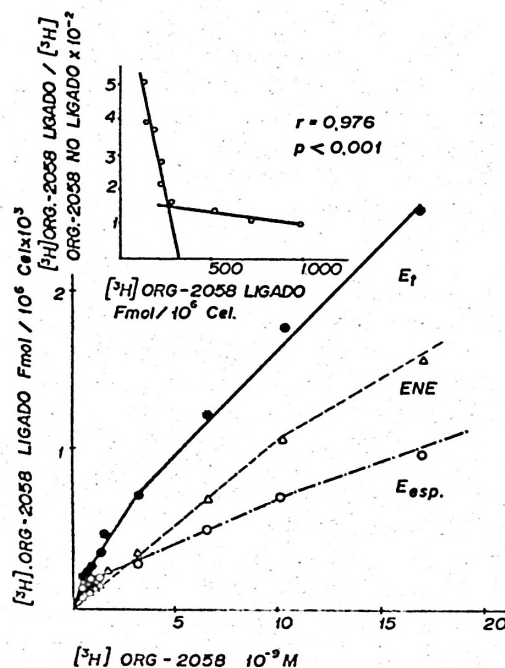


Fig. 2. Ensayo de receptores hormonales. Curva de saturación para el ORG-2058 y transformación de Scatchard de los datos de enlace específico.

Las células MCF-7 en monocapa, son incubadas durante 50 min con concentraciones de 0,3 a 10 nM de $[H^3]$ ORG-2058 y un exceso del mismo progestágeno no marcado. Los resultados se expresan en fentomoles de $[H^3]$ ORG-2058 ligado por número de células empleado en el ensayo.

como la capacidad de enlace del receptor de progesterona que tiene un valor de 325 fmol/10⁶ células y la constante de disociación del proceso que es de 3×10^{-10} M, indicativa de una alta afinidad.

Especificidad de enlace del 17 β -estradiol y del ORG-2058 a sus respectivos receptores. La especificidad del 17 β -estradiol y del ORG-2058 para la unión a los receptores de estrógeno y progesterona, ha sido analizada mediante experimentos de competitividad, estudiando la

Tabla II. *Influencia de diferentes esteroides sobre la capacidad y afinidad de enlace de los receptores de estrógenos y progesterona.*

El ensayo, sobre la línea MCF-7, se realiza estudiando la influencia de niveles farmacológicos de competidores no marcados (10^{-6} M) sobre el enlace específico del $[H^3]$ E₂ y $[H^3]$ ORG-2058, determinado por el método de Scatchard.

	RE		RPg	
	n*	Kd**	n*	Kd**
17 β -estradiol	3,8	0,2	14,5	2,4
ORG-2058	2,6	0,2	16,6	0,5
Androsterona	3,7	0,5	9,2	1,5
Testosterona	3,1	0,4	8,3	1,5
Cortisol	3,1	0,2	10,7	1,5

* Fmol/ μ g DNA; ** 10^{-10} M.

capacidad de inhibición del enlace de dichas hormonas a su receptor ocasionada por crecientes concentraciones de competidor no marcado (Intervalo 10^{-5} a 10^{-9} M). El cálculo del cociente entre la concentración del 17 β -estradiol o del ORG-2058 capaz de producir una inhibición del 50 % de la unión específica hormona marcada-receptor y la concentración de diferentes esteroides capaces de producir esa misma inhibición, permiten conocer las afinidades relativas del receptor por diferentes moléculas esteroideas (tabla I).

Influencia de dosis farmacológicas de diferentes esteroides en la captación celu-

lar del 17 β -estradiol y del ORG-2058. La adición de un exceso de diferentes hormonas esteroideas en una concentración final de 10^{-6} M al medio de cultivo celular en el que se ensaya la unión del 17 β -estradiol y del ORG-2058 a sus receptores, permite conocer su influencia sobre la capacidad de enlace del receptor de estrógeno y progesterona (tabla II).

Proporcionalidad entre el número de células utilizadas en cada ensayo y la captación específica de las hormonas tritadas. Se ha estudiado la captación celular del $[H^3]$ -E₂ y del $[H^3]$ -ORG-2058, para una concentración constante de di-

Tabla III. *Niveles de RE y RPg en diferentes líneas celulares mamarias. Rango de concentración de hormonas marcadas (0,1 a 10 nM).*

Los valores de n'y Kd se deducen por el método de Scatchard. Los resultados se expresan como el valor medio $\pm$ la desviación estándar. Entre paréntesis el número de ensayos realizados.

