

**NUEVAS PERSPECTIVAS para el  
CANCER DE MAMA HUMANO a partir  
de MODELOS EXPERIMENTALES**

Simposio Internacional  
Academia Nacional de Medicina  
Buenos Aires, 4 junio 1997

MEDICINA (Buenos Aires) 1997; 57 (Supl II): 55-69

**INDUCCION DE ADENOCARCINOMAS MAMARIOS POR PROGESTAGENOS  
EN RATONES BALB/c**

**PROGRESION DEL TUMOR HORMONO-DEPENDIENTE AL AUTONOMO**

**CLAUDIA LANARI<sup>1</sup>, MARIA FERNANDA MONTECCHIA<sup>2</sup>, PATRICIA PAZOS<sup>2</sup>, MARINA SIMIAN<sup>3</sup>,  
SILVIA VANZULLI<sup>4</sup>, CAROLINE LAMB<sup>4</sup>, ALFREDO A. MOLINOLO**

*Instituto de Biología y Medicina Experimental; <sup>1</sup>Instituto de Estudios Oncológicos,  
Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires*

**Resumen** En este trabajo se revisan las características esenciales del modelo experimental de carcinogénesis mamaria que hemos desarrollado en nuestro laboratorio administrando progestágenos a ratones hembra vírgenes BALB/c. Se describen las características principales de los tumores inducidos en cuanto a morfología, expresión de receptores de estrógenos (RE) y de progesterona (RP), hormono-dependencia y expresión de receptores de factor de crecimiento epidérmico (R-EGF). Se presentan evidencias donde se demuestra que el acetato de medroxiprogesterona (MPA) tiene efectos indirectos como ser la síntesis de EGF en glándula salival que participaría en la carcinogénesis mamaria junto con MPA. Revisamos resultados donde se evidencian efectos mitogénicos del MPA sobre cultivos primarios de tumores de crecimiento progestágeno dependiente (PD) mediados a través de RP. Los antiprogestágenos inhiben no sólo la proliferación inducida por MPA sino que también inhiben la proliferación en los grupos controles, lo que nos hizo hipotetizar acerca de la posibilidad de inducción de proliferación por ligandos no esteroideos que usarían la vía de RP. Demostramos que tumores ductales con aparente autonomía de crecimiento, que expresan altos niveles de RE y RP, retrogradan con tratamiento con antiprogestágenos lo que implicaría que tanto los tumores PD como sus variantes independientes utilizarían la vía de RP para crecer. Presentamos evidencias de que tumores que retrogradan se pueden hacer resistentes al tratamiento hormonal y que este fenómeno puede ser reversible. Las similitudes entre los tumores obtenidos con este modelo y el cáncer de mama humano, en lo que respecta a las características morfológicas, evolución y a la regulación del control de crecimiento hacen de este modelo una herramienta útil para explorar los mecanismos relacionados con la adquisición de la hormono-independencia.

**Palabras clave:** cáncer de mama, progesterona, acetato de medroxiprogesterona

<sup>1</sup> Miembro de la Carrera del Investigador del CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas)

<sup>2</sup> Becaria del CONICET

<sup>3</sup> Becaria de FUNDALEU (Fundación para Combatir la Leucemia)

<sup>4</sup> Becaria de Fundación Sales

**Dirección postal:** Dra. Claudia Lanari, Instituto de Biología y Medicina Experimental, Obligado 2490, 1428 Buenos Aires, Argentina

A partir de 1984, nuestro grupo de trabajo ha desarrollado y caracterizado una serie de modelos experimentales de inducción de adenocarcinomas mamarios en ratones BALB/c mediante la administración exclusiva de los progestágenos acetato de medroxiprogesterona (MPA)<sup>1,4</sup> o progesterona (Pg)<sup>5</sup>, o bien de la administración concomitante de MPA con un carcinógeno químico como la nitrosometilurea (MNU)<sup>6</sup> (Fig. 1).

### Tumores inducidos por MPA

Los tumores originados en ratones tratados exclusivamente con MPA son en su mayoría carcinomas ductales (Fig. 2) que expresan altos niveles de receptores de estrógenos (RE) y de progesterona (RP) y niveles no detectables de receptores de factores de crecimiento epidérmico (R-EGF). En pasajes singeneicos, tienen un comportamiento *progestágeno-dependiente* (PD) (MPA o progesterona-dependientes) (Fig. 3). Estos tumores, mantenidos por pasajes seriados en ratones tratados con MPA, dan metástasis en pulmón y en el ganglio axilar homolateral (Fig. 4). Por distintos métodos, esencialmente por pasajes sucesivos en animales sin tratar (Fig. 5), pudimos seleccionar variantes capaces de crecer sin

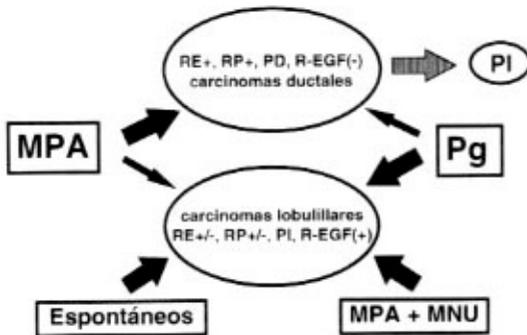


Fig. 1.- Inducción de adenocarcinomas mamarios en ratones hembras BALB/c. *MPA*: se administra como droga depot sc, 40 mg cada 3 meses durante un año o bien se implanta cada 6 meses un pellet de silastic conteniendo 40 mg de la hormona. La latencia de aparición de los tumores es mayor al año. *Pg*: se administra en pellets de silastic de 40 mg cada 6 meses. La latencia de aparición de los tumores es mayor al año. *MNU*: Se administra sc, en dosis de 50 mg/kg de peso, una semana después o antes de MPA según protocolo. Los tumores tienen una latencia de aparición de 7 meses aproximadamente.

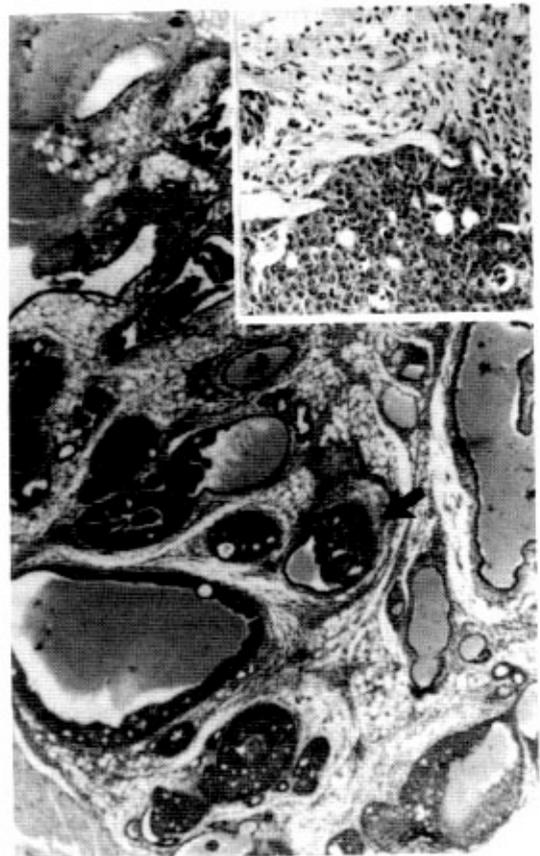


Fig. 2.- Lesiones ductales. La figura muestra conductos dilatados con crecimiento intraductal papilar o cribiforme. En áreas existe invasión del estroma (flecha). Inserto: Carcinoma ductal invasor con morfología cribiforme con estroma fibroblástico. Las áreas blancas peritumorales son artefactos por la fijación en alcohol. Hematoxilina-eosina, 125x. Inserto: 40x.

el aporte exógeno de progestágenos, por lo que se las ha denominado *progestágeno-independiente* (PI).

En menor proporción, el MPA induce también tumores de tipo lobulillar (Fig. 6). Estos tumores no expresan receptores hormonales, o si los expresan los pierden durante los primeros pasajes. Si expresan, en cambio, receptores para EGF. Si bien algunos son hormono-respondedores en los primeros pasajes, luego se hacen completamente autónomos o PI (Fig. 3). La histología de estos tumores presenta similitudes con los carcinomas mamarios que surgen espontáneamente en hembras multiparas BALB/c.

