

Tesis de Posgrado

Adenocarcinomas de mama murinos inducidos por acetato de medroxiprogesterona (MPA) : modulación hormonal de su crecimiento in vitro

Dran, Graciela Isabel

1994

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Dran, Graciela Isabel. (1994). Adenocarcinomas de mama murinos inducidos por acetato de medroxiprogesterona (MPA) : modulación hormonal de su crecimiento in vitro. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2663_Dran.pdf

Cita tipo Chicago:

Dran, Graciela Isabel. "Adenocarcinomas de mama murinos inducidos por acetato de medroxiprogesterona (MPA) : modulación hormonal de su crecimiento in vitro". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1994.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2663_Dran.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ADENOCARCINOMAS DE MAMA MURINOS INDUCIDOS POR ACETATO DE
MEDROXIPROGESTERONA (MPA):
MODULACION HORMONAL DE SU CRECIMIENTO *IN VITRO*

Autor: Lic. GRACIELA DRAN

Director: Dra. CLAUDIA LANARI

Lugar de trabajo:
DIVISION MEDICINA EXPERIMENTAL
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES HEMATOLOGICAS
ACADEMIA NACIONAL DE MEDICINA

Tesis presentada para optar al título de:
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

BUENOS AIRES, 1994

Tesis
2663
2 e/s

Agradezco muy especialmente

al Dr. Jorge Geffner, a las Dras. Isabel Piazzón e Irene Nepomnaschy,

a las Dras. Christiane D. Pasqualini y Claudia Lanari,

a los Sres. Juan Portaluppi y Antonio Morales,

a mis amigos, Adriana Deroche, Alejandra Goldman, Marcela Franco, Sandra Torello y Pedro di Gianni,

a toda la Sección Medicina Experimental, en especial, a Fernanda Montecchia, Alfredo Molinolo y Raúl Ruggero,

a los amigos del "primer piso", Mirta Giordano, Mónica Vermeulen, Martín Isturiz, Fernando Minnucci y Marina Palermo,

al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET),

a mis padres y hermanos.

a Isa, Irene y Protectón, con amor.

I N D I C E

FILED IN BIBLIOTECA

<u>INTRODUCCION</u>	1
CARCINOGENESIS HORMONAL	1
Inducción hormonal de neoplasias.....	1
Hormonas y cáncer humano.....	2
Usos de hormonas en el tratamiento del cáncer.....	4
ADENOCARCINOMA DE MAMA EN RATON	7
Agentes inductores.....	7
1- Virus.....	7
2- Carcinógenos químicos.....	9
3- Hormonas.....	9
4- Hormonas y MMTV.....	10
5- Hormonas y carcinógenos químicos.....	11
MODULACION DEL CRECIMIENTO TUMORAL POR HORMONAS	12
REGULACION HORMONAL DEL CRECIMIENTO DE TUMORES DE MAMA	12
Mecanismos operativos en la regulación hormonal del crecimiento tumoral.....	13
Mecanismo "positivo" de regulación hormonal.....	13
Mecanismo "negativo" de regulación hormonal.....	17

PROGESTERONA.....	19
Efectos fisiológicos.....	19
Efectos antihormonales.....	20
1- Efectos antiestrogénicos.....	20
2- Efectos antiandrogénicos.....	22
3- Efectos antialdosterona.....	22
4- Efectos antiglucocorticoideos.....	22
ACETATO DE MEDROXIPROGESTERONA (MPA).....	23
Características.....	23
Usos clínicos.....	24
Actividades carcinogénicas y teratogénicas del MPA, descritas en modelos experimentales.....	25
REGULACION DEL CRECIMIENTO DEL TEJIDO MAMARIO Y DE TUMORES DE MAMA POR PROGESTERONA Y PROGESTAGENOS.....	26
Efectos de progestágenos sobre la glándula mamaria <i>in vivo</i>	27
1- Glándula mamaria normal de ratón.....	28
2- Tumores mamarios experimentales de ratón.....	28
3- Glándula mamaria normal humana.....	29
4- Adenocarcinomas mamarios humanos.....	30
Efectos de progestágenos sobre la glándula mamaria <i>in vitro</i>	31
1- Inhibición del crecimiento.....	32
2- Estimulación del crecimiento.....	34

<u>MODELO EXPERIMENTAL</u>	36
<u>MATERIALES Y METODOS</u>	41
1- Experimentos <i>in vivo</i>	41
2- Experimentos <i>in vitro</i>	46
<u>RESULTADOS</u>	56
I. <u>Estudios <i>in vivo</i></u>	56
1. Cinética de crecimiento de las líneas tumorales inducidas por MPA.....	56
2. Descripción morfológica de los tumores.....	57
3. Caracterización de receptores esteroideos en tumores de la línea C4-HD.....	57
II. <u>Estudios <i>in vitro</i></u>	59
1. Establecimiento del cultivo primario.....	59
2. Morfología de los cultivos primarios.....	61
3. Proliferación inducida por MPA sobre cultivos de las líneas C4-HD y C4-HDR.....	61
4. Efectos de diferentes concentraciones de MPA sobre la proliferación de cultivos provenientes de las líneas C4-HD y C4-HDR.....	63
5. Efecto del E ₂ sobre la proliferación inducida por MPA.....	64
6. Determinación de la población celular "blanco" de la acción de MPA.....	65
6-a. Cultivos en medio semisólido.....	65
6-b. Cultivos enriquecidos en células epiteliales o fibroblásticas.....	66

6-c. Técnicas autorradiográficas combinadas con inmunohistoquímica.....	67
7. Estudios de receptores para estrógenos y progesterona en las células cultivadas.....	68
7-a. Técnicas inmunohistoquímicas.....	68
7-b. Técnicas bioquímicas.....	68
8. Evaluación de los efectos progestagénico, androgénico y glucocorticoideo del MPA.....	69
9. Efectos de anti-hormonas sobre la proliferación inducida por MPA.....	71
10. Efectos de hormonas y antagonistas sobre cultivos primarios de las líneas tumoraes 55-HI y M3.....	72
11. Efectos de sueros de ratones ovariec- tomizados sobre la proliferación de cultivos derivados de C4-HD.....	73
 III. <u>Inóculo de células provenientes de cultivos primarios en ratones.....</u>	 76
 <u>DISCUSION.....</u>	 78
 <u>CONCLUSIONES.....</u>	 99
 <u>REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....</u>	 101

I N T R O D U C C I O N

CARCINOGENESIS HORMONAL

Es un hecho ampliamente comprobado el papel crítico que juegan múltiples hormonas en los procesos de diferenciación celular durante el desarrollo ontogénico. En algunos casos, tal como ocurre en la regulación de la masculinización de ciertos tejidos de mamíferos por andrógenos, el bloqueo de la acción hormonal durante ciertos períodos críticos conduce a la completa inhibición de la morfogénesis. Otros tejidos requieren de hormonas no sólo para el comienzo de la diferenciación, sino también para el mantenimiento de una morfología diferenciada. Así, la ausencia de estrógenos induce la atrofia de la mucosa vaginal, el endometrio y el epitelio mamario en las hembras de mamíferos; en los machos, la falta de andrógenos conduce a la atrofia de próstata. Estos efectos suelen ser reversibles; el potencial para la diferenciación normal permanece y la administración de la hormona faltante hace que los tejidos retornen a su estado diferenciado (Sutherland, 1987).

La diferenciación celular puede ser definida como el proceso de adquisición de caracteres individuales, tal como ocurre en la diversificación progresiva de los tejidos embrionarios. El desarrollo de los diversos tipos de neoplasias se encuentra generalmente asociado a un desorden en la diferenciación, en el cual células relativamente inmaduras continúan proliferando y no responden a los mecanismos homeostáticos que normalmente controlan la organización tisular y la morfología. Considerando el papel crítico que juegan ciertas hormonas en los procesos de diferenciación celular, no resulta sorprendente que las mismas puedan influir en el desarrollo del cáncer.

Inducción hormonal de neoplasias

La transformación neoplásica se encuentra generalmente asociada a un desarreglo de diversos mecanismos homeostáticos operativos en el organismo, entre los cuales los hormonales juegan

un papel crítico. Un exceso en la oferta hormonal, ya sea por administración exógena o por producción endógena anormal se asocia frecuentemente al desarrollo de diferentes tumores. Ya en el año 1949 se describió que alteraciones en los mecanismos de retroalimentación entre la hipófisis y las glándulas endócrinas inducen el desarrollo de neoplasias (Pasqualini, 1949). Uno de los ejemplos clásicos es el referente al trasplante de ovarios normales en el bazo de roedores castrados (Biskin y Biskin, 1944; Gardner, 1948). Los estrógenos producidos por el implante son llevados por el sistema venoso esplénico al hígado donde son metabolizados, hecho que produce una ruptura en el circuito de retroalimentación negativa. Los estrógenos, al no entrar a la circulación general, no inhiben la secreción de gonadotrofinas hipofisarias. La producción excesiva de gonadotrofinas produce, por otra parte, un estímulo constante del implante ovárico a consecuencia del cual se induce la transformación neoplásica del ovario. También es posible inducir tumores de la hipófisis anterior por tiroidectomía (Pitot, 1978); en este caso, el fenómeno parece obedecer también a la falta de mecanismos de retroalimentación negativa. La ausencia de hormonas tiroideas circulantes estimularía la transformación neoplásica de la hipófisis. Se ha comprobado por otra parte que la administración exógena de hormonas es capaz también de inducir la transformación neoplásica, como ha sido descrito en relación al desarrollo de tumores hipofisarios y testiculares inducidos por estrógenos (Gardner, 1948).

Hormonas y cáncer humano

Diversos estudios epidemiológicos sugieren que ciertas hormonas estarían involucradas en el desarrollo de tumores humanos. Así, factores tales como la diabetes mellitus, la obesidad o la nuliparidad han sido asociados al desarrollo de carcinomas de endometrio (Kurman y col., 1987). Esta asociación probablemente refleje una serie de eventos endocrinológicos, cada uno de los

cuales puede predisponer a altos niveles de estrógenos libres. Para el caso de la nuliparidad, se conoce que ésta se asocia frecuentemente con fallas en la ovulación; ésto llevaría a períodos de prolongada estimulación estrogénica sin la actividad intermitente, supuestamente protectora, de la progesterona liberada posteriormente a la ovulación. En las mujeres obesas también se ha observado un aumento relativo en la estimulación estrogénica, fenómeno atribuido a la gran cantidad de tejido adiposo responsable de la metabolización de los andrógenos adrenales a estrógenos; además, la correlación existente entre adiposidad y niveles disminuídos de SHBG (globulina transportadora de hormonas sexuales) incrementa los niveles séricos de estrógenos libres, potenciando sus efectos biológicos (Siiteri y col., 1980). Por otra parte, tanto las pacientes con tumores ováricos secretores de estrógenos (Pasqualini, 1949; Dockerty y col., 1951) como aquellas mujeres que estuvieron bajo tratamientos estrogénicos (Antunes y col., 1979) muestran una mayor incidencia de carcinomas de endometrio.

En los hombres, el desarrollo del cáncer de próstata parece depender de la presencia de andrógenos, principalmente de la testosterona. Esta suposición se ve confirmada por la ausencia de este tipo de cáncer en eunucos (Moore, 1944) y en pacientes con cirrosis. En estos últimos, los niveles de estrógenos séricos son superiores a lo normal debido a fallas en la metabolización hepática; ésto inhibe la secreción de LH y consecuentemente, de testosterona (Sutherland, 1987). Todas las formas de crecimiento prostático (normal y neoplásico) son, por lo menos inicialmente, dependientes de andrógenos (Cunha y col., 1980). El crecimiento tumoral se ve incrementado por administración de andrógenos, tal como se ha observado en terapias con análogos del LHRH (factor liberador de LH) o por incremento en la producción endógena de hormonas, en ratas portadoras de adenocarcinomas de próstata andrógeno-dependientes (English y col., 1986; Sutherland, 1987).

En relación al cáncer de mama, se han propuesto varios factores que aumentarían el riesgo de su desarrollo, y que involucrarían preponderantemente a los estrógenos: 1) menarca temprana y menopausia tardía; 2) edad avanzada para el primer embarazo; 3) dar a luz sin amamantamiento posterior o períodos de amamantamiento muy cortos; 4) nuliparidad; 5) fallas en la ovulación; 6) bajos niveles de andrógenos excretados; 7) hiperprolactinemia; 8) obesidad, diabetes mellitus, dietas ricas en grasas y proteínas; 9) tratamientos prolongados con altas dosis de estrógenos (Vorherr y Messer, 1978); 10) el uso de anticonceptivos orales (Pike y col., 1983).

En otros estudios se ha asociado la administración de píldoras anticonceptivas que contienen estrógenos y progestágenos, a la aparición de adenomas hepáticos y más raramente de hepatocarcinomas (Pitot, 1978). Otra desafortunada relación entre hormonas y cáncer resultó de la administración de estrógenos sintéticos no esteroideos como el dietilestilbestrol (DES) a mujeres embarazadas, suministrado con el objeto de prevenir abortos espontáneos; en las hijas de estas mujeres se observó, durante la adolescencia, una alta incidencia de una forma inusual de cáncer de vagina, el adenocarcinoma de células claras (Herbst y col., 1971).