	RE		RPg	
	n*	Kd**	n*	Kd**
MCF-7	3,76 $\pm$ 0,91	2,0 $\pm$ 0,5 (9)	14,02 $\pm$ 2,30	2,0 $\pm$ 0,2 (9)
CAMA-1	3,11 $\pm$ 0,79	2,4 $\pm$ 1,5 (3)	4,16 $\pm$ 2,29	9,9 $\pm$ 8,8 (3)
ZR-75-1	1,77 $\pm$ 0,76	0,7 $\pm$ 0,6 (3)	3,74 $\pm$ 0,16	8,2 $\pm$ 6,9 (2)
Evsa-T	0	0 (2)	0	0 (2)
HBL-100	0,12 $\pm$ 0,02	0,7 $\pm$ 0,9 (2)	1,03 $\pm$ 0,80	0,3 $\pm$ 0,4 (2)

* Fmol/ μ g DNA; ** 10^{-10} M.

chos ligandos radiactivos, modificando el número de células MCF-7 empleadas (Intervalo $0,025-1,5 \times 10^6$) y se ha determinado la cantidad de hormona marcada expresada en Fmol que se ha incorporado a las células, en relación a la cantidad de DNA (expresada en μg), una vez corregidos los enlaces no específicos intracelulares. El ajuste por mínimos cuadrados de los puntos encontrados experimentalmente para los dos ligandos radiactivos define, en cada caso, una recta (Coeficientes de correlación lineal de 0,980 para el $[\text{H}^3]\text{-E}_2$ y para el $[\text{H}^3]\text{-ORG-2058}$).

Los niveles de RE y RPg en diferentes líneas celulares mamarias se expresan en la tabla III.

Discusión

El mecanismo de entrada de los estrógenos en las células *blanco* no es bien conocido. Puede pensarse que los esteroides, debido a su naturaleza lipofílica y no iónica, difunden libremente a través de la membrana (13), pero hay razones para suponer que esta estructura participa en la captación de los esteroides puesto que en las membranas de células uterinas en suspensión existen sitios específicos de unión para el estradiol cuya Kd es alta (15). Ya sea un proceso de difusión pasivo o un transporte activo, la observación experimental del fenómeno es demostrativa de que el mismo ocurre con rapidez, alcanzándose en pocos minutos un valor máximo.

Es fundamental considerar el hecho de que en un análisis realizado sobre células intactas en condiciones de una buena vitalidad celular, los esteroides no están en un sistema inerte y se producen fenómenos de metabolización intracelular de las hormonas incorporadas (2). Por esta razón, el ensayo de RE y RPg se limita a 45-50 min de incubación, tiempo que permite asegurar prácticamente la inexis-

tencia de alteraciones causadas por el metabolismo celular (2).

La constante de disociación es uno de los parámetros físico-químicos fundamentales para la caracterización del enlace receptor-hormona. Los valores de Kd para el RE y RPg en la línea celular MCF-7 (tabla III), están de acuerdo con los encontrados en sistema de ensayo no celular (12) y son sensiblemente más bajos, demostrativos de más alta afinidad, que los descritos en experimentos realizados empleando células intactas en suspensión (17, 22).

La tasa de 17β -estradiol y ORG-2058 enlazada en la célula intacta es reflejo de la unión específica de estas hormonas marcadas al conjunto celular (fracción nuclear, particulada y citosólica). La capacidad de enlace del sitio de máxima afinidad para el 17β -estradiol representa en las células MCF-7 subtetraploides, en crecimiento logarítmico, aproximadamente 45.000 sitios por célula. La capacidad de enlace del RPg representa un valor aproximado de 170.000 sitios por célula. Aunque se han descrito valores similares (2, 4) es necesario advertir la existencia de datos contradictorios (9, 17) cuya disparidad podría ser explicada en base a variaciones metodológicas o a la selección de variantes no hormonodependientes en varias sublíneas de la MCF-7 (11, 14).