Cada una de las lesiones tumorales descriptas (ductales y lobulillares) está precedida por alteraciones morfológicas particulares, comparables

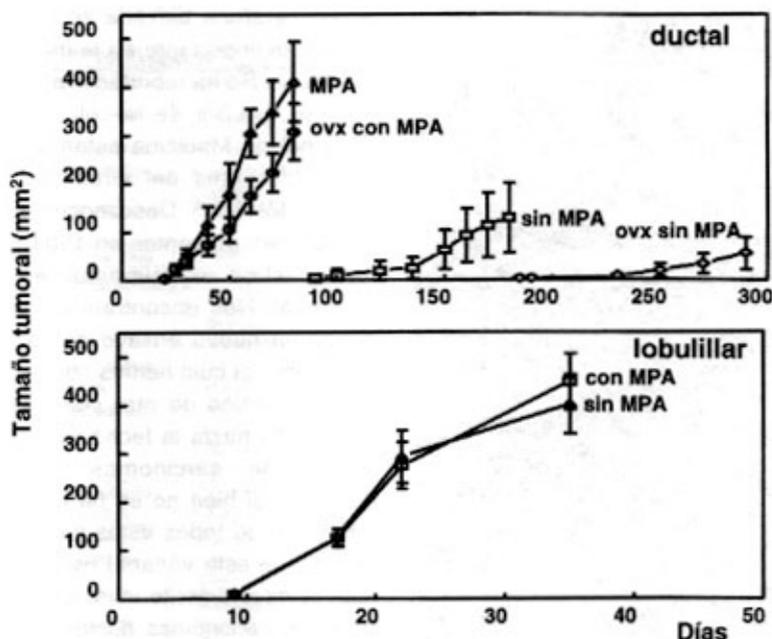


Fig. 3.—Crecimiento tumoral de adenocarcinomas mamarios ductales y lobulillares en presencia o ausencia de MPA. Los tumores son transplantados ( $10^5$  células tumorales sc) en ratones hembras ovariectomizados o controles, tratadas o con 40 mg de MPA. Los tumores *ductales* no crecen en ratones adrenalectomizados y ovariectomizados.

a las lesiones preneoplásicas del cáncer de mama humano. Estas lesiones son lo suficientemente específicas como para poder predecir a qué tipo de neoplasia darán origen. En la Fig. 7 se muestran las alteraciones más típicas de estas lesiones preneoplásicas, junto con un esquema para mayor claridad.

En la Tabla 1 se resumen las principales características de los tumores ductales y lobulillares.

### Modulación de la inducción de adenocarcinomas mamarios

Tanto la sialoadenectomía<sup>7</sup> como la ovariectomía previas al tratamiento con MPA, disminuyen significativamente la incidencia tumoral. Los tumores inducidos muestran los mismos patrones histológicos y biológicos de los tumores que aparecen en animales no operados (Fig. 8). La sialoadenectomía y la ovariectomía se asocian a una disminución evidente de la hiperplasia mamaria ductal inducida por la hormona. Resulta interesante que aún en animales ovariectomizados, con niveles no detectables de estrógenos séricos, la glándula mamaria es capaz de

responder a progestágenos. Esto sugiere: a) la presencia de RP no inducibles por estrógenos, posibilidad ya propuesta por Haslam y col,<sup>8</sup> y b) la posibilidad de que factores indirectos actúen en la glándula mamaria reemplazando el rol de los estrógenos. Teniendo en cuenta que la sialoadenectomía inhibe la incidencia de tumores inducidos por MPA y que éste, interactúa con receptores de andrógenos en la glándula salival induciendo la síntesis de EGF<sup>9</sup>, dosamos los niveles de EGF sérico en ratones tratados con hormona y encontramos niveles muy elevados (3-100ng/ml vs 1ng/ml en controles); sorpresivamente, estos niveles se hacían evidentes sólo después del primer mes de tratamiento. Estos cambios no se observaron en ratones sialoadenectomizados tratados con MPA. Hemos demostrado que la administración exógena de EGF (5  $\mu$ g/36 h durante 45 días) a ratones sialoadenectomizados tratados con MPA restaura el fenotipo característico de la glándula mamaria correspondiente a ratones tratados con MPA (manuscrito enviado para su consideración). Estos resultados sugieren la participación del EGF endocrino en la carcinogénesis mamaria por MPA.



Fig. 4.- Metástasis pulmonar del carcinoma C7HI. Células neoplásicas proliferando en el tejido pulmonar. Se observa áreas de edema y enfisema. Hematoxilina-eosina, 40x.

### Tumores inducidos por Pg

La Pg también induce adenocarcinomas mamarios en ratones BALB/c, la mayoría de ellos de estirpe lobulillar, precedidos por lesiones preneoplásicas del lobulillo, sin compromiso ductal<sup>5</sup>. (Fig. 6). Es importante enfatizar que, independientemente de la hormona inductora, los tumores lobulillares y ductales mantienen los patrones biológicos de crecimiento y expresión de receptores.

### Tumores de mama espontáneos de BALB/c

Los tumores espontáneos de hembras multiparas, así como las lesiones preneoplásicas son de estirpe lobulillar. Estos resultados sugieren que

la progesterona elevada en la preñez podría jugar un rol importante en la inducción de tumores mamarios. Se ha reportado recientemente que los ratones BALB/c de la colonia de la Academia Nacional de Medicina están infectados con dos tipos diferentes del virus del tumor mamario murino (MMTV)<sup>10</sup>. Desconocemos si estas variantes estaban presentes en 1984 cuando se iniciaron nuestros experimentos en carcinogénesis hormonal. Nos encontramos actualmente analizando un nuevo ensayo de carcinogénesis con MPA, para el cual hemos utilizado ratones BALB/c provenientes de otra colonia. Los resultados analizados hasta la fecha sugieren una alta incidencia de carcinomas mamarios tumores ductales. Si bien no se ha completado la caracterización de todos estos tumores, los datos sugieren que esta variante específica de MMTV no estaría directamente involucrada en la inducción de adenocarcinomas ductales PD.

Argumentos a favor del potencial carcinogénico independiente del MPA son: a) el MPA también induce neoplasias mamarias en perros<sup>11</sup> y favorece la carcinogénesis en otros modelos<sup>12</sup>, b) los tumores espontáneos de multiparas inducidos por MMTV en BALB/c tienen un comportamiento biológico y marcadores bioquímicos diferentes a la mayoría de los inducidos por MPA, c) en el momento actual con una dosis única de MPA se obtienen tumores múltiples de tipo lobulillar antes del año mientras que en los experimentos realizados con anterioridad a 1990 esta dosis única no inducía tumores.

### Lineamiento general del trabajo del grupo

En distintas etapas de la evolución de nuestro grupo, nuestros intereses han ido cambiando y nuestro trabajo enfocándose en diferentes aspectos del modelo. A lo largo de los años hemos ido caracterizando varios aspectos del modelo, su morfología y su biología, siguiendo a veces las necesidades impuestas por los objetivos del momento y otras la simple satisfacción de la curiosidad. Gradualmente, a medida que fuimos aprendiendo a manipular distintos factores que regulan el comportamiento de nuestros tumores *in vivo* e *in vitro*, nuestros intereses se fueron focalizando en los mecanismos relacionados con el

Tabla 1. Características morfológicas y biológicas de los carcinomas lobulillares y ductales.