Usos de hormonas en el tratamiento del cáncer

Ciertas manipulaciones hormonales han demostrado ser útiles en el tratamiento de tumores de mama, próstata y endometrio, existiendo también respuestas ocasionales en otros tipos tumorales (Cambio y col., 1983). En el cáncer de mama, la probabilidad de regresión tumoral inducida por tratamiento hormonal se correlaciona con la presencia de receptores para estrógenos y progesterona (Baulieu, 1983). Niveles elevados de dichos receptores se han observado además en carcinomas gástricos y melanomas; sin embargo, estos tumores derivados de tejidos normalmente no respondedores a

hormonas, no regresionan en respuesta a la terapia hormonal (Harrison y col., 1988; Walker y col., 1991).

La regresión tumoral debido a manipulaciones hormonales operaría a través de dos mecanismos fundamentales:

- 1- la disminución en las concentraciones de hormonas capaces de estimular directamente el crecimiento del tumor;
- 2- el bloqueo de la producción o liberación de otros factores tróficos, responsables directos del crecimiento tumoral. Estos factores pueden ser producidos por (a) las mismas células tumorales (autócrinos), (b) las células vecinas (parácrinos) o (c) glándulas endócrinas distantes (endócrinos).

Es importante destacar, no obstante, que son pocos los casos en que los tumores hormono-respondedores remiten en forma completa luego de la terapia hormonal. Alrededor de un 75-80% de los pacientes con cáncer de próstata, 30-40% con cáncer de mama (Pellegrini y col., 1983) y 30% con cáncer de endometrio (Schultz y col., 1988) manifiestan una regresión observable. En el cáncer de mama, a pesar de que un cierto número de pacientes inicialmente responden a la terapia hormonal, no se ha logrado modificar la tasa de mortalidad. Inevitablemente, los tumores retoman su crecimiento y, aunque a veces haya respuestas secuenciales a las series de manipulaciones hormonales, los pacientes desarrollan finalmente tumores no respondedores a la terapia hormonal (Foulds, 1969). Las posibles explicaciones de este fenómeno son:

1. la insensibilidad de la célula troncal (*stem cell*) y de su progenie a las manipulaciones hormonales (Ballaré, 1989);
2. la preexistencia de poblaciones no respondedoras en el tumor hormonodependiente (Kim, 1975);
3. el surgimiento, durante la regresión tumoral, de

poblaciones celulares resistentes, seleccionadas positivamente (Noble, 1977);

4. la falta de una adecuada supresión de ciertas hormonas o factores que puedan estimular el crecimiento tumoral (Bélanger, 1985).

ADENOCARCINOMA DE MAMA EN RATON

Los adenocarcinomas mamarios de ratones endocriados son de uso corriente en la oncología experimental dado que ofrecen varias ventajas: primero, el tumor se localiza en un área circunscripta bajo la piel y puede ser fácilmente reconocido, medido cuantitativamente y removido completamente para cualquier tipo de estudio; segundo, la existencia de cepas endocriadas de ratones con incidencia reproducible de neoplasias mamarias provee una herramienta ideal para la investigación de factores etiológicos; tercero, existe un amplio conocimiento acerca de la biología del ratón endocriado por lo cual puede ser fácilmente sujeto a manipulaciones experimentales. Por estas razones los tumores mamarios de ratón proveen uno de los mejores modelos para analizar el proceso neoplásico in vivo (Nandi y col., 1973).

Agentes inductores

1- Virus

Desde las primeras observaciones sobre tumores mamarios espontáneos se comprobó que ciertas colonias de ratones mostraban una alta incidencia tumoral a edad temprana, mientras que otras estaban prácticamente libres de la enfermedad (Bashford, 1909). Algunos años más tarde, cuando se dispuso de cepas endocriadas, la transmisión hereditaria de los tumores mamarios pudo ser estudiada en detalle. El cruzamiento recíproco entre ratones de alta y baja incidencia tumoral llevó al descubrimiento de la existencia de factores extracromosómicos que operaban como agentes causales. En 1936, Bittner comprobó que la transmisión de este factor extracromosómico se realizaba a través de la leche. Además, el agente inductor del tumor mamario fue hallado en distintos órganos, tejidos y fluidos corporales en cepas con alta incidencia de cáncer de mama. Estudios sucesivos demostraron que este agente tenía las propiedades físicas y químicas de un virus (Lyons y Moore, 1962).

Se concluyó entonces, que los tumores de mama de ratón pueden ser inducidos por un virus que se transmite por la leche materna, denominado inicialmente "factor leche" o virus de Bittner y actualmente MMTV (*mouse mammary tumor virus*) perteneciente a la familia de los retrovirus.

Los retrovirus oncogénicos pueden dividirse en dos categorías: 1) los retrovirus transformantes, portadores de oncogenes virales que han adquirido del genoma de una célula huésped; 2) los retrovirus carentes de oncogenes propios, que actúan por mutagénesis insercional activando los oncogenes de la célula huésped; a este grupo pertenece el MMTV.

En la tumorigénesis mamaria inducida por el MMTV, la incidencia y la latencia tumorales son afectadas por distintos factores, entre ellos, la virulencia de las distintas variantes del virus, la susceptibilidad genética y el estado hormonal del huésped (Michalides y col., 1983). El MMTV puede ser transmitido de dos modos: 1) por amamantamiento (MMTV exógeno) ó 2) genéticamente, vía gametas (MMTV endógeno). Una cepa de ratones representativa del primer caso es la C3H, mientras que un ejemplo de la segunda forma de transmisión se encuentra en la GR. Ambas cepas son susceptibles y tienen alta incidencia tumoral. Otras cepas utilizadas para el estudio de la tumorigénesis mamaria son C57BL y B20, las cuales son resistentes, no expresan MMTV en la leche y presentan una incidencia tumoral espontánea baja o nula. La cepa BALB/c es susceptible, su leche está libre del MMTV y presenta una baja incidencia espontánea de cáncer de mama: del 1 al 30% en hembras multíparas (Schlom, 1973). Cuando la cepa BALB/c fue amamantada por C3H se demostró que la replicación e integración del MMTV determinó un alto grado la tumorigénesis mamaria (99% de incidencia respecto de un 1% en las amamantadas por BALB/c). Sin embargo, la integración de un MMTV exógeno no es indispensable para el desarrollo de neoplasias en esta cepa, ya que en los pocos tumores de mama espontáneos que aparecen, no se han hallado nuevas secuen-

cias específicas insertas en el DNA (Breznick, 1982).

En todas las cepas susceptibles infectadas con MMTV surgen espontáneamente lesiones hiperplásicas lobulillares (HAN), consideradas como lesiones preneoplásicas, que también pueden ser inducidas por tratamiento hormonal en ratones supuestamente libres del virus (Medina, 1973). El MMTV actuaría a dos niveles, convirtiendo al tejido normal en HAN y transformando luego a estas lesiones en tumores.

2- Carcinógenos químicos

Los carcinógenos químicos más usados en la tumorigénesis mamaria del ratón son el 3-metilcolantreno (MCA), dibenzantraceno, benzopireno y 7-12 dimetilbenzantraceno (DMBA). Estos agentes actuarían modificando el contenido y/o el flujo de información genética codificada en la secuencia de bases del DNA, transformando la célula normal en cancerosa. Sus mecanismos de acción involucrarían la producción *in vivo* de intermediarios altamente reactivos capaces de interactuar con ácidos nucleicos y proteínas, iniciando de este modo la secuencia de eventos responsable de la inducción neoplásica (Miller y Miller, 1966; Dipple y col., 1968).

3- Hormonas

La relación entre hormonas y tumores de mama fue sugerida originalmente por Lacassagne en 1913 y por Lathrop y Loeb en 1916. El primero de ellos demostró que el tratamiento prolongado con hormonas estrogénicas llevaba a la aparición de carcinomas de mama en ratones machos de la cepa R3. Los segundos, reportaron que los cambios hormonales asociados a la preñez favorecían el desarrollo de neoplasias en ratones. Estudios posteriores confirmaron que la administración de estrógenos aumentaba significativamente la incidencia de tumores de mama en el ratón (Burns, 1940; Gass, 1947).

Los trabajos de Loeb y Kirtz desarrollados en el año 1939 y de Muhlbock y Boot en 1959, demostraron que los injertos de hipófisis inducían el desarrollo de tumores de mama en los ratones portadores. La prolactina secretada por estos injertos aparentaba jugar un papel crítico en la transformación neoplásica (Yanai y Nagasawa, 1972). La presunción respecto de un rol crítico para la prolactina en los procesos de tumorigénesis mamaria había sido sostenida ya con anterioridad (Moon y col., 1951; Boot y col., 1962). La prolactina participaría en los eventos tempranos de la tumorigénesis mamaria en el ratón. Por el contrario, su presencia no sería relevante en el crecimiento de tumores espontáneos avanzados. Estudios realizados en ratones C3H han demostrado que las neoplasias mamarias evolucionan a partir de estadios dependientes a estadios independientes de prolactina (Welsch y Nagasawa, 1977). Es importante destacar, no obstante, que la prolactina no actuaría en ausencia de estrógenos. En efecto, la ovariectomía y la adrenalectomía han demostrado su capacidad de reducir marcadamente la incidencia de tumores mamarios (Bittner y col., 1961; Durbin y col., 1966). Más aún, en el desarrollo de la mama normal, el rol mamotrófico de la prolactina estaría mediado por su actividad luteotrófica, es decir por la acción de la progesterona (El Etreby y col., 1979).

4- Hormonas y MMTV

La capacidad tumorigénica del MMTV es marcadamente influenciada por diversas hormonas. Así, en algunas cepas portadoras, se ha observado que el desarrollo de tumores se encuentra modulado por los cambios hormonales que acompañan a la preñez. Por otra parte, se ha observado que los glucocorticoides (Dickson y Peters, 1983), así como los progestágenos y andrógenos (Van Nie y Thung, 1965; Sluyser y Van Nie, 1974; Darbre y col., 1986), son capaces de modular positivamente la expresión del genoma del MMTV, actuando a nivel transcripcional.

5- Hormonas y carcinógenos químicos

La preñez o pseudopreñez generalmente potencia la capacidad de los carcinógenos químicos de actuar como inductores de adenocarcinomas de mama en modelos murinos (Marchant, 1961; Marchant, 1963). Más aún, trabajando en ratones BALB/c, Lin y col. (1976) demostraron que la estimulación *in vitro* de las glándulas mamarias con prolactina, insulina, aldosterona o cortisol potenciaba notoriamente la capacidad del DMBA de inducir cambios hiperplásicos de naturaleza precancerosa en los cultivos. Parecería, por lo tanto, que las hormonas mamotróficas incrementarían la sensibilidad de la glándula mamaria a la acción de los carcinógenos químicos.

En la rata, las hormonas ováricas son esenciales para la transformación del epitelio mamario durante la inducción de tumores de mama por agentes tales como DMBA o el MCA (Jabara, 1967; Welsch y col., 1968; Jabara y col., 1973; Welsch y col., 1975; Dao, 1982). La ovariectomía de animales con tumores mamarios inducidos por carcinógenos químicos, resulta en una abrupta y prolongada regresión de los tumores (Dao y Sunderland, 1959; Huggins y col., 1959; Welsch, 1971). El crecimiento tumoral no progresa a menos que los ovarios sean reimplantados.

Por último, en el modelo de carcinogénesis mamaria inducida por MPA en ratones hembra BALB/c, desarrollado en nuestro laboratorio, hemos demostrado que la administración conjunta del progestágeno y el carcinógeno químico NMU, potencia el efecto carcinogénico (Pazos y col., 1991).

MODULACION DEL CRECIMIENTO TUMORAL POR HORMONAS

Más allá de su rol crítico en los mecanismos inductores, responsables de la transformación neoplásica, las hormonas pueden también actuar como potentes moduladores del crecimiento de tumores ya establecidos. Para ello, pueden actuar directamente sobre las células tumorales, alterando su tasa de proliferación (efecto directo o local), o bien ejercer su acción primaria sobre un tejido blanco distinto del tumoral (por ejemplo glándulas endócrinas) estimulando allí la producción de factores capaces de actuar sobre el tumor (efecto indirecto o sistémico). Ambos mecanismos han sido propuestos para explicar el efecto regulador que ejercen las hormonas esteroideas sobre el crecimiento de tumores mamarios.