La aplicación de la técnica aquí descrita para la determinación de las tasas de RE y RPg, sobre otras líneas celulares, muestra ser igualmente efectiva. Es importante resaltar que esta metodología evidencia la ausencia de macromoléculas capaces de enlazar con alta afinidad al 17β -estradiol y al ORG-2058 en la línea celular Evsa-T, considerada como no hormonodependiente, dato concordante con los resultados obtenidos al estudiar mediante ensayos más clásicos la receptividad de dicha línea celular (6). Por otra parte, la detección de niveles de receptor de 17β -estradiol y de ORG-2058

en la línea celular HBL-100, cuya existencia no se ha puesto de manifiesto por otros procedimientos analíticos (8), parece ser demostrativa de la mayor sensibilidad del ensayo sobre células intactas.

Por último, se ha estudiado la influencia que ejerce, sobre la tasa de RE y RPg, la presencia en el medio de incubación de diferentes esteroides dotados de débil afinidad por las macromoléculas receptoras. A dosis de 10^{-6} M de competidor, el ORG-2058 es el esteroide que modifica más sensiblemente la capacidad de unión del RE, hecho que parece estar respaldado por la ligera afinidad que en este sistema de trabajo presenta el ORG-2058 por el receptor de estrógeno (tabla I). Por otra parte, las modificaciones de diferentes esteroides sobre la capacidad de enlace del RPg son generales, sobre todo en el caso de la testosterona y la afinidad de enlace del ORG-2058 a su receptor se ve parcialmente afectada por la presencia en el medio de cultivo celular de dosis farmacológicas de 17β -estradiol.

Varios argumentos pueden formularse a favor de la utilización de técnicas de medida de RE y RPg que emplean células intactas. Es bien conocido el problema de la degradación, paso a formas de bajo peso molecular y pérdida de la capacidad de enlace de las moléculas receptoras, durante los procesos de homogenización celular (20). SHERMAN *et al.* (18) advierten de la presencia en extractos de tejidos tumorales mamarios humanos, de formas de receptor de estrógeno de bajo peso molecular (Meroreceptor), que si bien poseen los determinantes de enlace con alta afinidad al E_2 , son incapaces del enlace nuclear. Esto supone la cuantificación, en los métodos convencionales, de moléculas receptoras incapaces de translocación nuclear, etapa necesaria para la iniciación de una respuesta a los esteroides en la célula hormonodependiente.

Además de la evidente degradación del receptor en la fracción citosólica, las ma-

nipulaciones que llevan a la obtención de esta fracción de centrifugación de alta velocidad (105.000 g), ocasionan la parcial destrucción de muy diferentes estructuras celulares. Es, precisamente, en las fracciones particulares que quedan excluidas de la fracción citosólica por la ultracentrifugación, donde se ha descrito la existencia de un alto porcentaje de sitios específicos de unión del 17β -estradiol (1). Este hecho permite suponer que membrana celular, mitocondrias, microsomas o lisosomas, puede estar ligada a una vía biosintética o circuito de translocación nuclear del complejo hormona-receptor (15). Es importante considerar que, según recientes observaciones realizadas en distintos tejidos y líneas celulares *blanco* de la acción estrogénica, puede no ser correcto el actual modelo de acción hormonal que considera la translocación nuclear como un paso previo; hay evidencia (10, 21) de que la molécula receptora de estrógenos, tanto en presencia como en ausencia de 17β - E_2 , se localiza de manera preferencial en el núcleo de la célula y la existencia de receptor en la fracción citosólica es un artefacto producido por la homogenización tisular. La respuesta a la acción estrogénica se explica entonces, como un incremento de la afinidad del receptor por elementos nucleares. Estas últimas aportaciones científicas suponen una primacía del ensayo de receptores estrogénicos, realizado sobre células intactas en relación con los procedimientos convencionales usados y, es propósito de nuestro grupo proceder a la aplicación del método en clínica humana.

Resumen

Se describe un método para las determinaciones de los niveles de receptor de estrógenos y progesterona en líneas celulares mamarias humanas (MCF-7, Cama-1, ZR-75-1, Evsa-T y HBL-100). Las células cultivadas en monocapa son incubadas con los esteroides tritados [3 H]- 17β -estradiol o [3 H]-ORG-2058 y la unión