PARAMETRO	CARCINOMAS DUCTALES	CARCINOMAS LOBULILLARES
<b>Inducción</b>	MPA, ocasionalmente Pg	Pg, MNU, espontáneos, ocasionalmente MPA.
<b>Receptores Hormonales</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• RP: 50 - 1000 fmol/mg proteína.</li> <li>• RE: 20 - 200 fmol/mg proteína.</li> </ul> <i>La expresión de receptores se mantiene en pasajes singéneos.</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• RP: 0 - 100 fmol/mg proteína.</li> <li>• RE: 0 - 50 fmol/mg proteína.</li> </ul> <i>La expresión de receptores se pierde en pasajes singéneos.</i>
<b>R-EGF</b>	No detectables.	Niveles siempre > de 5 fmol/mg proteína.
<b>R-Prolactina</b>	Entre 6 y 32 fmol/mg proteína.	Entre 9 y 33 fmol/mg proteína.
<b>Preneoplasias</b>	Hiperplasias ductales.	Hiperplasias lobulillares.
<b>Sensibilidad a hormonas</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Progestágeno-dependientes. <i>Se pueden originar variantes progestágeno-independientes</i></li> <li>• Retrogradan con estrógenos y antiprogestágenos. <i>Se pueden originar variantes insensibles a estrógenos.</i></li> </ul> Todas las variantes conservan los RP y RE.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• No incrementan su crecimiento en respuesta a los progestágenos.</li> <li>• No retrogradan en respuesta a estrógenos o antiprogestágenos.</li> </ul>
<b>Crecimiento <i>in vivo</i></b>	Crecimiento lento. Sobrevida > de 2 meses.	Crecimiento rápido. Sobrevida < 2 meses.
<b>Crecimiento <i>in vitro</i></b>	Organoides; los fibroblastos interfieren con el crecimiento epitelial.	Organoides; Células epiteliales con alta velocidad de crecimiento, sin interferencia por fibroblastos.
<b>Estroma</b>	Abundante, fibroblástico, poca necrosis, infiltración linfomonocitaria e histiocitaria.	Escaso, fibroblástico, necrosis, poca infiltración celular.
<b>Metástasis</b>	Ganglios regionales, pulmón, hígado.	No, en tumores inducidos por Pg. Pulmonares en tumores espontáneos en multiparas

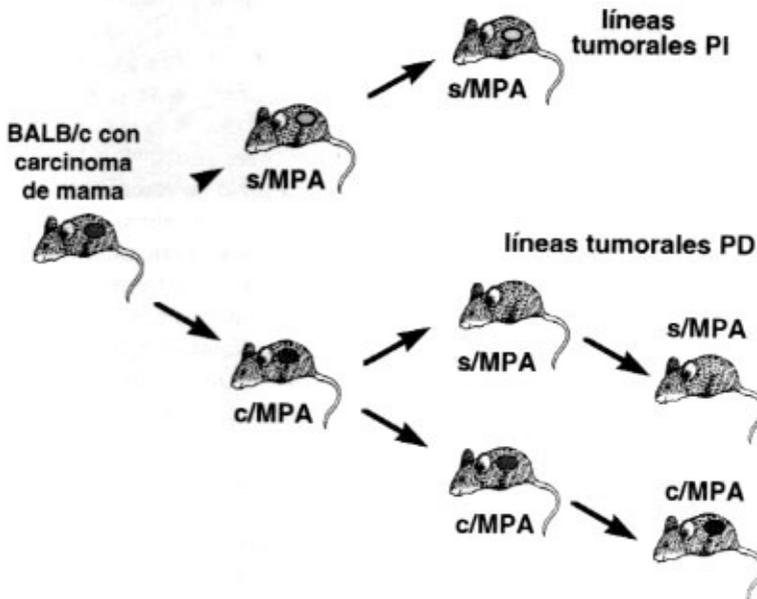


Fig. 5.- Obtención de líneas tumorales PD y PI. Se transplanta el tumor primario a dos ratones tratados con MPA (20 mg depot, sc, contralateral al transplante tumoral) y a dos ratones sin tratar. Los tumores ductales crecen sólo en los tratados con MPA durante los primeros 2-3 meses de seguimiento. Cuando el tumor alcanza un tamaño aproximado de 10-15 mm de diámetro, se transplanta a otros dos ratones tratados o no con MPA y así sucesivamente, controlando la hormono-dependencia, es decir que el tumor no crezca durante dos meses en los ratones sin tratar. Para seleccionar una variante PI, se espera hasta que empiece a crecer un tumor en los animales sin tratar y se lo transplanta a animales sin tratar y así sucesivamente.

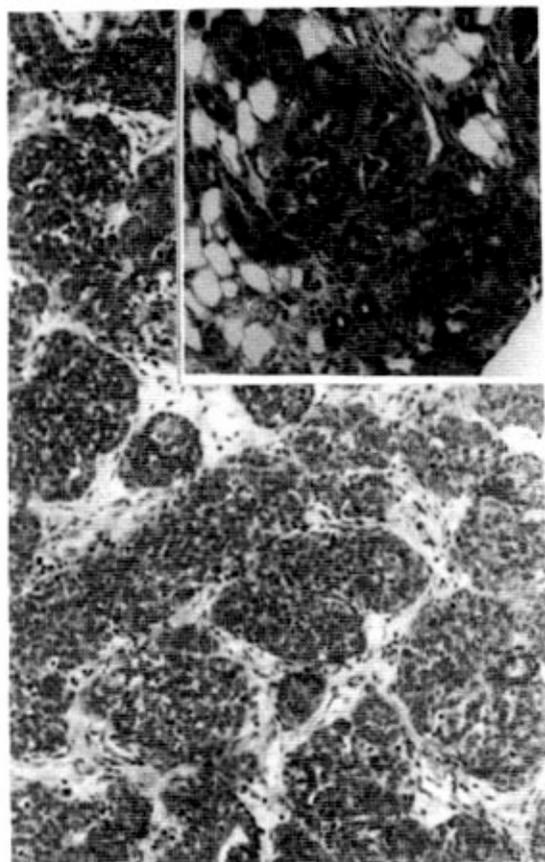


Fig. 6 - Lesiones lobulillares. El carcinoma lobulillar está constituido por células poligonales que diferencian lóbulos irregulares. El estroma es poco conspicuo. Inserto: Lesión preneoplásica lobulillar; las células proliferan rellenoando las estructuras acinares. Hematoxilina-eosina, 125x. Inserto: 40x.

control del crecimiento, la dependencia hormonal y la reversibilidad de este fenómeno.

### Progesterona como hormona mamaria proliferativa

A partir de las primitivas observaciones de Beatson en 1896<sup>13</sup> quien describió las influencias ováricas como causa primaria en el control del crecimiento en el cáncer de mama, se han identificado distintos factores endocrinos capaces de regular la proliferación celular en estos tumores, en especial las hormonas esteroides y los factores de crecimiento<sup>14</sup>. Tradicionalmente se ha atribuido

a los estrógenos el papel inductor de la proliferación, mientras que se han considerado a los progestágenos hormonas esencialmente diferenciadoras, una extrapolación de sus efectos en el endometrio<sup>15</sup>. Sin embargo, utilizando modelos de carcinogénesis química, se ha demostrado en que tanto estrógenos como progestágenos son capaces de aumentar la incidencia tumoral y acortar la latencia de los tumores, y existen actualmente numerosas evidencias clínicas y experimentales que sugieren un rol proliferativo activo para los progestágenos<sup>16, 17</sup>. A pesar del hecho de que en distintos modelos *in vitro* utilizando líneas celulares, los progestágenos inhiben el crecimiento celular epitelial, existe una evidente contradicción entre estos efectos inhibitorios, y la estimulación que estas hormonas inducen sobre la síntesis de factores de crecimiento proliferativos y sus receptores<sup>16, 17</sup>. En ciertas líneas como T47D, los progestágenos cubren todo el espectro de posibles acciones sobre la proliferación celular, es decir inhibiendo, estimulando o careciendo de efectos evidentes. Para aumentar aún más la confusión, se ha descrito que, en presencia de estrógenos, los progestágenos tienen efecto inhibitorio, pero se comportan como estimulatorios en presencia de 5% de SFB adsorbido con carbón (ch)<sup>16, 18</sup>.

De estos datos se puede rescatar la posibilidad de que el efecto estimulatorio de los progestágenos sea sensible a la presencia de otros esteroides y/o factores de crecimiento.

Cuando se analizan las modificaciones que sufre el epitelio mamario normal como respuesta a las variaciones hormonales del ciclo sexual, tanto en humanos como en ratón se observa que el pico proliferativo coincide con la fase progestacional<sup>19, 20</sup>. Una hipótesis para explicar esta aparente contradicción entre los estudios *in vitro* con líneas celulares tumorales y los efectos observados en la glándula mamaria normal, es que la acción de los progestágenos no sería directa, y puede estar mediada por la regulación de otros factores como el EGF o factores símil insulina (IGFs). Otra posibilidad es que las progenies celulares en cultivo no involucren a la población respondedora a progestágenos.