REGULACION HORMONAL DEL CRECIMIENTO DE TUMORES DE MAMA

Múltiples líneas de investigación proponen que los estrógenos son responsables de mantener el crecimiento continuo de tumores de mama hormonodependientes. La remoción de fuentes de estrógenos (adrenales, ovarios), o las terapias con antiestrógenos, resultan en la mayoría de los casos en remisiones significativas del tumor; por otro lado la respuesta a este tipo de terapias mostró estar altamente asociada a la presencia de receptores de estrógenos (RE). Si bien esta última observación sostiene una posible acción directa de los estrógenos, el hecho de tratarse de sistemas *in vivo* no permite excluir un potencial efecto sistémico de la hormona, que se refleje en último término en el crecimiento tumoral. Los estudios de estimulación estrogénica realizados *in vitro* han aportado contundentes pruebas acerca de la acción mitogénica local de estas hormonas. La mayoría de los mismos se realizaron sobre líneas celulares de cáncer de mama humano; varias de estas líneas, incluyendo MCF-7, ZR-75-1, T-47D y CAMA 1, responden incrementando su tasa de proliferación ante concentraciones fisiológicas de estrógenos. En estos trabajos se demostró además que la

administración de antiestrógenos es capaz de revertir no sólo la estimulación de la proliferación promovida por estrógenos, sino también la inducción estrogénica de receptores para progesterona (RP) (Lippman, 1976). Resultados similares fueron asimismo observados en sistemas de cultivos celulares en medios químicamente definidos (sin componentes del suero) (Allegra, 1978). En adición a la inducción directa de una respuesta proliferativa, mediada a través de los RE presentes en las células tumorales, la acción de los estrógenos sobre el crecimiento tumoral podría involucrar diversos efectos locales, como lo son la sensibilización de la glándula para la acción posterior de otras hormonas, o la promoción de la síntesis y/o liberación de mitógenos locales (por ejemplo factores de crecimiento) a partir de las células que constituyen el tumor (Silberstein, 1982b).

Mecanismos operativos en la regulación hormonal del crecimiento tumoral

Mecanismo "positivo" de regulación hormonal

Las primeras observaciones realizadas por Lippman y col. (Lippman, 1986) mostraron que los medios condicionados provenientes de cultivos de MCF-7 (línea tumoral de mama hormon sensible) pretratados con estrógenos, depletados luego de los mismos, contenían una actividad estimuladora sobre la proliferación de MCF-7 y de otras líneas, significativamente superior respecto de la de medios condicionados por células tumorales no tratadas. Al investigar la naturaleza de la actividad autoestimuladora de los medios condicionados, se encontró que la misma estaría mediada por la presencia de factores de crecimiento (GF) tanto autócrinos como parácrinos, tales como el $TGF\alpha$, EGF (Lippman, 1976; Imai, 1982), IGF-I (Huff, 1986) y PDGF (Bronzert, 1987), cuya síntesis o liberación estaría inducida por estrógenos en las células provenientes de tumores de mama hormonodependientes. Se observó

además que la expresión de estos GF estaría constitutivamente aumentada en células que han adquirido independencia a la acción regulatoria hormonal, ya que en varios sistemas donde se desarrollaron variables tumorales de crecimiento autónomo, se detectó un incremento en los niveles de mRNA de ciertos factores como TGF α , EGF, o de sus receptores (Murphy, 1991).

En relación a estos posibles mediadores de los efectos proliferativos de las hormonas esteroideas sobre la proliferación de células de cáncer de mama, los GF más estudiados en los últimos años son los pertenecientes a la familia IGFs. Ya en el año 1986 se había establecido que las mayoría de las líneas tumorales mamarias presentaban receptores de IGF (RIGF), respondiendo al agregado exógeno de IGF-I con un incremento en su tasa de proliferación (Huff, 1986); por otro lado la secreción del mismo podía ser inhibida por antiestrógenos, los cuales usualmente presentan un efecto inhibitorio de la proliferación sobre estas células (Lippman, 1986). Posteriormente, diversos laboratorios han aportado evidencias acerca de interacciones entre los estrógenos y la expresión de IGFs, en la regulación de la proliferación de células de cáncer de mama estrógeno-dependientes (Arteaga, 1992; Cullen, 1992; Pollak, 1992). Si bien no se ha definido aún si el crecimiento tumoral inducido por estrógenos es regulado fundamentalmente por la expresión de componentes del sistema IGF, estas evidencias demuestran claramente que tanto IGF-I como II son mitógenos para células de tumor de mama *in vitro*, que los estrógenos alteran algunos de los componentes del sistema IGF y más aún, que el bloqueo del RIGF puede inhibir la proliferación celular estrógeno-inducida en ciertos sistemas experimentales. A la luz de estas experiencias, la existencia de una interrelación entre la acción de hormonas estimuladoras y la actividad IGF es evidente.

Ciertos GF estarían también involucrados en la inhibición del crecimiento tumoral, mediado por antiestrógenos como el tamoxifen. Pollak y col. demostraron que los niveles séricos de IGF-I

disminuían en pacientes tratados con tamoxifen (Pollak, 1992). Si bien esta observación no demuestra que la disminución de IGF-I producida por el antiestrógeno resulte en la disminución del crecimiento del tumor, provee evidencia acerca de que la fuente endócrina de IGF-I puede ser atenuada por antiestrógenos. Por otra parte, experimentos llevados a cabo por el grupo de Lippman (Lippman, 1986) demostraron la presencia de actividad TGF β en medio condicionado por células tumorales mamarias, observándose que los niveles del mismo se incrementaban notablemente por tratamiento con antiestrógenos, a concentraciones inhibitorias de la proliferación. Este hallazgo, conjuntamente con el hecho de que la acción antiestrogénica pudo ser revertida por anticuerpos anti-TGF β , sugeriría que el efecto inhibitorio del tamoxifen sobre la proliferación de células MCF-7 en cultivo, podría estar mediado por la secreción de TGF β a partir de dichas células (Knabbe, 1987). En otras experiencias, sin embargo, Arteaga y col. (Arteaga, 1988) encontraron que el TGF β ejercía efecto inhibitorio de la proliferación, pero principalmente en líneas estrógeno-independientes y ER(-), sugiriendo que los efectos mediados a través del RE serían independientes de la actividad del TGF β .

En conjunto, estos resultados sugieren que los estrógenos actuarían, al menos en parte, induciendo la secreción de factores de crecimiento autoestimulatorios, y similarmente, los efectos inhibitorios de antiestrógenos podrían ser explicados a través de una disminución en la producción de dichos factores mitogénicos (IGFs) o del aumento en la producción de factores inhibitorios (TGF β). Un hecho que apoya esta hipótesis lo constituye la observación empírica acerca de que muchos sistemas de cultivos celulares responden en mayor medida a la modulación hormonal de la proliferación cuando el medio de cultivo conteniendo la hormona es reemplazado menos frecuentemente, probablemente debido a que de este modo se permite alcanzar una concentración suficiente de GF en el entorno celular.

Los estudios de Sirbasku y col. (Sirbasku, 1976) sobre la proliferación estrógeno-inducida de cultivos de carcinomas de mama, si bien en coincidencia con los experimentos descriptos arriba, sostienen que la acción proliferativa hormonal requiere de la síntesis y liberación de factores de crecimiento, introducen una nueva posibilidad. En ellos se sugiere que los estrógenos incrementarían la proliferación celular a través de un efecto indirecto, que consiste en la inducción de factores de crecimiento sintetizados en órganos distantes; dichos factores, denominados *estromedinas*, actuarían en último término sobre el tumor induciendo su crecimiento. En efecto, los autores observaron que extractos parcialmente purificados de tejidos tanto normales como tumorales, estimulados previamente por estrógenos, eran capaces de inducir la proliferación de células de cáncer de mama cultivadas en medio sin suero. El efecto de los extractos, pudo ser reproducido por el agregado de EGF al medio de cultivo (Sirbasku, 1976).

El conjunto de los trabajos citados, propone la existencia de una señal positiva, mediante la cual las hormonas modificarían la proliferación de sus células blanco, ya sea actuando directamente sobre el tumor, o indirectamente a través de otros tejidos distantes. Dicha señal positiva involucraría la producción o liberación de factores de crecimiento producidos por las propias células tumorales (autócrinos), células adyacentes (parácrinos) u órganos distantes (*estromedinas*) que afectarían el crecimiento tumoral. El hecho de que la acción promotora del crecimiento tumoral que presentan ciertas hormonas se encuentre mediada por factores de crecimiento u otros componentes séricos capaces de "disparar" la mitosis, implica que las células tumorales se encontrarían en un estado de quiescencia (G_0), el cual abandonarían ante la señal positiva, para progresar a la fase G_1 , comenzando su ciclo proliferativo.

Mecanismo "negativo" de regulación hormonal

En oposición a la hipótesis que sostienen un efecto proliferador positivo de las hormonas, existen otros trabajos que sugiere un mecanismo **negativo** mediante el que las hormonas inducirían la proliferación. Los trabajos del grupo de Sonnenschein y Soto fueron realizados sobre las líneas tumorales de cáncer de mama humano T-47D (clones A8 y A11) y MCF-7, en las cuales observaron que su crecimiento es dependiente de estrógenos en ratones atímicos, pero por el contrario, proliferan a tasas similares en cultivos sin agregado de suero, independientemente de la presencia de E_2 . En este último sistema, el agregado de 10% de suero al medio de cultivo resultó en una marcada inhibición de la proliferación, que es revertida por dosis bajas de E_2 (menores de $10^{-11}M$), obteniéndose las tasas máximas de proliferación a una concentración de E_2 de $5 \times 10^{-12}M$. Ambas líneas celulares poseen niveles similares de RE y los respectivos K_d difieren en un orden de magnitud (Soto, 1986). Los autores interpretan estos hallazgos sugiriendo que:

1. Las células estrógeno-sensibles se encuentran habitualmente inhibidas de proliferar por factores inhibitorios presentes en el suero (a los que denominan *coliones*);
2. El E_2 actuaría neutralizando la inhibición. Este efecto, no obstante, no se encontraría mediado por el RE, ya que los niveles de hormona necesarios para obtener una máxima respuesta son significativamente menores que el K_d del RE, y dado que para ambas líneas celulares, las tasas de máxima proliferación ocurren a igual concentración de E_2 , independientemente de que las propiedades de sus receptores difieren.

La hipótesis propuesta por este grupo, a la que denominan **hipótesis negativa del control de la proliferación**, postula que el estado de proliferación celular es una propiedad constitutiva de las células tumorales, y que sólo podría ser regulada por señales

de tipo inhibitorias (*coliones*). Las células estarían por lo tanto inhibidas de proliferar por:

1- la presencia en el suero de estas moléculas inhibitorias. En este caso las hormonas como los estrógenos, ejercerían su función estimuladora del crecimiento mediante a) la inhibición de la síntesis o liberación de estos inhibidores séricos, b) la neutralización o inactivación de los mismos, o c) impidiendo el reconocimiento del inhibidor por su receptor correspondiente (Soto, 1987; Soto, 1991);

2- inhibidores endógenos que las células sintetizarían en respuesta a la acción hormonal; esta última forma de acción de las hormonas es denominada "efecto *shut off*" (Sonnenschein, 1991).

Efectos fisiológicos

La progesterona (Pg) es una hormona esteroidea producida por el ovario. Su secreción, por parte del folículo destinado a ovular, comienza en las etapas inmediatamente previas a la ovulación. Posteriormente, su producción alcanza niveles marcadamente superiores a expensas del cuerpo lúteo, estimulado por la LH. Otros órganos, tales como el testículo, la corteza adrenal y la placenta secretan también cantidades significativas de Pg. La cantidad de Pg secretada varía desde unos pocos miligramos producidos durante la fase folicular (tasa de producción similar a la del testículo) a 10-20 mg/día durante la fase luteal, y aumenta a varios cientos de miligramos durante la última fase del embarazo.

La Pg secretada por el cuerpo lúteo es responsable del desarrollo del endometrio secretor, proceso que comprende tanto la formación de las glándulas endometriales como la producción de glicógeno dentro de la cavidad uterina. Posteriormente, la Pg induce efectos morfogénicos en el útero (cambios deciduales) requiriendo, a tal efecto, la estimulación previa por estrógenos. Por último, la Pg inhibe la síntesis de su propio receptor e impidiendo, además, la resíntesis de los receptores de estrógenos (RE) (Rao, 1973; Clark, 1977).

Es conocida la dependencia del embarazo respecto de la producción de cantidades crecientes de Pg. Este efecto podría asociarse a la capacidad de la Pg de inhibir la contractibilidad de la musculatura uterina. Por otra parte, ha sido sugerido que dicha continuidad podría también explicarse en función de la capacidad de la Pg de inducir un estado de tolerancia inmunológica frente a los antígenos fetales alogeneicos, previniendo así el rechazo del feto.

A nivel hipofisario, la Pg inhibe la liberación de prolactina (PRL) y la producción de LH. Concentraciones elevadas son capaces, también, de inhibir la producción de FSH. Es importante destacar la capacidad de los estrógenos de modular los efectos biológicos de la Pg. Este fenómeno estaría mediado, al menos en parte, por la capacidad de los estrógenos de inducir la expresión de receptores para Pg (RP). Mediante el empleo del progestágeno sintético R5020, el cual posee la capacidad de unirse al RP con una afinidad 6 a 10 veces superior respecto de la Pg, presentando, a diferencia de ella, una baja afinidad por el receptor de glucocorticoides (RG), se ha demostrado la existencia de RP inducibles por estrógenos en hipotálamo e hipófisis (MacLusky, 1978; MacLusky, 1980).