de éstos al receptor respectivo es función de su captación celular. Tiempos de incubación de 50 min son suficientes para que la incorporación intracelular sea máxima. El enlace del 17β -E₂ y el ORG-2058 sobre la línea celular MCF-7, fenómeno saturable a bajas concentraciones de ligando radiactivo, es función lineal del número de células sometidas a estudio (Intervalo $2,5 \times 10^4$ a $1,5 \times 10^6$ células/disco). Los datos de enlace y la transformación de Scatchard de los mismos permiten obtener los valores de afinidad y capacidad que resultan ser para el RE de $K_d = 2,0 \pm 0,5 \times 10^{-10}$ M y $n = 3,76 \pm 0,91$ Fmol/ μ g de DNA y para el RPg de $K_d = 2,0 \pm 0,2 \times 10^{-10}$ M y $n = 14,02 \pm 2,30$ Fmol (μ g de DNA ($M \pm DS$)). Se analiza la especificidad de la unión entre el 17β -estradiol y el ORG-2058 con las células MCF-7 estudiando la inhibición del enlace por concentraciones crecientes de competidores no marcados (17β -estradiol, ORG-2058, DES, estrona, R-5020, androsterona, cortisol y testosterona). Sólo dosis farmacológicas de algunas de dichas moléculas producen desplazamiento de la unión hormona receptor, estando este fenómeno relacionado con la afinidad que esos compuestos químicos presentan por las macromoléculas receptoras de estrógenos y progesterona.

Bibliografía

1. BAULIEU, E.-E.: *Molec. Cell. Endocr.*, **12**, 247-254, 1978.
2. BERGINK, E. W., VAN MEEL, F., TURPIJN, E. W. y VAN DER VIES, J.: *J. Steroid Biochem.*, **19**, 1563-1570, 1983.
3. BURTON, K. A.: *Biochem. J.*, **62**, 315-323, 1956.
4. BUTLER, W. B., KELSEY, W. H. y GORAN, N.: *Cancer Res.*, **41**, 82-88, 1981.
5. CLARK, J. H., WATSON, C. S., MARKAVERICH, B. M., SYNE, J. S. y PANKO, W. B.: *Breast Cancer Res. Treat.*, **3**, 61-65, 1983.
6. ENGEL, L. W. y YOUNG, N. A.: *Cancer Res.*, **38**, 4337-4339, 1978.
7. E.O.R.T.: *Europ. J. Cancer*, **9**, 379-381, 1973.
8. HORWITZ, K. B., ZAVA, D. T., THILAGAR, A. K., JENSEN, E. M. y MCGUIRE, W. L.: *Cancer Res.*, **38**, 2434-2437, 1978.
9. JAKESZ, R., SMITH, C. A., AITKEN, S., SCHUETTE, W., SHACKNEY, S. y LIPPMAN, M.: *Cancer Res.*, **44**, 619-625, 1984.
10. KING, W. J. y GREENE, G. L.: *Nature*, **307**, 745-747, 1984.
11. LIPPMAN, M., BOLAN, G. y HUFF, K.: *Cancer Res.*, **36**, 4595-4601, 1976.
12. LIPPMAN, M. E., MONACO, M. E. y BOLAN, G.: *Cancer Res.*, **37**, 1901-1907, 1977.
13. MULLER, R. E. y WOTIZ, H. H.: *Endocrinology*, **105**, 1107-1114, 1979.
14. PAGE, M. J., FIELD, J. K., EVERETT, N. P. y GREEN, C. D.: *Cancer Res.*, **43**, 1244-1250, 1983.
15. PIETRAS, R. J. y SZEGO, C. M.: *J. Steroid Biochem.*, **11**, 1471-1483, 1979.
16. SCATCHARD, G.: *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **31**, 660-672, 1949.
17. SHAFIE, S. y BROOKS, S. C.: *Cancer Res.*, **37**, 792-799, 1977.
18. SHERMAN, M. R., PICKERING, L. A., ROLLWAGEN, F. M. y MILLER, L. K.: *Fed. Proc.*, **37**, 167-173, 1978.
19. SOULE, H. D., VÁZQUEZ, J., LONG, A., ALBERT, S. y BRENNAN, M.: *J. Natl. Cancer Inst.*, **51**, 1409-1413, 1973.
20. TILZER, L. L., MCFARLAND, R. T., PLAPP, F. V., EVANS, J. P. y CHICA, M.: *Cancer Res.*, **41**, 1058-1063, 1981.
21. WELSHONS, W. V., LIEBERMAN, M. A. y GORSKI, J.: *Nature*, **307**, 747-749, 1984.
22. YANG, K.-P. y SAMAAAN, N. A.: *Cancer Res.*, **43**, 3534-3538, 1983.