Hasta el momento no existen modelos adecuados para el estudio de la regulación normal del epitelio mamario; si bien se ha logrado generar líneas celulares luego de transfección con SV40

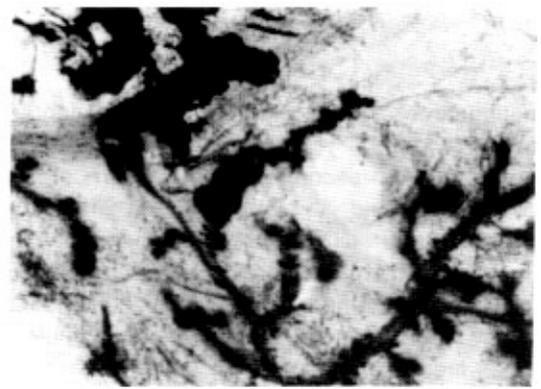
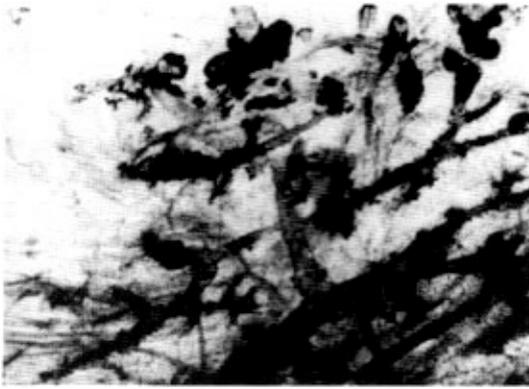
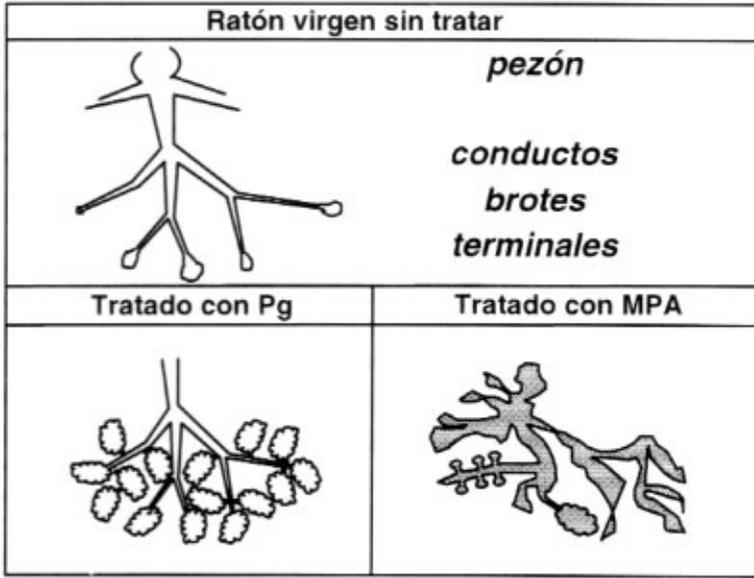


Fig. 7.- A: Esquema representando la imagen de una glándula mamaria de una hembra virgen BALB/c y las imágenes que se obtienen después de tratamiento con Pg: proliferación lobulillar que evoluciona al carcinoma y con MPA: alteraciones en los conductos, distorsiones en el grosor, desarreglo en el ángulo de bifurcaciones, brotes paraductales típicos e hiperplasia lobulillar. B: Montaje total de una glándula mamaria de un ratón tratado con MPA (15 meses). C: Montaje total de una glándula mamaria de un ratón tratado con Pg (15 meses).

o papiloma virus, o por exposición continua a bajas concentraciones de calcio<sup>21</sup>, ninguna de estas líneas expresa RE o RP.

Una nueva posibilidad en el análisis del papel de los receptores en la regulación de la proliferación y diferenciación celulares, surge de la inducción de la expresión de estos receptores en cocultivo de células epiteliales con fibroblastos estromales<sup>22</sup>. Este descubrimiento jerarquiza el papel del estroma tumoral en el mantenimiento del fenotipo neoplásico, y aporta más datos a la propuesta de la existencia de mecanismos indirectos a través de los cuales se controla la expresión

de los receptores y, secundariamente, a los procesos celulares a su vez regulados por éstos.

Un hecho interesante, que indirectamente apoya el rol proliferativo de los progestágenos, es que los antiprogestágenos también tienen un efecto inhibitorio sobre la proliferación celular, lo cual se ha verificado en distintos modelos murinos<sup>23</sup> y también en líneas celulares tales como T47-D y MCF-7, en las cuales se había demostrado previamente que los progestágenos eran inhibitorios<sup>24</sup>.

Del análisis de todos los antecedentes presentados surge que los progestágenos en concentraciones fisiológicas pueden jugar un rol como

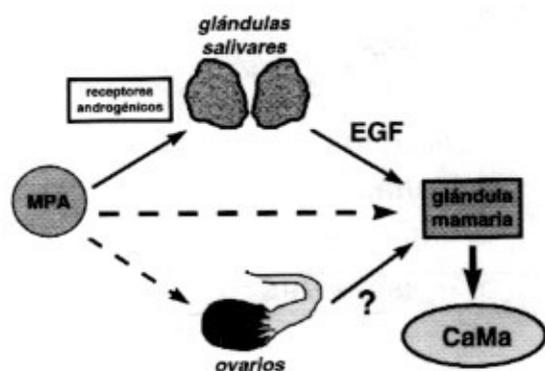


Fig. 8.- Cofactores en la inducción de carcinomas mamarios. La sialoadenectomía y la ovariectomía disminuyen la incidencia de adenocarcinomas mamarios inducidos por MPA. El MPA induce un aumento de EGF sérico sintetizado en glándulas salivares que, actuando conjuntamente con el MPA, favorece la inducción de adenocarcinomas mamarios. El trofismo de la glándula mamaria normal es mantenido por los ovarios, lo que indirectamente favorece la acción carcinogénica del MPA.

estimulantes de la proliferación en glándula mamaria normal y neoplásica y que los estrógenos podrían secundariamente favorecer esta acción induciendo la síntesis de RP. El MPA en dosis altas se utiliza para el tratamiento del carcinoma de mama hormono-dependiente, y sus efectos son comparables a los del tamoxifeno<sup>25, 26</sup>. Se desconoce si estas acciones del MPA están mediadas o no por RP. Los estrógenos en

altas concentraciones han sido también usados con éxito, y con muchos efectos colaterales<sup>27</sup>.

En la Tabla 2 se muestra una lista de publicaciones que refieren incremento de incidencia tumoral o aumento de la proliferación celular en respuesta a progestágenos.

### Efecto directo de progestágenos sobre las células PD

En estos últimos 5 años, hemos logrado desarrollar cultivos primarios de diferentes tumores ductales tanto PD como PI, y también de carcinomas de estirpe lobulillar. En la Fig. 9 se observa el procedimiento que realizamos para obtener cultivos enriquecidos en células epiteliales tumorales o en fibroblastos estromales (Fig. 10). Los elementos celulares morfológicamente epiteliales son positivos para la inmunomarcación con citoqueratina, lo que confirma su origen epitelial<sup>50</sup>.

Utilizando una de las líneas tumorales ductales, la que denominamos C4-HD demostramos que el MPA o la Pg en presencia de 1-5% de SFB ch, tienen un efecto estimulador sobre la incorporación de <sup>3</sup>H-timidina. El antiprogestágeno mifepristona (MF) inhibe completamente la proliferación celular, incluso inhibe la proliferación que se obtiene en ausencia de progestágeno, mientras que el antiandrógeno flutamida por el contrario, no tiene efecto sobre la proliferación celular (Fig. 11). Estos resultados sugie-

TABLA 2.- Rol proliferativo o carcinogénico de los progestágenos en el tejido mamario (Referencias por orden cronológico).

Estudios <i>in vitro</i>	
Koyama et al., <sup>28</sup>	La Pg más insulina induce desarrollo lóbulo-alveolar en cultivo de órgano de glándula mamaria de ratas adultas, usando medio suplementado con suero.
Ederly et al., <sup>29</sup>	La Pg induce proliferación en organoides de mama normal de rata cultivados con colágeno.
Simon et al., <sup>30</sup>	La Pg o el tamoxifeno, en concentraciones similares a las terapéuticas, estimulan el crecimiento en líneas de carcinomas mamarios humanos que habían recidivado bajo tratamiento con MPA o tamoxifeno.
Whitehead et al., <sup>31</sup>	La Pg es necesaria para la proliferación celular en la línea PMC42 de carcinoma mamario humano. Su efecto es aditivo con E <sub>2</sub> .
Imagawa et al., <sup>32</sup>	La Pg tiene un efecto sinérgico con PRL en la proliferación de células mamarias epiteliales de ratón.
Richards et al., <sup>33</sup>	La Pg tiene un efecto estimulador de la proliferación, sinérgico con PRL y EGF, en cultivos de tumores mamarios de ratas F344.