A pesar de la alta producción de Pg, su concentración en el tejido uterino es baja. Esto es atribuido, en primera instancia, al metabolismo hepático de la hormona y su posterior conversión en 5β -pregnano- 2α - 20α -diol (pregnanediol). La Pg es también metabolizada en endo y miometrio y en el mismo cuerpo lúteo. En este último caso, su conversión a 20α -dihidroxiprogesterona, cuya acción biológica alcanza a la mitad de la de la Pg (Hooker CW, 1949), constituiría un mecanismo significativo en la atenuación de la actividad progestacional durante la fase luteal del ciclo (Wiest, 1959).

Efectos antihormonales

Además de unirse a su receptor específico, la Pg es capaz, debido a su estereoespecificidad, de interactuar con receptores de estrógenos, andrógenos y aldosterona, como así también con los sitios activos de ciertas enzimas involucradas en su metabolismo.

1-Efecto antiestrogénico:

La interacción de la Pg con la actividad del E_2 es particularmente evidente en la mama. Al administrar altas dosis de

estrógenos a ratones castrados, se observa proliferación, dilatación del sistema tubular y la posterior fibrosis del tejido conectivo. En cambio, la administración conjunta de estrógenos y Pg, induce un desarrollo completo y adecuado de la glándula (Cowie, 1952). En pacientes con enfermedad benigna de mama, por otra parte, se ha descrito una función luteal alterada, caracterizada por una relación Pg/E₂ plasmática significativamente más baja que la observada en mujeres normales (Sitruk-Ware, 1979). Más aún, diversos autores han sugerido que el cáncer de mama estaría epidemiológicamente ligado a una función luteal deficiente (Mauvais-Jarvis, 1979; Korenman 1980).

La acción antiestrogénica de la Pg, al menos en endometrio y mama, involucraría dos mecanismos:

1) La Pg antagonizaría la capacidad de las células uterinas de responder a E₂, reduciendo la disponibilidad y/o funcionalidad de sus receptores citosólicos (Rc). Se ha sugerido que el mecanismo responsable de tal efecto podría ser la transformación del receptor en una forma que impida la unión del E₂, o bien el bloqueo de la síntesis del sitio de unión nuclear del complejo Rc-E₂ (sitio nuclear tipo II) (Clark y Markaverich, 1983).

2) La Pg induciría a la 17β-estradioldeshidrogenasa, enzima implicada en la conversión de E₂ en estrona. En el endometrio, esta enzima se localiza en el epitelio glandular, por lo que su regulación podría influenciar la acción biológica del E₂ (Gurpide, 1978).

Los niveles plasmáticos de estrógenos no son afectados por dosis fisiológicos de Pg. A dosis farmacológicas, por el contrario, la Pg es capaz de reducir los niveles plasmáticos de estrógenos, proceso mediado a través de la supresión de la liberación de gonadotrofinas y de la disminución en los niveles de disponibilidad de precursores androgénicos de E₂, por aumento en el clearance de testosterona (Gordon, 1971).

2-Efecto antiandrogénico:

La Pg, dada su similitud conformacional con la testosterona (Schmit, 1980) puede interferir a diferentes niveles con la acción androgénica. El ejemplo más estudiado es el relacionado con la inhibición competitiva que presenta la Pg por el sitio enzimático de la 5α -reducción de la testosterona a dihidrotestosterona (DHT), fenómeno observado en varias especies y en diversos órganos (Massa y Martini, 1971; Mauvais-Jarvis, 1974). En este fenómeno, la Pg mostraría una afinidad hacia la enzima aún mayor que la expresada por la testosterona (Kutten, 1975).

3-Efecto antialdosterona:

La Pg posee la capacidad de aumentar la excreción de sodio en presencia de mineralocorticoides activos; este hecho ha sugerido que la Pg antagoniza la acción de mineralocorticoides actuando a nivel tubular. El mecanismo involucraría la inhibición de la unión de la aldosterona tanto a su receptor específico como al receptor de glucocorticoides (RG) (Wambach, 1978).

4-Efecto antiglucocorticoideo:

El antagonismo entre Pg y glucocorticoides (GC) es evidente en glándula mamaria. Los altos niveles plasmáticos de Pg durante la gestación actúan de modo de prevenir la lactancia prematura. De hecho, la reducción experimental de los niveles de Pg ha mostrado ser capaz de iniciar la producción de leche. Se ha postulado que el mecanismo responsable involucraría el bloqueo de la expresión del gen de caseína, proceso que involucraría una acción antagónica con la función glucocorticoidea, mediado a través de la interacción de la Pg con el RG (Haslam, 1990).

ACETATO DE MEDROXIPROGESTERONA (MPA)

Características

El MPA es un progestágeno sintético derivado del pregnano (17 α -acetoxiprogesterona). Los derivados del pregnano, en particular el MPA, poseen la capacidad de unirse con alta afinidad al RP, y con menor afinidad a los RA y RG; en adición presentan una alta actividad antiestrogénica similar a la de la progesterona (Tseng y Gurpide, 1975). Existen estudios, sin embargo, que indican que el MPA puede manifestar en algunas circunstancias propiedades estrogénicas, tal como se ha descrito en relación a su capacidad de inducir la estimulación de la secreción de prolactina (El Etreby, 1979).

Usos clínicos

El MPA es administrado en los tratamientos de amenorrea secundaria, metrorragia uterina disfuncional y endometriosis. En algunos países se lo usa, además, como anticonceptivo, en la prevención de abortos espontáneos recurrentes, en el tratamiento de la dismenorrea, tensión premenstrual, infertilidad luteal y pubertad precoz (Sun, 1984). El MPA también es empleado en el tratamiento de carcinomas de mama, endometrio, próstata, ovario y células renales (Campio y col., 1983).

Este progestágeno ha sido extensamente utilizado en el tratamiento de pacientes con cáncer de mama avanzado. Los estudios epidemiológicos indican la obtención de respuestas positivas en un 30-50% de los casos tratados, observándose además que la eficacia de la terapia se encuentra en relación directa con la presencia de RE (Ganzina, 1979; Cortés Funes y col., 1983). Se han propuesto dos mecanismos capaces de explicar la actividad terapéutica del MPA sobre el cáncer de mama avanzado; 1) su interacción con otras

hormonas circulantes y 2) su capacidad de inhibir, en forma directa, la proliferación de las células tumorales.

1-Interacción con hormonas circulantes, estrógenos y andrógenos:

En los tumores de mama hormonodependientes, los estrógenos estimularían el crecimiento tumoral. Los andrógenos adrenales, por otra parte, pueden ser aromatizados y convertidos en estrógenos en el tejido adiposo. Por lo tanto, la disminución en los niveles circulantes de ambas hormonas se asociaría con un efecto beneficioso en relación a la terapia antitumoral. La acción antiestrogénica del MPA tiene lugar: a) bloqueando la secreción de gonadotrofinas mediante una acción a nivel de la hipófisis; b) disminuyendo la concentración de E_2 intracelular, dada su capacidad de incrementar la actividad de la enzima E_2 -deshidrogenasa; c) reduciendo la transformación de andrógenos a estrógenos, por inducción de la 5α -reductasa hepática, involucrada en el catabolismo de los andrógenos (Robustelli Della Cuna y Preti, 1986). La acción antiandrogénica del MPA es ejercida a través de la disminución en los niveles de testosterona circulante por: a) inhibición de la secreción de la hormona luteinizante (LH) hipofisaria; b) aceleración del metabolismo de la testosterona, a través de la inducción de la 5α -reductasa hepática (Robustelli Della Cuna y Preti, 1986).

2-Acción directa a nivel celular:

El MPA es capaz de inducir diversos efectos directos, a nivel celular: bloquea la síntesis de los RE, se une con alta afinidad a los RP, y se une también, con menor afinidad, a los receptores de andrógenos y corticosteroides. Estudios desarrollados *in vitro* han demostrado, además, la capacidad del MPA de inhibir marcadamente la unión del E_2 a su receptor, y regular negativamente la expresión de los RP (Robustelli Della Cuna y Preti, 1986).

Actividades carcinogénicas y teratogénicas del MPA, descritas en modelos experimentales

En diversos sistemas experimentales, el tratamiento con MPA produjo un aumento en la incidencia tumoral. En perros "beagle" la administración de MPA indujo un aumento en el número de hiperplasias lobulillares y un alto porcentaje de los animales tratados desarrollaron tumores metastásicos, mientras que en los controles ningún animal presentó tumores malignos (Frank y col., 1979; Concannon y col., 1980). También en monos *rhesus* se observó la aparición de carcinomas endometriales luego de la administración de dosis altas de MPA (Sun, 1984). En los tumores mamarios de rata inducidos por 7,12-dimetilbenz(a)antraceno (DMBA), un modelo clásico para el estudio de la dependencia hormonal del cáncer de mama, el tratamiento con MPA dio lugar a resultados controvertidos. Danguy y col. (1980) demostraron que la administración de dosis altas de MPA inhibía el crecimiento tumoral, mientras que dosis bajas tenían el efecto opuesto. En cambio, Russo y col. (1989) han informado que el MPA no sólo no protegía de la tumorigénesis química cuando se utilizaban dosis similares a las usadas para la anticoncepción, sino que además, cuando la dosis se aumentaba 10 veces, la diferenciación de la glándula mamaria se inhibía con el consecuente aumento de la incidencia tumoral. Por otra parte, el MPA también aumentó la incidencia de tumores de mama espontáneos en la cepa murina SHN, portadora del virus MMTV (Nagasawa y col., 1988). En monos (*Macaca fascicularis*) se comprobó que la administración de una única dosis de 25 ó 100 mg/kilo a hembras preñadas tuvo efectos tóxicos específicos sobre los embriones. Tanto en los fetos de sexo femenino como masculino ambas dosis causaron anormalidades en los genitales externos y, en presencia de la dosis más alta, se observó hipoplasia y/o atrofia de las adrenales (Prahadala y col., 1985).

REGULACION DEL CRECIMIENTO DEL TEJIDO MAMARIO Y DE TUMORES DE MAMA POR PROGESTERONA Y PROGESTAGENOS

La regulación de la proliferación celular involucra un delicado balance entre los efectos de distintas moléculas regulatorias, incluyendo hormonas y factores de crecimiento, los cuales proveen señales que estimulan o inhiben la replicación celular. En particular, el crecimiento y desarrollo de los tejidos sexuales femeninos está regulado por las dos principales hormonas esteroideas, estradiol y progesterona. Los estrógenos, actuando concertadamente con otras hormonas y factores de crecimiento, parecen regir la proliferación de dichos tejidos. La progesterona, por otra parte, ejerce su acción biológica actuando principalmente a dos niveles; primero, la preparación del útero para la implantación del óvulo fecundado, segundo, la inducción del desarrollo y diferenciación del epitelio glandular hacia un epitelio de tipo secretorio, sobre el que actuará más tarde la prolactina a fin de estimular la lactancia. En términos simples, la progesterona actuaría como la hormona sexual femenina diferenciadora e inhibiría el efecto proliferador de los estrógenos, dirigiendo a los tejidos blanco hacia su función diferenciada.

La acción de la Pg involucra, en gran medida, la modulación de la estimulación estrogénica. Para ello, emplea múltiples mecanismos; a) la modulación de la secreción de estrógenos mediante acciones sobre el eje hipotálamo-hipofisario o, directamente, sobre su sitio de síntesis, b) la inducción de variaciones en el grado de sensibilidad a estrógenos de los tejidos blanco, ya sea a través de un incremento en la actividad de las enzimas que metabolizan a los estrógenos, o modificando en aquéllos el contenido de RE, c) la modulación de la síntesis y/o liberación de factores de crecimiento inducibles por estrógenos, y d) la acción antagónica directa con los estrógenos, actuando a nivel postreceptor (transduccional).

Pese a su acción inhibitoria sobre la proliferación inducida por estrógenos, la Pg es capaz de inducir en ciertas circunstancias acciones proliferativas tales como la promoción del crecimiento del estroma uterino, necesaria para la implantación del embrión y la estimulación de la proliferación lóbuloalveolar en la mama, requerida para la producción de leche.

Efectos de progestágenos sobre la glándula mamaria *in vivo*

El desarrollo de la glándula mamaria normal involucra la interacción de diferentes hormonas, las que pueden variar de acuerdo a la especie y a los diferentes estadios de diferenciación; en este contexto, los efectos de la Pg parecerían ser ejercidos mediante una acción conjunta con otras hormonas. Es generalmente admitido que los estrógenos inducen el desarrollo de la mama hasta un estadio caracterizado por la formación de conductos. Posteriormente, la acción conjunta de estrógenos y Pg determinaría la formación de los alvéolos (Nandi, 1958). El rol principal de la Pg parece ser el de promover el desarrollo lóbuloalveolar de la glándula adulta, mediante la inducción de la formación de acinos en los ductos mamarios, previamente estimulados por estrógenos (Franz, 1981). Es importante señalar, no obstante, que el desarrollo de la glándula mamaria no involucra sólo a las hormonas esteroides. En efecto, experiencias llevadas a cabo con animales ovariectomizados, adrenalectomizados e hipofisectomizados, han sugerido una participación crítica de las hormonas hipofisarias GH y PRL (Nandi, 1958). Trabajos más recientes desarrollados por Tonelli, han indicado que la Pg no actuaría *per se* como una hormona mitogénica sobre el tejido mamario normal. Su acción, conjuntamente con la mediada por los estrógenos, sensibilizaría a la glándula mamaria a la acción mitogénicas de otras hormonas tales como PRL, GC y GH (Tonelli, 1980).