Manni et al., <sup>34</sup>	La Pg tiene un efecto estimulador de la proliferación de colonias, en cultivos en agar blando de tumores mamarios en ratas inducidos por MNU.
Hissom et al., <sup>18</sup>	La Pg estimula la proliferación en células T47D de cáncer de mama cultivadas con suero fetal bovino, depletado de esteroides y otras moléculas de bajo peso molecular.
Papa et al., <sup>35</sup>	La Pg aumenta el efecto estimulador de la insulina de células T47D
Modiano et al., <sup>36</sup>	La Pg aumenta el efecto proliferativo inducido por EGF en una línea celular felina de cáncer de mama
Shi et al., <sup>16</sup>	En determinados medios de cultivo la Pg tiene efectos estimuladores sobre células T47D.
<b>Estudios <i>in vivo</i></b>	
Loeb y Moskop Kirz <sup>37</sup>	Implicaron a la Pg como posible cofactor en la inducción de tumores mamarios que se obtienen por trasplantes hipofisarios en algunas cepas de ratones.
Cantarow et al. <sup>38</sup>	Dosis bajas de Pg promueven el crecimiento en tumores de rata inducidos por 2-acetaminofluoreno.
Huggins y Yang <sup>39</sup>	El "ambiente progestacional" induce un aumento de la incidencia de tumores inducidos por DMBA en ratas Sprague-Dawley.
Van Nie y Thung <sup>40</sup>	Tumores de la cepa de ratones GR que regresan después del parto recrecen con tratamiento combinado de estrógenos y Pg.
Jabara <sup>41</sup>	La Pg aumenta la incidencia de tumores de mama inducidos por DMBA en ratas Sprague-Dawley.
Bresciani <sup>42</sup>	La Pg estimula en ratones ovx la síntesis de DNA del epitelio ductal.
Sluysen y Van Nie <sup>43</sup>	Inducen tumores de mama en ratones GR con la administración conjunta de estrona y Pg.
Yanai et al., <sup>44</sup>	En ratones GR portadores de tumores dependientes de la preñez, la Pg aumenta la síntesis de DNA en el tumor y también en la mama normal.
Diamond y Hollander <sup>45</sup>	Pg aumenta el crecimiento del tumor trasplantable de rata MTW9.
Concannon et al., <sup>11</sup>	El MPA induce carcinomas de mama en perros Beagle.
Nagasawa et al., <sup>46</sup>	La Pg estimula la formación de lesiones preneoplásicas lobulillares en mama de ratones normales (HAN)
Dao et al., <sup>47</sup>	La Pg aumenta el índice mitótico en carcinomas de mama de pacientes tratados con Pg tres días antes de la biopsia.
Kiss et al., <sup>48</sup>	En el modelo de tumores mamarios de ratón MXT, la administración intraperitoneal de Pg induce un aumento del índice mitótico 12-24 h posteriores a la inyección en el tumor pero no en el útero.
Longacre et al., <sup>20</sup>	En autopsias de mujeres sin anomalías mamarias clínicas o histológicas, las mitosis epiteliales en mama se detectan entre los días 22 a 28 del ciclo menstrual, coincidiendo con el pico de Pg, siendo indetectables en otro momento del ciclo.
Robinson y Jordan <sup>49</sup>	La administración de Pg previene la inhibición inducida por tamoxifeno en el modelo de inducción de cáncer de mama por DMBA en ratas Sprague Dawley.
Russo et al., <sup>12</sup>	El MPA, en ratas vírgenes Sprague-Dawley, en dosis anticonceptivas no afecta el desarrollo de la glándula mamaria y no modifica la respuesta del órgano a la administración de DMBA. La administración de dosis 10 veces mayores inhibe la diferenciación de la glándula y aumenta la incidencia tumoral.

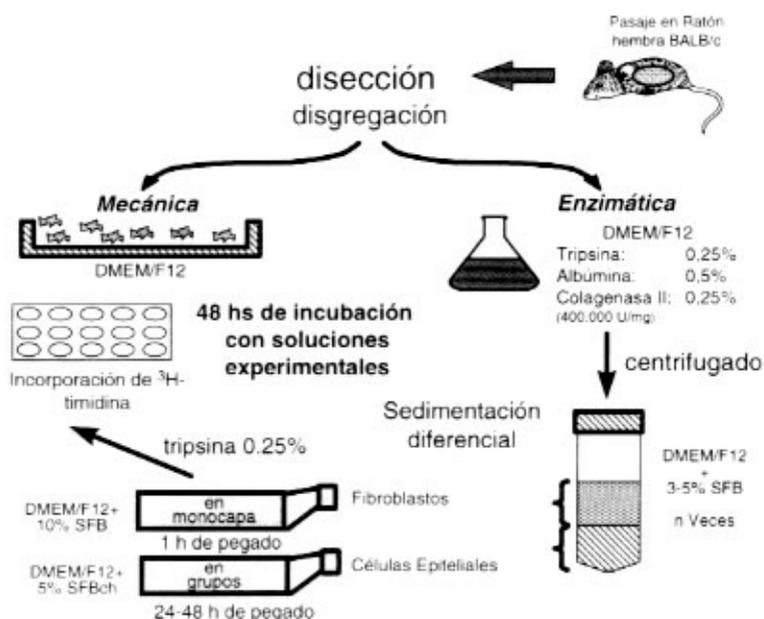


Fig. 9- Cultivo de tumores primarios y ensayos de proliferación celular.

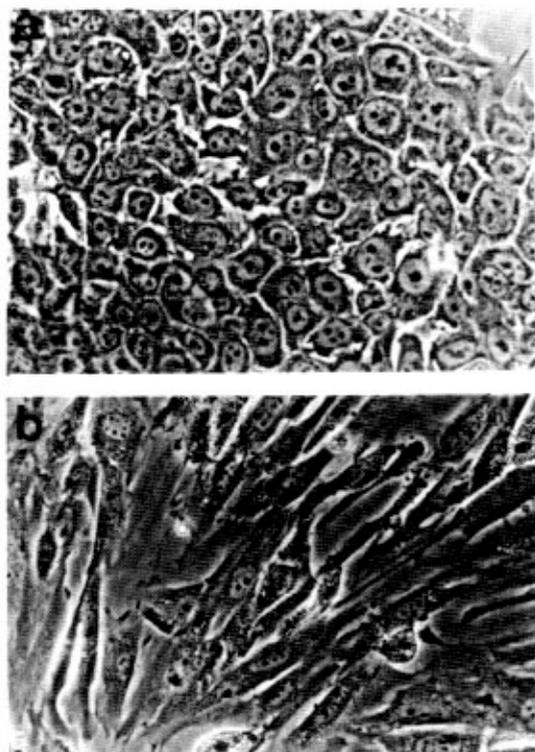


Fig. 10.- Cultivo primario de células epiteliales (A) y de fibroblastos estromales de C4-HD (B). Contraste de fase, 250x.

ren que el efecto de MPA está mediado por RP y no por posibles receptores de andrógenos; por otra parte nos condujeron a hipotetizar que las células en los cultivos en ausencia de progestágeno podrían estar creciendo utilizando factores que interactúan con la vía del RP.

Cuando estudiamos los efectos del agregado exógeno de distintos factores de crecimiento (EGF, IGF I, IGF II, TGFβs y FG Fs), en presencia y ausencia de progestágeno, sólo se observó estimulación con FGF<sub>1</sub> (Tabla 3). Los TGFβs, por otra parte, demostraron ser inhibitorios.

A diferencia de lo encontrado con las células neoplásicas, MPA carece de efectos mensurables sobre el crecimiento de fibroblastos estromales en cultivo, mientras todos los otros factores ensayados, incluyendo los TGFβs, tienen efectos estimulatorios.

Estos resultados descubren un complejo sistema de estímulos interconectados e interdependientes, con un componente neoplásico epitelial sensible a los estímulos hormonales y un estroma muy sensible a los factores de crecimiento. Un término más de esta compleja ecuación lo constituye el hecho de que, especialmente en los tumores ductales, el estroma es sumamente complejo, compuesto no sólo por una población

**Tabla 3. Incorporación de  $^3\text{H}$ -timidina en células epiteliales y fibroblásticas en cultivos de C4HD**

TIPO DE CELULA	EGF 0,05-100ng/ml	IGFs 1-200ng/ml	FGFs 1-100ng/ml	TGF $\beta$ s 7pg-70ng/ml
Epiteliales	☒	☒	↑↑↑	↓↓
Fibroblastos	↑↑↑	↑	↑↑↑	↑↑↑

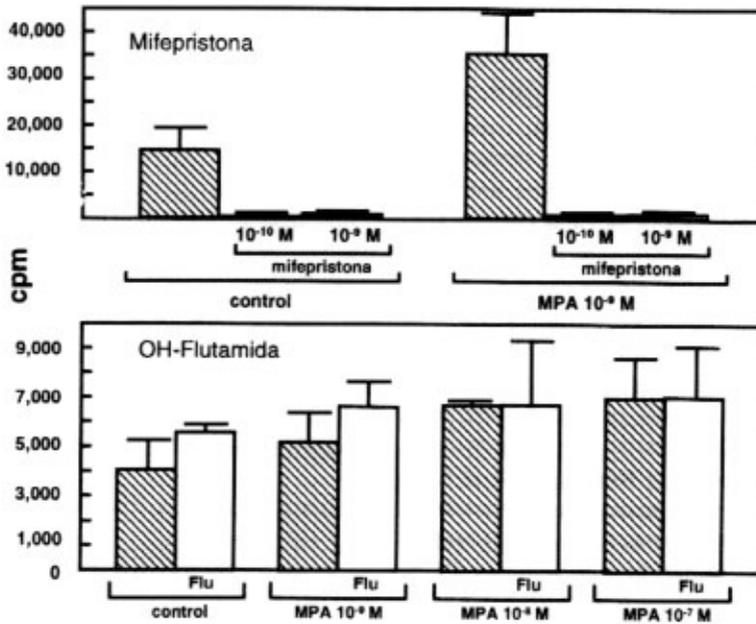


Fig. 11.- Efectos de mifepristona e OH-flutamida (flu) sobre la incorporación de  $^3\text{H}$ -timidina en cultivos de la línea C4-HD. Se sembró una suspensión celular ( $5 \times 10^4$  células/ml/hoyo aproximadamente) en placas de 96 hoyos en DMEM-F12 con 5% SFBCh. Luego de 48h el medio fue reemplazado con los medios experimentales (usando 5% SFBCh, octuplicados). A las 24h se reemplazó 50% del volumen por soluciones frescas y se agregó 0.2  $\mu\text{Ci}$  de  $^3\text{H}$ -timidina (AE 80Ci/mmol) en cada hoyo. Se cosecharon las células 24 h después.

fibroblástica sumamente activa y una rica vascularización, sino por un infiltrado linfocitario e histiocitario. Todos nuestros resultados sugieren que en los tumores ductales, y probablemente en el crecimiento PD el estroma cumple un rol fundamental.

### El camino hacia la hormono-independencia

Como mencionamos anteriormente, utilizando diversos métodos, logramos seleccionar varian-

tes con capacidad de crecer sin el requerimiento de MPA, que difieren de sus parentales PD en que son capaces de crecer en animales ovariectomizados y adrenalectomizados. Analizamos su histología, Kd del RE, Kd del RP y número de receptores en 5 líneas tumorales PD con respecto a sus variantes PI, sin encontrar diferencias significativas.

Las siguientes constituyen hipótesis plausibles de los posibles mecanismos implicados en el pasaje de la hormono-dependencia a la independencia o autonomía:

1. selección de células autónomas<sup>51</sup>
2. activación constitutiva de genes "downstream" del RP<sup>22</sup>
3. aumento de sensibilidad a concentraciones muy bajas de progestágeno.
4. síntesis endógena de progestágenos.
5. aparición de mutaciones del RP<sup>52, 53</sup> o en las proteínas accesorias como *heat shock protein* que simulen la acción permanente de ligando<sup>54</sup>.
6. que exista una conversación cruzada entre vías capaces de activar al RP<sup>55, 56</sup>.

La reproducibilidad del fenómeno de la conversión de un patrón progestágeno-dependiente a uno independiente en nuestro modelo, hace poco plausible la teoría de las mutaciones. Cuando se inoculan tumores PD a ratones ovx, la mayoría empieza a crecer después de 7-8 meses. Todos los tumores así originados tienen patrones similares de crecimiento y expresión de receptores entre sí. Este tipo de desarrollo, caracterizado por una larga latencia pareciera más compatible con la explotación de caminos alternativos de crecimiento.

Con la idea de explorar la posibilidad de que los RP estén involucrados en el crecimiento autónomo, se trataron animales con antiprogestágenos teniendo en cuenta que se mantiene la expresión de estos receptores aún cuando aparentemente los tumores no requieren de la hormona para crecer. Los resultados demostraron que los antiprogestágenos inducen regresión tumoral en ratones portadores de tumores PI, a igual que el 17- $\beta$ -estradiol mientras que la flutamida (an-tiandrógeno) no modificó el crecimiento tumoral. Esto sugiere la posibilidad de que los RP estén involucrados en el crecimiento tumoral y descartaría la activación constitutiva del RP. Se ha sugerido que algunos antiprogestágenos podrían tener actividad anti-tumoral *per se*. La inhibición específica de la actividad de los RP puede lograrse a través de la supresión de su síntesis mediante el uso de secuencias "antisense". Tenemos experimentos en marcha utilizando esta tecnología, para confirmar el rol de los RP en el crecimiento PI.

Se estudiaron las características de los RP expresados en tumores dependientes e independientes, con la idea de que los tumores independientes pudieran expresar receptores con mayor afinidad, más sensibles a concentraciones fisiológicas de progesterona pero no se encontraron diferencias ni en el Kd ni en el número de receptores.

La posibilidad que se activen vías metabólicas que aumenten la síntesis endógena de progestágenos parecería atractiva, sin embargo, hemos dosado niveles de progesterona en tumores PD y PI sin encontrar diferencia alguna. Nos queda por último la posibilidad de que aparezcan mutaciones en el receptor de progesterona que permitan su activación, aún en ausencia de ligando. Esta posibilidad tampoco nos parece muy plausible por a) la misma razón que expusimos en el primer caso y b) los parámetros hasta el momento estudiados son muy similares en ambos tipos de receptores. La posibilidad de que otros factores sean necesarios además de la progesterona para activar el crecimiento parece bastante probable y postulamos que éstos actuarían a través del RP. Apoyando esta hipótesis hemos demostrado que el crecimiento *in vitro* PD puede ser reemplazado por agregado de suero y que esta estimulación es inhibida en forma específica por antiprogestágenos.

En la transición a la hormono-independencia las células con una ventaja adaptativa para fosforilarse o responder a otros estímulos crecerían mejor en ausencia de hormona trófica.

### Resistencia al tratamiento hormonal

Estos tumores ductales PD o PI son inhibibles por estrógenos y a partir de ellos pueden generarse líneas resistentes a la inhibición estrogénica, a los que llamamos estrógenos resistentes, capaces de crecer tanto en ausencia como en presencia de estrógenos. En algunos experimentos demostramos que después de varios pasajes en animales sin estrógenos, estas líneas tumorales resistentes son capaces de recuperar la sensibilidad a estrógenos (Fig. 12). Las principales causas de resistencia a tratamientos hormonales han sido recientemente resumidas por Levin et al.<sup>57</sup>. Los resultados obtenidos en nuestro laboratorio sugieren la existencia de mecanismos regulatorios epigenéticos, cuya comprensión llevaría a un aprovechamiento más ventajoso de la terapia hormonal en el cáncer.