1-Glándula mamaria normal de ratón

En el ratón, ocurre con la madurez sexual un rápido crecimiento ductal que lleva a la glándula a la estructura ramificada típica. En esta etapa, el requerimiento hormonal mínimo parece involucrar a los estrógenos y a la PRL o la GH (Topper y Freeman, 1980). Con la preñez, se desarrollan las estructuras lóbuloalveolares que llenarán los espacios interductales. El desarrollo lóbuloalveolar en animales hipofisectomizados, ovariectomizados y adrenalectomizados, requiere de estrógenos, Pg, y PRL o GH. Por lo tanto, la principal diferencia entre ambas etapas del desarrollo esta dado por la necesaria presencia de Pg en esta última etapa.

Haslam estudió la regulación diferencial de la glándula mamaria inmadura y adulta, observando los efectos de la Pg sobre la síntesis de DNA en ambos estadios (Haslam, 1988). Encontró que en el animal inmaduro, la Pg no ejercía efecto proliferativo sobre el epitelio, mientras que el E₂ promovía un gran incremento en el TLI. En el epitelio ductal de la glándula madura, en cambio, tanto la Pg como el E₂ fueron capaces de promover la síntesis de DNA, si bien la Pg fue mucho más efectiva. La administración de los dos esteroides juntos resultó en un marcado efecto sinérgico, aunque transitorio, que fue atribuido en parte a la capacidad de los estrógenos de aumentar la concentración de RP, incrementando la respuesta del tejido a la Pg. Estos estudios sugieren que en el ratón maduro, la Pg desempeñaría un importante rol en la proliferación del epitelio mamario normal (Haslam, 1988).

2-Tumores mamarios experimentales de ratón

En el ratón, el crecimiento de tumores hormono-dependientes puede ser regulado por diferentes hormonas, entre las cuales los estrógenos y la PRL son consideradas las más relevantes. Sobre el rol de los progestágenos, en cambio, existen observaciones

contradictorias, indicando efectos tanto estimulatorios como inhibitorios de la proliferación, que dependen de los modelos experimentales y de las dosis empleadas. En tumores de mama preñez-dependientes, que regresionan rápidamente luego del parto, se observó que se lograba un crecimiento tumoral continuo mediante trasplantes hipofisarios en la zona del tumor, y que este crecimiento podía ser impedido por la ovariectomía. A su vez, el efecto de la ovariectomía era revertido mediante la inyección de E₂ y Pg (Van Nie, 1965; Matsusawa, 1975). Posteriormente, en diversos modelos de adenocarcinomas mamarios murinos, se encontró que la administración conjunta de estrona y Pg fue capaz tanto de inducir tumores como de incrementar su crecimiento (Welsch, 1987). Otros trabajos han mostrado la capacidad de la Pg de revertir parcialmente la acción inhibitoria del crecimiento tumoral mediada por el antiestrógeno tamoxifen, en tumores inducidos por DMBA (Robinson y col., 1987). Observaciones más recientes, realizadas en los tumores murinos transplantables MXT, han descrito la capacidad de la Pg de inducir un aumento en el índice de mitosis, similar al obtenido por estimulación con estrógenos (Kiss, 1986); este efecto sin embargo fue transitorio, y la proliferación revirtió rápidamente a los niveles controles (Clarke, 1990).

En contraposición a los experimentos anteriores, existen datos que demuestran una acción inhibitoria de los progestágenos sobre el desarrollo de tumores de mama murinos. Así, en ciertos modelos de carcinogénesis química, ha sido observado que la Pg es capaz de producir la remisión tumoral, dependiendo del momento de su administración respecto del carcinógeno químico (Huggins y col., 1962; Gottardis, 1983).

3-Glándula mamaria normal humana

El desarrollo de la glándula mamaria en humanos es dependiente de las fluctuaciones en los niveles séricos de hormonas durante el ciclo menstrual, las cuales determinan cambios cíclicos en las

tasas de mitosis del epitelio glandular. Los niveles de Pg en sangre son elevados durante el embarazo, cuando la glándula mamaria aún no secreta pero se encuentra en pleno desarrollo, y bajos durante la lactancia. Durante el embarazo, la Pg mediaría dos efectos principales. En una primera etapa, favorecería el crecimiento y desarrollo de la glándula, determinando una compleja organización compuesta por alvéolos organizados en lóbulos, conectados a una red de conductos. Una acción posterior, inhibiría la secreción glandular, a través de una modulación sobre la producción de PRL hipofisaria (Houdebine, 1983).

4-Adenocarcinomas mamarios humanos

Los progestágenos sintéticos MPA y acetato de megestrol (MA), son utilizados como agentes efectivos en el tratamiento de cánceres de mama metastásicos, induciendo respuestas similares a aquéllas obtenidas con la administración de tamoxifen, e igualmente predecibles en función de la presencia de RE y RP. Los estudios clínicos realizados, indican que tanto en tumores RE(+) como RE(-), la presencia adicional de RP se encuentra asociada a una mejor respuesta a la terapia hormonal. Ello sugeriría que la acción antitumoral de los progestágenos se encontraría mediada, al menos parcialmente, a través de efectos directos ejercidos a través de RP sobre las células tumorales. No obstante, no pueden ser descartadas adicionales interacciones de los progestágenos con receptores de andrógenos y glucocorticoides, y/o la acción indirecta de los progestágenos ejercida a otros niveles tales como el eje hipotálamo-hipofisario.

Estudios realizados por Dao y col. (Dao, 1982) revelaron, por otra parte, que en aquellos pacientes tratados con concentraciones fisiológicas de E₂ más Pg, el TLI mostraba un incremento significativo respecto de los índices observados en pacientes no tratados, aún en el caso de tumores RE y PR(-). Al extraer biopsias de estos pacientes y analizar su respuesta al tratamiento hormonal

in vitro se observaron resultados discrepantes. El tratamiento con E₂ y/o Pg produjo en algunas biopsias un aumento en la tasa de proliferación de las células tumorales. En otras en cambio, se observó el efecto contrario, es decir, una inhibición en los índices de proliferación. La naturaleza de las respuestas observadas fue independiente del contenido de receptores (Jones, 1987). Estos resultados sugerirían que los efectos asociados a la administración de progestágenos no estarían mediados a través del RP, si bien se deben considerar las limitaciones que existen para la detección de receptores debido a los altos niveles de Pg circulante, así como debido a la dificultad de mantener niveles de receptores estables en cultivos de biopsias malignos (Clarke, 1990).

Efectos de progestágenos sobre la glándula mamaria *in vitro*

El rol de los estrógenos y la Pg sobre la síntesis de DNA en la glándula mamaria se ha estudiado principalmente a través de técnicas *in vitro*, las cuales incluyen el cultivo de órganos, el trasplante de mama humana normal en ratones atímicos y los cultivos celulares de tejido normal, tumores de mama benignos y líneas establecidas de carcinoma de mama. Dichos estudios nuevamente arrojaron resultados muy dispares; de ellos surge como consenso que los estrógenos son capaces de estimular la proliferación celular, mientras que los progestágenos pueden presentar un efecto estimulador alto, moderado o bajo, e incluso inhibir el crecimiento del epitelio mamario. También, en los casos en que se evaluó, los progestágenos fueron capaces o incapaces de inhibir el efecto estimulador de los estrógenos (Clarke, 1990).

Considerando que la constitución del epitelio mamario incluye elementos ductales, lobulares y alveolares, debe considerarse la posibilidad de que cada uno de ellos responda en forma diferente a la estimulación por progestágenos, particularmente en las distintas

fases del ciclo. La interpretación de la actividad de los progestágenos se ve dificultada aún más teniendo en cuenta que en los diferentes modelos analizados, la proporción exacta de los diferentes tipos celulares presentes en los explantos y/o la expresión y persistencia de receptores hormonales luego del trasplante o a través del cultivo, no han sido convenientemente establecidas (Clarke, 1990).

1-Inhibición del crecimiento *in vitro* por progestágenos

Las primeras evidencias respecto de la acción inhibitoria de los progestágenos sobre el desarrollo *in vitro* del cáncer de mama, fueron obtenidas por Vignon y col. (1983) sobre un clon estrógeno-sensible de la línea T-47D y sobre la variable antiestrógeno-resistente de la línea MCF-7. Se observó que los progestágenos actuarían modulando la estimulación estrogénica. En efecto, tanto la Pg, como su análogo sintético R5020, fueron capaces de inhibir la estimulación de la proliferación inducida por estrógenos, sin demostrar actividad evidente en ausencia de los mismos. Esta acción inhibitoria no pudo ser reproducida por DHT o Dexametasona, sugiriendo que la inhibición se encontraría mediada a través del RP. Los autores observaron, además, que la acción inhibitoria se evidenciaba también sobre la línea tamoxifen-resistente (MCF-7), sugiriendo que ambos tipos de antiestrógenos, progestágenos y antiestrógenos no esteroideos como el tamoxifen, involucraría diferentes mecanismos (Chalbos y col., 1982, Vignon, 1983).

Trabajos posteriores han indicado, no obstante, que la acción inhibitoria de los progestágenos no se encontraría limitada a su actividad antiestrogénica. Experimentos realizados por Horwitz y col. (Horwitz, 1985) sobre una línea celular anti-estrógeno-resistente y RE(-) (línea T-47Dco), demostraron la capacidad del compuesto R5020, a concentraciones fisiológicas, de inhibir marcadamente su índice proliferativo en ausencia de estrógenos.

La capacidad de los progestágenos de inhibir *per se* la proliferación tumoral parece depender de la expresión de los RP. Las líneas celulares empleadas en los trabajos de Vignon (1983) sólo expresan RP luego de la estimulación estrogénica. Este efecto, podría explicar el requerimiento estrogénico a fin de evidenciar la acción inhibitoria de los progestágenos. Por el contrario, las líneas celulares empleadas en los trabajos de Horwitz (1985) expresan RP en ausencia de estimulación estrogénica, siendo sensibles a la acción inhibitoria directa de los progestágenos. Ello sugiere que, si existen RP, los progestágenos podrían inducir efectos inhibitorios, aún en ausencia de estrógenos (Horwitz, 1985). Similares conclusiones han sido obtenidas con otros progestágenos tales como el MPA, el R5020 y el ORG 2058. Su acción inhibitoria sobre la proliferación de las células tumorales, se encontraría mediada a través de los RP (Sutherland, 1988). El mecanismo de acción de los progestágenos, no obstante, no resulta del todo claro. Otros trabajos han sugerido que el efecto inhibitorio del MPA sobre la proliferación de la línea MCF-7 podría estar mediado, al menos parcialmente, por los RG (Braunsberg, 1987). Poulin y col.(1989) han observado, por otra parte, que la inhibición de la proliferación de células de carcinoma mamario humano ZR-75-1 inducida por MPA, podía ser revertida competitivamente tanto por el compuesto RU486 (potente antiprogestágeno y antiglucocorticoideo) como por el OHF (antiandrógeno monoespecífico no esteroideo). Más aún, la acción inhibitoria del MPA resultó potenciada por la presencia simultánea de DHT. Estos hallazgos podrían explicar, al menos parcialmente, la ausencia de correlación entre los resultados obtenidos en terapias basadas en el empleo de progestágenos y la expresión de RP en las células tumorales. Similares conclusiones fueron obtenidas por Sutherland (1988). Trabajando con cinco líneas tumorales RP (+) observó que los niveles máximos de inhibición del crecimiento inducida por MPA, variaban desde un 70% para células T-47D, hasta un 20% en las ZR-75-1, no encontrándose correlación entre niveles de inhibición y expresión de los RP.

2-Estimulación del crecimiento *in vitro* por progestágenos

En coincidencia con lo observado *in vivo*, experimentos realizados sobre cultivos de explantos mamarios demostraron la capacidad de la Pg de ejercer un marcado efecto estimulador sobre el desarrollo del epitelio ductal de los explantos y un moderado incremento en los niveles de proliferación de las estructuras alveolares. La presencia de PRL potencia aún más estos efectos (Koyama, 1972, Imagawa y col. 1982).

También han sido descriptos efectos estimulatorios de progestágenos sobre cultivos de tumores mamarios. En tumores mamarios de rata 13762NF cultivados en gel de colágeno, en medio libre de suero y en presencia continua de insulina, se observó que la Pg era capaz de potenciar sinérgicamente la acción proliferativa inducida tanto por PRL como por EGF; mientras que la Pg *per se* no indujo efectos significativos (Richards, 1986). Trabajando con tumores de mama hormonodependientes inducidos por NMU, cultivados en agar, Manni y col. observaron, por otra parte, que tanto la Pg como el R5020 incrementaron la formación de colonias, la cual fue aún más pronunciada en ausencia de suero; el efecto se atribuyó a la producción de factores de crecimiento autócrinos inducidos por progestágenos por parte de estas células tumorales. Con ambas drogas, sin embargo, se observó un efecto bifásico que consistió en la pérdida del efecto estimulador de colonias a concentraciones altas (Manni, 1987; Manni, 1988).