En conclusión, hemos desarrollado un modelo experimental de carcinogénesis mamaria en el ratón cuyas características más sobresalientes son: cubren el espectro morfológico característico de las lesiones humanas, son tumores metastásicos y desde el punto de vista biológico se cu-

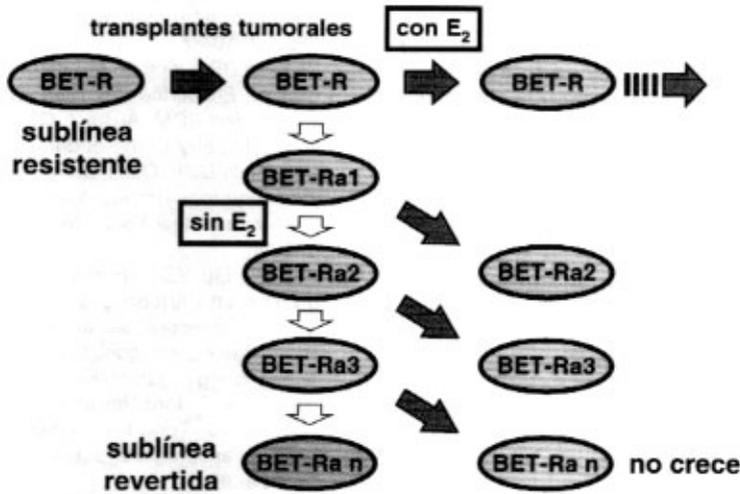


Fig. 12.— Reversibilidad de la resistencia hormonal. La sublínea BET-R se mantiene por pasajes seriados en ratones implantados con un pellet de E<sub>2</sub>. Para verificar la reversibilidad de la estrógeno-resistencia se transplanta uno de estos tumores a dos ratones sin tratar y a dos tratados con E<sub>2</sub>. Para el pasaje siguiente se elige uno de los tumores crecidos en un animal no tratado y así sucesivamente, hasta verificar que los tumores dejen de crecer en los ratones tratados con E<sub>2</sub>.

bren todas las etapas: lesiones preneoplásicas, hormono-dependientes, hormono-independientes y por último, resistentes al tratamiento antihormonal.

**Agradecimientos:** Este trabajo pudo ser realizado mediante subsidios de la Fundación Sales, de la Fundación Roemmers, de la Fundación Antorchas, del CONICET, del laboratorio Dr. Gador, Buenos Aires. Agradecemos a la Dra. Christiane Dosne Pasqualini su participación mientras nuestro grupo trabajaba como parte de la División Medicina Experimental del Instituto de Investigaciones Hematológicas de la Academia Nacional de Medicina y su colaboración con el suministro de ratones BALB/c. A Shering por el suministro de onapristona, y a Roussel Uclaff por el suministro de mifepristone.

## Summary

*Progestin-induced mammary adenocarcinomas in BALB/c mice. Progression from hormone-dependent to autonomous tumors*

We have developed an experimental model in which the administration of progestins induces mammary tumors in female virgin BALB/c mice. In this paper we review the morphological and biological features of progestin-induced tumors,

such as estrogen receptor (ER) and progesterone receptor (PR) patterns of expression, hormone dependence and epidermal growth factor receptors (EGF-R). We also examine our data concerning the systemic effects of medroxyprogesterone acetate (MPA) as regards its stimulating EGF synthesis in salivary glands and its subsequent increase in serum. This growth factor seems to play an important role in the induction of mammary tumors. Direct MPA proliferative effects mediated by PR were demonstrated using primary cultures of progestin-dependent (PD) mammary tumors. Antiprogestins inhibited cell growth beyond control values, suggesting that PR are involved in cell proliferation even in the absence of the ligand. Progesterone-independent (PI) tumors expressing high levels of PR and ER are also inhibited by estrogen or antiprogestin treatment, suggesting that PR are involved in the control of autonomous tumor growth. Estrogen-resistant variants may be selected which may revert to an estrogen-sensitive phenotype after several transplants in untreated mice. The similarities between the tumors obtained with this model and human breast cancer as regards morphological features, evolution and the regulation of growth control converts this model into a useful tool to explore the mechanisms related with acquisition of hormone independence and autonomous tumor growth.

## Bibliografía

1. Lanari C, Molinolo AA, Pasqualini CD. Induction of mammary adenocarcinomas by medroxyprogesterone acetate in BALB/c mice. *Cancer Lett* 1986; 33: 215-23.
2. Molinolo AA, Lanari C, Charreau EH, Sanjuan N, Pasqualini CD. Mouse mammary tumors induced by medroxyprogesterone acetate: Immunohistochemistry and hormonal receptors. *J Natl Cancer Inst* 1987; 79: 1341-50.
3. Lanari C, Kordon E, Molinolo A, Pasqualini CD, Charreau EH. Mammary adenocarcinomas induced by medroxyprogesterone acetate: Hormone dependence and EGF receptors of BALB/c in vivo sublines. *Int J Cancer* 1989; 43: 845-50.
4. Kordon E, Lanari C, Molinolo AA, Elizalde P, Charreau EH, Pasqualini CD. Estrogen inhibition of MPA-induced mouse mammary tumor transplants. *Int J Cancer* 1991; 49: 900-5.
5. Kordon E, Molinolo AA, Pasqualini CD, Charreau EH, Pazos P, Dran G, Lanari C. Progesterone induction of mammary carcinomas in BALB/c female mice. Correlation between hormone dependence and morphology. *Breast Cancer Res Treat* 1993; 28: 29-39.
6. Pazos P, Lanari C, Meiss R, Charreau EH, Pasqualini CD. Mammary carcinogenesis induced by N-methyl-N-nitrosourea and medroxyprogesterone acetate in BALB/c mice. *Breast Cancer Res Treat* 1992; 20: 133-8.
7. Kordon E, Guerra F, Molinolo AA, Elizalde P, Charreau EH, Pasqualini CD, et al. Effect of sialoadenectomy on medroxyprogesterone acetate (MPA)-induced mammary carcinogenesis in BALB/c mice. *Int J Cancer* 1994; 59: 196-203.
8. Haslam SZ. Role of sex steroids hormones in normal mammary gland function. In: Neville MC, Daniel CW, (eds). *The mammary gland. Development, regulation and function*. New York: Plenum Press 1987; 499-533.
9. Bullock LP, Barthe TH, Mawzowicz I, North A, Bardin CW. The effect of progestin on submaxillary gland epidermal growth factor. Demonstration of androgenic, synandrogenic and anti-androgenic actions. *Endocrinology* 1975; 97: 776-95.
10. Nepomnaschy I, Buggiano V, Goldman A, Deroche A, Bekinschtein P, Berguer M, Piazzón I. Superantigenos y retrovirus MMTV: aumento de la tumorigenicidad por recombinación entre MMTV exógenos y endógenos. *Medicina (Buenos Aires)* 1996; 56: 578.
11. Concannon P, Altszuler N, Hampshire J, Butler WR, Hansel W. Growth hormone, prolactin and cortisol in dogs developing mammary nodules and acromegaly-like appearance during treatment with medroxyprogesterone acetate. *Endocrinology* 1980; 106: 1173-7.
12. Russo IH, Gimotty P, Dupuis M, Russo J. Effect of medroxyprogesterone acetate on the response of the rat mammary gland to carcinogenesis. *Br J Cancer* 1989; 59: 210-6.
13. Beatson GT. On the treatment of inoperable cases of carcinoma of the mamma: suggestion for a new method of treatment, with illustrative cases. *Lancet* 1896; 2: 104-7.
14. Dickson RB, Lippman ME. Growth Factors in Breast Cancer. *Endocrine Rev* 1995; 16: 559-89.
15. van Lindert ACM, Alsbach GPJ, Rutgers DH. DNA flow cytometry of the endometrium. In: Campio L, Robustelli Della Cuna G, Taylor RW (eds). *Role of medroxyprogesterone acetate in endocrine-related tumors*. New York: Raven Press, 1983. Vol. 2. p. 7-14.
16. Shi YE, Liu YE, Lippman ME, Dickson RB. Progestins and antiprogestins in mammary tumour growth and metastasis. In: Beier HM, Spitz IM (eds.). *Progesterone antagonists in Reproductive Medicine and Oncology*. Human Reproduction. Vol 9, Suppl 1, New York: Oxford University Press, 1994; 162-73.
17. Horwitz KB, Tung L, Takimoto GS. Novel mechanisms of antiprogestin action. *Acta Oncologica* 1996; 35: 129-38.
18. Hissom JR, Bowden RT, Moore MR. Effect of progestins, estrogens and anti hormones on growth and lactate dehydrogenase in the human breast cancer cell line T47D. *Endocrinology* 1989; 125: 418-23.
19. Anderson TJ, Battersby S, Macintyre CCA. Proliferative and secretory activity in human breast cancer during natural and artificial menstrual cycles. *Am J Pathol* 1988; 130: 193-204.
20. Longacre TA, Bartow SA. A correlative morphologic study of human breast and endometrium in the menstrual cycle. *Am J Surg Pathol* 1986; 10: 382-93.
21. Russo J, Calaf G, Sohi N, Tahin Q, Zhang PL, Alvarado ME, et al. Critical steps in breast carcinogenesis. In: Squartini F, Bevilacqua G, Conte PF, Surbone A (eds). *Breast Cancer, from Biology to Therapy*. *Ann NY Acad Sci* 1993; 1-20.
22. Lippman ME, Dickson RB. Mechanisms of growth control in normal and malignant breast epithelium. *Rec Progr Hormone Res* 1989; 45: 383-440.
23. Michna H, Schneider M, Nishino Y, Etreby MFE. Antitumor activity of the progesterone antagonists ZK 98.299 and RU 38.486 in the hormone-dependent MXT mammary tumor model of the mouse and the DMBA- and the MNU-induced mammary tumor models of the rat. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1989; 25: 691-701.
24. Gill PG, Vignon F, Bardon S, Derocq D, Rochefort H. Difference between R5020 and the antiprogestin RU486 in antiproliferative effects on human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 1987; 10: 37-45.
25. Pannuti F, Gentili MRA, Di Marco AR, Martoni A, Giambiasi ME, Battistoni R, et al. The results of treatment with medroxyprogesterone acetate at high and very high doses in 237 metastatic breast cancer patients in postmenopause. In: Campio L, Robustelli Della Cuna G, Taylor RW (eds). *Role of medroxyprogesterone acetate in endocrine-related tumors*. Vol. 2, New York: Raven Press, 1983; 95-104.
26. Baulieu EE. A rationale for combined antiestrogen plus progestin administration in breast cancer. In: Campio L, Robustelli Della Cuna G, Taylor RW (eds).