En varios de los sistemas de cultivos en que se demostró incremento en el número celular luego del tratamiento con progestágenos, las células habían demostrado previamente ser resistentes a la inhibición del crecimiento por progestágenos tanto *in vivo* como *in vitro* (Simon, 1984; Braunsberg, 1987). No obstante, la proliferación fue también observada en células T-47D, las cuales representan la fuente de la mayoría de los datos sobre inhibición por progestágenos (Hissom, 1989).

Un posible mecanismo involucrado en la acción proliferativa de Pg y progestágenos observada en los sistemas *in vitro* fue propuesta por este último grupo de investigadores, quienes atribuyen la habilidad de detectar este fenómeno a la ausencia de rojo fenol, conocido agonista estrogénico, en los medios de cultivo. En efecto, como se mencionó anteriormente, la capacidad inhibitoria de los progestágenos puede estar asociada con una acción antagónica sobre la proliferación inducida por estrógenos; los autores proponen que la ausencia de estrógenos, y por consiguiente la pérdida de este efecto antagónico, crearía condiciones en las que podría evidenciarse el efecto estimulador de la proliferación ejercido por los progestágenos (Hissom, 1989; van der Berg, 1990).

MODELO EXPERIMENTAL

En nuestro laboratorio se ha demostrado que la administración prolongada de acetato de medroxiprogesterona (MPA) a ratones hembra de la cepa BALB/c, lleva a la aparición de adenocarcinomas de mama, con una incidencia actuarial del 79%, y una latencia de 52 semanas (Lanari y col., 1986a; Lanari y col., 1986b). Histológicamente estos tumores fueron principalmente de origen ductal, dado que en la gran mayoría de los casos fueron precedidos por lesiones preneoplásicas ductales (DH). En menor proporción, se obtuvieron adenocarcinomas lobulillares, precedidos por lesiones preneoplásicas de tipo alveolar -HAN- (Molinolo y col., 1988). El análisis de contenido de receptores hormonales en los tumores ductales, reveló la presencia de alto contenido de RP y/o RE (364 ± 22 y 109 ± 29 fmoles/mg proteína, respectivamente), y bajo contenido de REGF ($1 \pm 0,53$ fmoles/mg proteína). Los carcinomas de tipo lobulillar, por otra parte, expresaron REGF ($5,5 \pm 1,4$ fmoles/mg proteína), pudiendo expresar o no RE y RP (Kordon y col., en prensa).

Debido a que el MPA es un conocido agonista de la función progestagénica, se evaluó posteriormente la capacidad de la Pg, progestágeno natural, para inducir la aparición de tumores en esta cepa. Los estudios (Kordon y col., 1993) concluyeron que la administración de Pg era también capaz de inducir la aparición de adenocarcinomas mamarios, aunque éstos fueron principalmente lobulillares. Las diferentes histologías presentadas por los tumores inducidos por MPA y Pg sugieren que ambas hormonas podrían utilizar caminos carcinogénicos distintos (Kordon y col., 1993). Por otra parte, tanto la ovariectomía como la sialoadenectomía disminuyeron significativamente la incidencia tumoral. Los altos niveles de EGF detectados en sueros de ratones tratados con MPA, niveles que disminuyen marcadamente luego de la sialoadenectomía, sugieren que el EGF proveniente de la glándula salival, juega un

rol importante en la carcinogénesis por MPA (Kordon y col., en prensa).

Los tumores originalmente inducidos por MPA fueron transplantados en hembras singeneicas, obteniéndose diversas líneas tumorales. Con el objeto de evaluar si el crecimiento de éstas era dependiente del progestágeno, los tumores fueron inoculados en ratones tratados y no tratados con MPA. Los resultados indicaron que los tumores **ductales** dieron origen a líneas hormonodependientes (HD), las cuales crecieron significativamente más rápido y con menor período de latencia en ratones hembra tratados con MPA. En aquéllos no tratados, los tumores crecieron lentamente a partir de los 2 meses, a expensas de hormonas ováricas (Lanari y col., 1989; Kordon y col., 1993). Mediante diferentes métodos de selección, se obtuvieron, a partir de estas líneas HD, variantes con capacidad de crecer en forma autónoma (HI). A través de los sucesivos pasajes singeneicos, los tumores HD conservaron la expresión de RE y RP (Lanari 1989, Kordon y col., en prensa).

Los adenocarcinomas **lobulillares**, por otra parte, dieron origen a líneas tumorales, las cuales mostraron presentar un patrón de crecimiento hormonoindependiente (HI), alcanzando un gran tamaño tanto en presencia como en ausencia de MPA. Dichos tumores conservaron los REGF, y, en el caso de presentarlos, perdieron los RP y RE a través de los sucesivos pasajes (Kordon y col., 1993).

Los experimentos descritos permitieron establecer que el MPA no sólo es capaz de inducir el desarrollo tumoral, sino que también promueve el crecimiento de las líneas HD en los sucesivos transplantes. Si bien el efecto principal del MPA es progestacional, es conocida también su capacidad de actuar a través de otros sistemas de receptores; por este motivo en otra serie de experimentos se evaluaron los efectos sobre el crecimiento tumoral de Pg y andrógenos, así como de estrógenos (otro grupo de hormonas importante en la regulación del cáncer de mama).

Se observó que el crecimiento tumoral de líneas HD promovido por la Pg, fue similar al promovido por MPA (Kordon y col., 1990). Por el contrario, en los ratones pretratados con pellets de benzoato de estradiol (BE) o 17β -estradiol (E_2) no se observó aparición de tumores, aún 6 meses después del trasplante. En ratones portadores de tumor, por otra parte, la administración de estrógenos resultó en la regresión tumoral, aún en presencia de MPA o Pg, tanto para tumores HD como HI (Kordon y col., 1991). La acción de los andrógenos se evaluó a través del implante de pellets de DHT. En este caso, se observó una estimulación del crecimiento tumoral, aunque menor que aquélla obtenida en animales tratados con MPA o Pg. Los efectos de andrógenos fueron también analizados indirectamente, mediante el inóculo de células tumorales en ratones machos, observándose que el crecimiento tumoral fue marcadamente menor que el alcanzado en hembras tratadas o no tratadas con MPA (Kordon y col., 1990). Considerados en conjunto, estos resultados indican que el crecimiento de los adenocarcinomas de mama inducidos por MPA puede ser modulado *in vivo* por la presencia de hormonas esteroideas. Mientras que los andrógenos no ejercerían un rol importante en la modulación del crecimiento tumoral, los progestágenos incrementan el crecimiento de las líneas HD. Por otra parte, la administración de estrógenos resulta en la remisión de tumores tanto HD como HI (Kordon y col. 1991; Kordon y col., 1993). Durante los experimentos de remisión tumoral por estrógenos, unas pocas líneas MPA-dependientes adquirieron resistencia al tratamiento estrogénico; dichas sublíneas, denominadas HDR (hormono-dependientes para su crecimiento, pero estrógeno-resistentes), conservaron a través de los pasajes subsiguientes la respuesta al MPA, aunque no recuperaron su sensibilidad a la inhibición por estrógenos (Kordon y col., 1991).

En adición a los efectos descritos, el crecimiento de estas líneas tumorales parece ser afectado por factores liberados desde el ovario. En efecto, la ovariectomía realizada previamente al implante tumoral, produjo un retraso en el crecimiento, efecto que

fue más notorio en ausencia de MPA (Kordon y col., 1990). La sialoadenectomía, por otra parte, no afectó el crecimiento tumoral (Kordon y col., en prensa).

En el Esquema 1, se describen los rasgos principales de los mecanismos de inducción y crecimiento tumorales (parte central y periférica del esquema, respectivamente) *in vivo*, de los tumores de mama inducidos por MPA que constituyen nuestro modelo experimental.

Se ha postulado clásicamente que las hormonas son requeridas en la fase de inducción de tumores de mama, dado que en la mayoría de las cepas los tumores ya desarrollados adquieren la capacidad de crecer independientemente de cualquier regulación hormonal (Welsch, 1977). El mantenimiento de la hormono- dependencia tumoral sólo ha sido observado en escasos modelos experimentales, incluyendo el modelo presentado aquí. Para modular el crecimiento tumoral, las hormonas podrían actuar, a) ejerciendo efectos directos sobre las células tumorales y/o b) induciendo la síntesis de factores tróficos para el tumor, a partir de otros tejidos. En nuestro modelo, los altos niveles de receptores esteroideos detectados en los tumores HD, así como el requerimiento de hormonas ováricas para el crecimiento tumoral, sugerirían que ambas opciones serían operativas en el mismo. No obstante, la utilización de modelos *in vivo*, no nos ha permitido determinar el grado de contribución de uno u otro mecanismo en el proceso de modulación del crecimiento tumoral. Ello nos condujo a la necesaria implementación de modelos *in vitro*, sobre los que se pudiera analizar la respuesta de las células tumorales frente a la administración particular de hormonas. El establecimiento de cultivos primarios representativos de las diferentes líneas tumorales y el estudio de la regulación hormonal de su crecimiento *in vitro*, constituyen los objetivos del presente trabajo.

M A T E R I A L E S Y M E T O D O S

EXPERIMENTOS IN VIVO

Animales:

En los experimentos se utilizaron ratones hembras de la cepa BALB/c, de dos meses de edad, criados en nuestro bioterio. Los ratones fueron mantenidos con agua y comida *ad libitum*, con doce horas de luz y de oscuridad.

Tumores utilizados:

Línea C4-HD: La línea C4-HD es un adenocarcinoma de mama de histología ductal. Este tumor, que se mantiene *in vivo* por pasajes singeneicos en hembras BALB/c tratadas con MPA, se originó en una hembra tratada durante 1 año con 40 mg de MPA administrado cada dos meses (Lanari y col., 1986). Se eligió esta línea entre otras por mantener casi constante su hormono-dependencia durante más de 6 años. En la línea C4-HD la administración de estrógenos a los animales portadores induce la regresión tumoral (Kordon y col., 1991).

La variable C4-HDR, surgida a partir de la línea parental C4-HD durante un experimento *in vivo* en el que se estudiaba la capacidad de los estrógenos de revertir el crecimiento tumoral (Kordon y col., 1991), adquirió la capacidad de crecer en presencia de estrógenos circulantes. Si bien su crecimiento no fue revertido por estrógenos (al contrario de lo observado en la línea parental) continuó siendo MPA-dependiente.

Los cultivos primarios de C4-HDR y de C4-HD fueron utilizados para estudiar los efectos de los progestágenos y estrógenos *in vitro*.

Línea 55-HI: Es una línea de adenocarcinomas mamarios surgida en el año 1989 en una hembra tratada con MPA. A diferencia de la mayoría de los tumores inducidos por MPA, este tumor presenta

histología lobulillar. Los tumores 55-HI mostraron un comportamiento autónomo (con crecimiento hormonoindependiente) en los primeros pasajes y perdieron rápidamente los receptores para estrógenos y progesterona.

Línea M3: Esta línea es un adenocarcinoma de mama murino (proveniente del Instituto Roffo), originado espontáneamente en una hembra múltipara BALB/c, que se mantiene mediante pasajes singeneicos.

Pasajes singeneicos de los tumores:

Los pasajes singeneicos se realizaron a través de trasplantes subcutáneos (sc) de trozos de tumor (1 a 3 mm³) en la zona inguinal derecha del animal, mediante trócar. En el mismo momento del pasaje tumoral, se inoculó a los animales con 0,2 ml (40 mg) de suspensión de microcristales de acetato de medroxiprogesterona de liberación lenta (MPA depot) (Medrosterona, Dr.Gador Laboratorio, Buenos Aires); el inóculo de MPA se realizó en forma subcutánea (sc), en el flanco izquierdo. La hormonodependencia de la línea se evaluó en cada pasaje, ya que el tumor fue también transplantado en hembras controles no tratadas con MPA, en las que el tumor no se desarrolló. Las mismas fueron descartadas tres meses luego del inóculo tumoral.

Evaluación de la tumorigenicidad y hormonodependencia *in vivo* de las células provenientes de cultivos primarios:

Las células provenientes de cultivos primarios de la línea C4-HD fueron inoculadas en ratones hembra BALB/c, con el objetivo de constatar su tumorigenicidad. Se inocularon sc 3 ratones tratados con MPA con: a) 40000 células adherentes provenientes de cultivos epiteliales, b) 10⁵ células adherentes provenientes de cultivos fibroblásticos, ó c) 10 a 20 colonias epiteliales provenientes de cultivos en agar blando. En los casos a) y b), las células fueron

inoculadas resuspendidas en 0,2ml de medio de cultivo; en el caso c) las colonias fueron inoculadas mediante trócar. Las células inoculadas fueron previamente mantenidas en cultivo 8 a 10 días, en medio de crecimiento; en el momento del primer subcultivo, parte de las mismas fue utilizada para los experimentos correspondientes (ver **Experimentos *in vitro***), y otra parte destinada a estos controles de tumorigenicidad. Los tumores obtenidos fueron transplantados luego en ratones tratados y no tratados con MPA, con el fin de evaluar su hormonodependencia.