- Role of medroxyprogesterone acetate in endocrine-related tumors. Vol. 2, New York: Raven Press, 1983; 15-8.
27. Vorherr H, Messer RH. Breast Cancer: potentially predisposing and protecting factors. *Am J Obst Gynecol* 1978; 130: 335.
  28. Koyama H, Sinha D, Dao TL. Effects of hormones and 7,12-dimethyl-benz-[a]anthracene on rat mammary tissue grown in organ culture. *J Natl Cancer Inst* 1972; 48: 1671-80.
  29. Edery M, McGrath M, Larson L, Nandi S. Correlation between in vitro growth and regulation of estrogen and progesterone receptors in rat mammary epithelial cells. *Endocrinology* 1984; 115: 1691-7.
  30. Simon WE, Albretch M, Trams G, Dietel M, Holzel F. In vitro growth promotion of human mammary carcinoma cells by steroid hormones, tamoxifen, and prolactin. *J Natl Cancer Inst* 1984; 73: 313-21.
  31. Whitehead RH, Quirk SJ, Vitali AA, Funder JW, Sutherland RL, Murphy LC. A new human breast carcinoma cell line (PMC42) with stem cell characteristics. III. Hormone receptor status and responsiveness. *J Natl Cancer Inst* 1984; 73: 643-8.
  32. Imagawa W, Tomooka Y, Hamamoto S, Nandi S. Stimulation of mammary epithelial cell growth in vitro: Interaction of epidermal growth factor and mammo-genic hormones. *Endocrinology* 1985; 116: 1514-24.
  33. Richards JE, Edery M, Osborn RC, Larson LN, Nandi S. Effect of hormones and epidermal growth factor on the growth of the hormone-responsive 13762NF rat mammary tumor in collagen gel culture. *J Natl Cancer Inst* 1986; 76: 669-82.
  34. Manni A, Badger B, Wright C, Ahmed SR, Demers LM. Effect of progestins on growth of experimental breast cancer in culture: interaction with estradiol and prolactin and involvement of the polyamine pathway. *Cancer Res* 1987; 47: 3066-71.
  35. Papa V, Reese CC, Brunetti A, Vigneri R, Sileri PK, Goldfine ID. Progestins increase insulin receptor content and insulin stimulation of growth in human breast carcinoma cells. *Cancer Res* 1990; 50: 7858-62.
  36. Modiano JF, Kokai Y, Weiner DB, Pykett MJ, Nowell PC, Lyttle R. Progesterone augments proliferation induced by epidermal growth factor in feline mammary adenocarcinoma cell line. *J Cell Biochem* 1991; 45: 196-206.
  37. Loeb C, Moskop Kirtz MM. The effects of transplants of anterior lobes of the hypophysis on the growth of mammary gland and on the development of mammary gland carcinoma in various strains of mice. *Am J Cancer* 1939; 36: 56-82.
  38. Cantarow W, Stansey J, Paschkis KE. The influence of sex hormones on mammary tumors induced by 2-acetaminofluorene. *Cancer Res* 1948; 8:412-8.
  39. Huggins C, Yang NC. Induction and extinction of mammary cancer. *Science* 1962; 137: 257-62.
  40. Van Rie R, Thung PJ. Responsiveness of mouse mammary tumors to pregnancy. *Eur J Cancer* 1965; 1: 41-50.
  41. Jabara AC. Effects of progesterone on 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene-induced mammary tumors in Sprague-Dawley rats. *Br J Cancer* 1967; 21: 418-29.
  42. Bresciani F. Topography of DNA synthesis in the mammary gland of the C3H mouse and its control by ovarian hormones: an autoradiographic study. *Cell Tissue Kinet* 1968; 1: 51-63.
  43. Sluysen M, Van Nie R. Estrogen receptor content and hormone responsive growth of mammary tumors. *Cancer Res* 1974; 34: 3253-7.
  44. Yanai R, Nagasawa H. Importance of progesterone in DNA synthesis of pregnancy-dependent mammary tumors in mice. *Int J Cancer* 1976; 18: 317-21.
  45. Diamond JE, Hollander VP. Progesterone and breast cancer. *Mt Sinai J Med* 1979; 46: 225-35.
  46. Nagasawa H, Yanai R, Nakajima Y, Mori J. Effects of progesterone on normal and preneoplastic mammary development in mice in relation to prolactin and estrogen. *Eur J Cancer* 1980; 16: 1069-77.
  47. Dao TL, Sinha DK, Nemoto T, Patel J. Effect of estrogen and progesterone on cellular replication of human breast tumors. *Cancer Res* 1982; 42: 359-62.
  48. Kiss R, Paridaens RJ, Heuson JC, Danguy AJ. Effect of progesterone on cell proliferation in the MXT mouse hormone-sensitive mammary neoplasm. *J Natl Cancer Inst* 1986; 77: 173-8.
  49. Robinson SP, Jordan VC. Reversal of the antitumor effects of tamoxifen in the 7,12 dimethylbenzanthracene-induced mammary carcinoma model. *Cancer Res* 1987; 47: 5386-90.
  50. Dran G, Luthy I, Molinolo A, Charreau EH, Montecchia MF, Pasqualini CD, Lanari C. Effect of medroxyprogesterone acetate (MPA) and serum factors on cell proliferation in primary cultures of an MPA-induced mammary adenocarcinoma. *Breast Cancer Res Treat* 1995; 35: 173-86.
  51. Brunner N, Clarke R, Lippman ME, Dickson RB. Models for studying the progression from hormone-dependency to independency in human breast cancer. In: Lippman ME, Dickson RB (eds). Growth regulation of cancer. New York: Alan Liss, 1990; 15-125.
  52. Morrow M, Jordan C. Molecular mechanisms of resistance to tamoxifen therapy in breast cancer. *Arch Surg* 1993; 128: 1187-9.
  53. Fuqua SAW. Estrogen receptor mutagenesis and hormone resistance. *Cancer* 1994; 74: 1026-9.
  54. Smith D, Toft D: Steroid receptors and their associated proteins. *Mol Endocrinol* 1993; 7: 4-11.
  55. Edwards DP, Weigel N, Nordeen SK, Beck CA. Modulators of cellular phosphorylation alter the trans-activation function. *Breast Cancer Res Treat* 1993; 27: 41-56.
  56. Aronica SM, Kraus WL, Katzenellenbogen BS. Estrogen activation via cAMP signalling pathway: Stimulation of adenylate cyclase and cAMP-regulated gene transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 8517-21.
  57. Levin E, Caruso SP, Actis AM, Levin RW. Nuevos conceptos sobre hormono dependencia en cáncer de mama. *Medicina (Buenos Aires)* 1997; 57: 95-103.