Análisis estadístico: Las diferencias entre tamaños tumorales fueron evaluadas en cada fecha de medición mediante los tests t de Student o ANOVA, dependiendo del número de grupos.

Experimentos de cinética tumoral:

Para la realización de las curvas de cinética tumoral, tanto de tumores de las líneas parentales como de aquéllos originados a partir del inóculo de células en cultivo, 2 ratones hembra BALB/c tratados con MPA (0,2 mg depot) fueron inoculados sc con suspensiones de 10^5 células, en 0,2 ml de medio. Los tumores se midieron con calibre cada tres días (ancho y largo). Se consideró como día 0 al día del transplante. El tratamiento con MPA se realizó dos días antes, mediante la administración sc de 40 mg MPA depot en el flanco contralateral al implante tumoral. Cuando los tumores alcanzaron un tamaño aproximado de 100mm^2 , se implantó a la mitad de los animales un pellet de 5 mg de E_2 . Se utilizaron 8 animales por grupo, y los controles fueron hembras no tratadas con MPA y hembras ovariectomizadas.

Obtención de sueros de ratones ovariectomizados (Sovx):

Ratones hembra BALB/c de 2 meses de edad fueron

ovariectomizados, y una semana después, parte de ellos fueron tratados sc con 40 mg MPA depot. Luego de 7-8 días los animales fueron sangrados mediante punción retrorbital. Los sueros se conservaron a -20°C hasta su utilización.

Medición de receptores de estrógenos y progesterona de tumores por la técnica de precipitación con carbón dextrano:

Se implementó el método de precipitación con carbón dextrano descrito por Korenman y Dukes (1970), con algunas modificaciones (Calandra y col, 1980). Todos los pasos se realizaron a 0-4°C. Las muestras tumorales congeladas a -70°C fueron pesadas, y luego trituradas. Se agregó buffer A (compuesto por 20 mM Tris-HCl [pH 7,4], EDTA 1,5 mM, DTT 0,25 mM, molibdato de sodio 20 mM y glicerol 10% v/v) en proporción de 1:4 P/V. Las homogenizaciones se realizaron mediante Polytron Pt10 (Brikman Instruments Inc NY) con 3 pulsos de 15 segundos con intervalos de enfriamiento. El homogenato se centrifugó a 800 x g durante 15 minutos para remover las partículas grandes. El sobrenadante se centrifugó nuevamente a 105.000 x g durante 60 minutos. La fracción utilizada en los ensayos fue la fracción soluble del sobrenadante (citosol). Se tomaron alícuotas de 100 µl de citosol, por duplicado, y se incubaron con las respectivas hormonas marcadas y frías. Los receptores de estrógenos y de progesterona se evaluaron usando concentraciones de 30 nM de [³H]-E₂ o [³H]-R5020 respectivamente; para realizar los gráficos de Scatchard (Scatchard, 1949) se utilizaron una serie de concentraciones de [³H]-E₂ o [³H]-R5020 (0,2 a 30 nM). En ambos casos se incubó con y sin un exceso molar de 100 veces de DES o de R5020. La posible unión de E₂ y de R5020 a la globulina transportadora de hormonas sexuales (SHBG) o a proteínas relacionadas (como transcortina) se eliminó por adición de un exceso molar de 200 veces de DHT y cortisol, respectivamente. Luego de incubar durante toda la noche en frío, se detuvo la reacción con 100 µl de una suspensión de carbón-dextrano (a una concentración final de 0.025% en Buffer A). Los tubos fueron agitados e incubados

10 minutos a 4°C, luego de lo cual se centrifugaron a 6000 rpm durante 10 minutos para eliminar la hormona caliente no unida al receptor. Los resultados se expresaron en fentomoles por miligramo de proteína de citosol. Las proteínas se midieron por el método de Lowry (Lowry, 1951). El número de fentomoles (Bmax) y las constantes de afinidad (K_d) fueron determinadas luego de la linearización de los datos por el método de Scatchard, calculando las pendientes mediante el análisis de regresión lineal (Davies, 1972).

Análisis estadístico: Los datos fueron analizados mediante tests de ANOVA y *t* de Tukey, o *t* de Student en los casos de dos muestras. Se consideraron sólo aquellos datos en los cuales las diferencias de cpm obtenidas entre los grupos experimental y control ("cpm totales" vs "cpm no específicas") fueron significativas con un $p < 0,05$.

EXPERIMENTOS IN VITRO

Establecimiento de cultivos primarios a partir de los tumores:

a. Medios y soluciones utilizadas.

Medio de cultivo: Se utilizó DMEM/F12 (1:1) (Gibco BRL), sin rojo fenol.

Medio básico: DMEM/F12 + 1% Antibiótico_Antimicótico (Gibco BRL) + 5% Suero Fetal Bovino (Gibco BRL) adsorbido previamente con carbón (SFBch).

SFB adsorbido con carbón dextrano: Se obtuvo mediante incubación del SFB (Gibco BRL) con 5% carbón activado (Merck) durante 24 horas a 4°C con agitación permanente. Luego de la adsorción, el suero fue centrifugado 5 a 6 veces durante 20 minutos a 10.000 rpm hasta la eliminación completa del carbón. Una vez disuelto en el medio se esterilizó por filtración (0.22 μ).

Solución enzimática: Tripsina (Gibco BRL) 0,25% + Colagenasa Tipo II (Sigma) 0,25% + albúmina sérica bovina (BSA) 0,5%, disuelta en PBS.

Solución de tripsina: Tripsina (Gibco BRL) 0,25%, disuelta en PBS.

Solución de Tripsina-EDTA: Tripsina (Gibco BRL) 0,05% + EDTA (Sigma) 0,02%, disuelta en PBS.

b. Hormonas utilizadas.

Los reactivos para uso en cultivo de tejidos 17 β -estradiol (E₂), Pg, MPA, dihidrotestosterona (DHT) y dexametasona fueron obtenidos de Sigma Co. El RU486 fue gentilmente cedido por el Dr. Deis de Mendoza y la hidroxiflutamida (OHF) por la Dra. Isabel Luthy.

La adición de hormonas a los cultivos se realizó a partir de

soluciones stock concentradas 1.000 a 10.000 veces en etanol redestilado. La concentración final de etanol no excedió el 0,12% v/v en cada pozo, y no afectó significativamente el crecimiento ni la morfología celulares.

c. Cultivos primarios mixtos.

Se extirparon estérilmente tumores de 50 a 100 mm², obtenidos aproximadamente a los 15 días del trasplante. Se lavaron en medio conteniendo 5% de antibiótico-antimicótico y se cortaron en trozos de 3-4 mm³. Se incubaron en solución enzimática a 37°C con agitación permanente, durante 20 minutos. Se recogió el sobrenadante y se resuspendió en 20 ml de medio básico. Los trozos de tumor restantes se incubaron durante 20 minutos adicionales con solución enzimática y la suspensión resultante se unió a la anterior. La suspensión conteniendo las células disgregadas fue resuspendida en medio fresco y centrifugada a 200 x g durante 10 minutos 2 veces; el pellet fue resuspendido en medio básico y sembrado en frascos de cultivo de 25 cm² (Falcon). Las células se incubaron en incubadora gaseada (5% CO₂) a 37°C, durante aproximadamente 7 a 10 días. Luego de las primeras 24 a 48 horas de cultivo en medio básico para permitir la adhesión de las células al sustrato, el mismo fue reemplazado por medio básico + MPA 10⁻⁹M (medio de crecimiento). El medio de crecimiento fue reemplazado por medio fresco cada 48 horas. El primer subcultivo de estos cultivos primarios fue utilizado en los diferentes ensayos. Para ésto, los cultivos primarios fueron tripsinizados y resembrados en microplacas de 96 pozos (ensayos de proliferación), multiplacas de 24 pozos (determinación de receptores), *culture slides* (autorradiografía), o placas de Petri de 35mm (cultivos en agar). En todos los experimentos, las hormonas o antagonistas ensayados fueron administrados al medio al cabo de 48 horas de cultivo en medio básico (en ausencia de hormonas).

d. Cultivos primarios enriquecidos en células epiteliales o en fibroblastos.

Las suspensiones celulares obtenidas mediante el protocolo anterior se hallaron compuestas por dos poblaciones celulares, una de estirpe epitelial y otra de estirpe fibroblástica; para la separación de ambas poblaciones se empleó la técnica descrita por Pandis y col. (1992) con algunas modificaciones. Luego de la disociación enzimática del tumor, el tejido disgregado se transfirió a dos tubos de centrífuga, se adicionaron 10 ml de medio básico a cada tubo y se centrifugaron a 200 x g durante 10 minutos. El sobrenadante se descartó y se unieron ambos pellets en 5-10 ml de medio básico. La suspensión se dejó sedimentar por 15-20 minutos. Las células sedimentadas constituyen la fracción enriquecida en agregados (*clusters*) epiteliales y las que quedaron en el sobrenadante, la fracción fibroblástica. Una vez separadas ambas fracciones en 2 tubos Falcon de 50 ml, se repitió el procedimiento de sedimentación un alto número de veces, hasta que prácticamente no hubo células en el sobrenadante correspondiente a la fracción epitelial, momento en el que se puede considerar que se han separado exitosamente ambas poblaciones. Cada una de las fracciones fue luego sembrada independientemente en frascos de cultivo.

Los cultivos enriquecidos en fibroblastos se realizaron sembrando la fracción fibroblástica en medio de cultivo suplementado con 10% de SFB. Luego de 2 horas de incubación se descartó la población no adherente. Los cambios de medio se realizaron cada 48 horas. Los cultivos fibroblásticos en estadio de semiconfluencia (obtenidos a los 5-10 días a partir de la siembra), fueron tripsinizados con solución de tripsina, y los subcultivos, utilizados para los diferentes ensayos.

Para la obtención de cultivos enriquecidos en células epiteliales, la fracción conteniendo los *clusters* de células epiteliales fueron sembradas en 5 ml de medio básico; se permitió la adherencia de los agregados celulares al sustrato por 24 a 48 horas, luego de las cuales se recogió cuidadosamente el

sobrenadante y se agregaron 5 ml de medio de crecimiento (medio básico + MPA 10^{-9} M). Este último sobrenadante, conteniendo aún agregados celulares que no se adhirieron, fue trasvasado a otro frasco de cultivo. Los cultivos resultantes se hallaron compuestos casi exclusivamente por células epiteliales. El medio fue reemplazado por medio de crecimiento fresco cada 48 horas, y al cabo de 7 a 10 días, cuando las islas epiteliales estuvieron superpobladas, se realizó el subcultivo. Para ello, los cultivos fueron tripsinizados con solución de tripsina-EDTA; con el fin de eliminar los pocos fibroblastos contaminantes, se descartó lo despegado en los primeros 5 minutos y sólo se utilizó para los experimentos correspondientes el producto de las siguientes tripsinizaciones.

Ensayos de proliferación por incorporación de timidina tritiada:

Los cultivos, tanto mixtos como enriquecidos en células epiteliales o fibroblásticas, fueron cosechados, lavados y resuspendidos en medio básico, a una densidad final aproximada de 10^5 células/ml. Las células se subcultivaron en microplacas de 96 pozos (Falcon), y se incubaron en medio básico durante 24 a 48 horas para permitir la adhesión al sustrato. Luego el medio fue reemplazado por medio fresco conteniendo las concentraciones indicadas de hormonas esteroideas y/o antagonistas cuyo efecto se quiso investigar (**medios prueba**). Los ensayos se realizaron en general por octuplicados, salvo en los casos especificados en cada tabla. Las células fueron incubadas durante 48 horas con los tratamientos correspondientes, reemplazándose los medios prueba cada día. En las últimas 18 horas de incubación se aplicó un pulso de 3 H-Timidina (Dupont, Boston, MA, actividad específica 1 uCi/ml, 20 Ci/mmol). Luego los cultivos fueron tripsinizados y cosechados y la radioactividad incorporada fue medida en un contador de centelleo líquido.

Comparando las cpm de los grupos experimentales vs cpm del

control (células creciendo en medio básico) se calcularon índices de proliferación (IP: cpm exp/cpm control).

Análisis estadístico: En cada experimento individual, los niveles de significación estadística fueron calculados comparando las cpm de cada grupo experimental ($X \pm DS$) respecto de las cpm arrojadas por los controles. Se utilizaron los tests de ANOVA y de Dunnet para comparar los grados de significación de cada grupo experimental; en cada tabla o gráfico se marcan con asteriscos los grupos cuyas diferencias entre cpm exp y control fueron significativas (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$). El análisis utilizado para comparar grupos experimentales entre sí fue el test de t de Tukey; en los casos en los que grupos experimentales presentaron diferencias significativas entre sí, ésto fue aclarado al pie de página.

Cultivos en medio semisólido:

Para la preparación de los cultivos medio semisólido (agar blando), se utilizó el protocolo de Manni y Wright (1983), con leves modificaciones. La solución correspondiente a la capa inferior consistió en medio Mc Coy, suero de caballo (HS) 5%, SFB 10%, piruvato de sodio 0,22 mg/ml, L-serina 42 $\mu\text{g/ml}$, glutamina 2,9 $\mu\text{g/ml}$, bicarbonato de sodio 4,5 mg/ml, penicilina 100 U/ml, estreptomycin 100 $\mu\text{g/ml}$, asparagina 100 Mg/ml, DEAE-Dextrán 375 $\mu\text{g/ml}$, tryptic soy broth 7,5 mg/ml y agar 3% (concentración final 0,5%). La solución de la capa superior consistió en medio CMRL, HS 15%, cloruro de calcio 444 $\mu\text{g/ml}$, insulina porcina 2 U/ml, ácido ascórbico 53 $\mu\text{g/ml}$, penicilina 100 U/ml, estreptomycin 100 $\mu\text{g/ml}$, DEAE-Dextrán 250 $\mu\text{g/ml}$, mercaptoetanol 0,4 $\mu\text{g/ml}$, asparagina 66 $\mu\text{g/ml}$ y agar 3% (concentración final 0,6%).

Se colocó 1 ml de solución correspondiente a la *capa inferior* por cápsula de cultivo de 35mm (Falcon), se dejó solidificar, y se agregó 1 ml formado por 0,5 ml de solución de *capa superior* más 0,5 ml de suspensión celular, a una densidad final de 160.000 a 350.000

células viables por cápsula. La suspensión celular utilizada provino de cultivos primarios mixtos de C4-HD. En los casos especificados, se adicionó 10^{-9} M de MPA y/o E_2 a ambas capas. Las cápsulas fueron luego incubadas en cámara húmeda, dentro de una incubadora gaseada (5% CO_2) a 37°C. Los cultivos se evaluaron diariamente bajo microscopio invertido, y mediante fotografías.

Autorradiografía:

Para los ensayos de autorradiografía se utilizaron subcultivos provenientes de cultivos primarios derivados de C4-HD. La suspensión celular, conteniendo una densidad final de 10^4 células por ml, fue sembrada en cámaras de cultivo cuyo fondo es un portaobjetos (*culture slides*), e incubada en medio básico durante 24 a 48 horas para permitir la adhesión de las células al sustrato, en incubadora gaseada. El medio fue luego reemplazado por medio fresco conteniendo las concentraciones indicadas de MPA, Pg o E_2 . Se continuó la incubación en estas condiciones durante 72 horas más. Luego de la aplicación de un pulso de 1 hora de 10uCi/ml 3H -timidina, las células fueron lavadas 3 veces en PBS pH 7,4, 10 minutos cada enjuague, a 4°C, y procesadas para la marcación inmunocitoquímica utilizando anticuerpos anti-citoqueratina. Los portaobjetos fueron posteriormente sumergidos en emulsión Kodak NTB-2 Nuclear Track (Eastman Kodak Co., Rochester, NY) y expuestos durante 25 días a 4°C. El revelado se realizó con Kodak D-19 (Eastman Kodak Co.). Se colorearon los núcleos con Hematoxilina de Harris por 2 minutos, se deshidrató y se montó en Permount (Fisher Scientific Co., Fair Lawn, NJ). Para la evaluación del TLI, se contaron 1500 a 14000 células por campo bajo microscopio óptico (1000x); las células con más de 7 granos en su núcleo y un fondo de no más de 2 granos por área similar fueron consideradas positivas.

Análisis estadístico: Los resultados fueron evaluados estadísticamente siguiendo el mismo procedimiento que el utilizado para datos de proliferación por incorporación de timidina tritiada.

Estudios inmunocitoquímicos:

Los cultivos se enjuagaron con PBS y se fijaron inmediatamente en alcohol absoluto durante 1 hora a 4°C. Luego de lavar en PBS por 6 minutos, se transfirieron a metanol (4 minutos), acetona (2 minutos) y PBS (5 minutos).

a. Técnica de extravidina-peroxidasa.

i. Inhibición de la peroxidasa endógena: Se cubrió el portaobjetos con una solución 0,1-1% de H₂O₂ en metanol, durante 15 minutos. Se efectuaron 3 lavados con PBS fresco de 3-5 minutos cada uno.

ii. Bloqueo con suero normal: Se cubrió el portaobjetos con una solución 1-2% (v/v) de suero normal durante 15 minutos y sin lavar se continuó con el siguiente paso.

iii. Incubación con el antisuero específico: Los portaobjetos fueron incubados con una solución de antisuero específico 1:30 en PBS durante 18 horas a 4°C.

iv. Lavados: Luego de terminada la incubación con el primer antisuero, los portaobjetos fueron lavados cuidadosamente 3 veces con PBS neutro 1x.

v. Incubación con el segundo antisuero: Los portaobjetos fueron incubados con una solución 1:100 en PBS de ac anti-Ig de ratón, conjugados con peroxidasa (Px) durante 30 minutos a temperatura ambiente.

vi. Lavados

vii. Incubación con Extravidina-Peroxidasa (Px): Se incubó con una solución de Extravidina_Px 1:100 en PBS, durante 30 minutos a temperatura ambiente.

viii. Revelado de la actividad Px: Se cubrieron los portaobjetos con una solución 0,06% (60mg%) de diaminobenzidina (DAB) en PBS más H₂O₂ a una concentración final de 0,1%, preparada en el momento del ensayo. Se controló la reacción bajo microscopio. La misma fue detenida

removiendo la DBA del portaobjetos y sumergiéndolo en PBS.

ix. Lavados

x. Coloración de contraste y montado: Los preparados fueron coloreados con hematoxilina durante 1-2 minutos, lavados en agua destilada, sumergidos por 15-30 segundos en alcohol ácido y sumergidos 20 minutos en agua corriente. La deshidratación se realizó mediante alcoholes de graduación creciente (96° y absoluto); los portaobjetos fueron luego sumergidos en tolueno o xileno y montados.

b. Anticuerpos utilizados.

i. Monoclonales:

- . IgG-1 anti-receptor de progesterona obtenido en ratón (Affinity BioReagents)*
- . IgG-1 anti-receptor de estrógenos obtenido en ratón (Affinity BioReagents)*
- . Anti-Citoqueratina (CK) (Dako)
- . Anti-Vimentina (V) (Dako)

ii. Policlonales:

- . anti-receptor de andrógenos obtenido en conejo (Affinity BioReagents)**
- . anti-receptor de glucocorticoides obtenido en conejo (Affinity BioReagents)**

* : De acuerdo con las especificaciones del producto comercial, estos anticuerpos serían reactivos sobre tejidos humanos, de cabra, de rata y murinos. ** : Reactivos sobre tejidos de primates, rata y murinos.

Determinación del contenido de receptores de células en cultivo por el ensayo de célula entera:

Para la realización de estos ensayos se utilizaron subcultivos provenientes de cultivos primarios enriquecidos en células epiteliales o fibroblastos. Las células fueron sembradas en multiplacas de 24 hoyos (Falcon) a una densidad de 10^4 células/pozo, y cultivadas en medio de crecimiento durante 5 a 7 días, al cabo de los cuales fueron procesadas para los estudios de receptores hormonales. Se lavó cada hoyo con 1ml de PBS, y se incubó en incubadora gaseada durante 1 hora con medio de cultivo sin SFB. Luego el medio fue reemplazado por medio fresco conteniendo los siguientes reactivos:

Para la determinación de RE, se incubó con 300.000 cpm de 2,4,6,7- ^3H -E₂ (85 Ci/mmol), más un exceso de 100 veces DHT fría (para el cálculo de cpm totales) o DES+DHT (para el cálculo de cpm no específicas).

Para la determinación de RP, se incubó con 300.000 cpm ^3H -R5020 (85 Ci/mmol) más un exceso de 100 veces cortisol frío (cpm totales) o R5020+cortisol (cpm no específicas).

Luego de 2 horas de incubación, las células fueron lavadas con PBS, tripsinizadas, y la radioactividad fue medida en contador de centelleo líquido. La unión específica al receptor se obtuvo de la diferencia entre las cpm totales y las cpm no específicas. Los resultados se expresaron como fentomoles/N° de células o por mg de proteína.

Determinación del contenido de receptores de células en cultivo por el método de precipitación con carbón-dextrano:

Cultivos enriquecidos en células epiteliales o fibroblásticas fueron tripsinizados y las células resuspendidas en medio con 5% SFB. Luego de centrifugar, 5×10^6 células fueron resuspendidas en 1ml de agua bidestilada fría. La elección del tratamiento hipotónico resultó de ensayos previos en los que evaluamos diferentes

soluciones hipotónicas (Sumida, 1989), de las que sólo el agua bidestilada mostró la capacidad de producir la lisis de las células epiteliales de nuestro sistema. Las suspensiones fueron homogenizadas repetidas veces durante 15 segundos con intervalos para permitir el enfriamiento por un período total de 10 minutos; se agregó luego igual volumen de Buffer A concentrado 2 veces. Se obtuvo la fracción citosólica y se continuó con los pasos descritos para la medición de receptores esteroideos en tumores.

R E S U L T A D O S

I. ESTUDIOS *in vivo*

1. Cinética de crecimiento de las líneas tumorales inducidas por MPA.

La línea tumoral C4-HD deriva de un carcinoma ductal inducido por MPA, y ha sido mantenida en el laboratorio mediante trasplantes *in vivo* desde hace más de 6 años. La línea conserva todas las características de hormonodependencia originales, y retrograda con el tratamiento estrogénico (Kordon, 1991), pese a lo cual se pudo seleccionar la sublínea C4-HDR, que no responde a estrogénos (Kordon, 1991). En la Figura 1 se observa la cinética de crecimiento tumoral de las líneas de C4-HD y de C4-HDR. Los tumores sólo crecieron en hembras tratadas con MPA. En efecto, durante el período de seguimiento (60 días), no se observó crecimiento tumoral en ausencia de tratamiento con MPA, tanto en hembras enteras u ovariectomizadas. En coincidencia con las descripciones originales, ambas líneas presentaron un crecimiento exponencial cuando se administró como único tratamiento MPA. Al alcanzar los tumores un tamaño aproximado de 100 mm² se implantó a la mitad de los ratones un pellet de 0,5 mg de E₂. Luego del inóculo de E₂, los tumores de la línea resistente C4-HDR continuaron creciendo y los sensibles a E₂ (C4-HD) regresionaron hasta desaparecer alrededor del día 50.

La línea tumoral 55-HI, inducida por MPA, también fue utilizada en experimentos *in vitro*. Su cinética de crecimiento *in vivo* (Figura 2) fue evaluada en hembras BALB/c, tratadas y no tratadas con MPA. Como se observa en la figura, la línea 55-HI presenta un crecimiento autónomo, independiente de la presencia de hormona.

Durante el período de desarrollo de la presente Tesis, la cinética de crecimiento de ambas líneas tumorales fue analizada en reiteradas ocasiones, en forma paralela a la realización de los experimentos *in vitro*, con el objetivo de constatar que los tumores utilizados para los cultivos conservaran las características de crecimiento originales.

2. Descripción morfológica de los tumores utilizados.

En la **Figura 3A** se muestran las características morfológicas de un tumor ductal primitivo. Este tumor está constituido por masas sólidas de células glandulares neoplásicas que experimentan diferenciación glandular en forma de estructuras cribiformes. De esta masa se desprenden grupos más pequeños que infiltran los tejidos adyacentes. El estroma es fibroblástico y presenta infiltración linfocitaria e histiocitaria. Los elementos celulares que constituyen la lesión son células de características epiteliales, poligonales, de citoplasma amplio frecuentemente vacuolado. Los núcleos son leptocromáticos y presentan un nucleolo evidente y uno o más cromocentros. Se observa aproximadamente 1 mitosis por campo de mayor aumento. En las áreas en las que se preserva parte de la glándula mamaria original, se pueden observar lesiones de carcinoma ductal *in situ*, caracterizadas por la presencia de papilas atípicas intraductales o de conductos tapizados por epitelio cilíndrico atípico. Las líneas tumorales C4-HD y C4-HDR presentan este tipo histológico.

En la **Figura 3B** se observa la histología de un tumor lobulillar. El mismo está compuesto por células atípicas redondas o poligonales, con un alto índice mitótico, que forman masas infiltrantes sólidas o con pequeñas estructuras glandulares uniformes (carcinoma tubular). El estroma es escaso. En otras áreas se observa hiperlasia atípica lobulillar. Los tumores de la línea 55-HI corresponden a este segundo grupo.

3. Caracterización de receptores esteroideos en tumores de la línea C4-HD.

La línea tumoral C4-HD utilizada para el establecimiento de los cultivos primarios, es representativa de los tumores ductales inducidos por MPA los cuales, como se mencionó anteriormente, expresan receptores esteroideos. Con el objetivo de caracterizar

los RP y RE presentes en dicha línea, se realizaron experimentos empleando hormonas marcadas. En la **Figura 4** se muestra un ejemplo representativo de los análisis de Scatchard realizados sobre tumores C4-HD; se obtuvieron mediante estos estudios valores promedio de Kd de 2.3 ± 1 nM y 9.4 ± 3.7 nM, con un número de receptores de 258 ± 67 y 719 ± 289 fentomoles/mg proteína, para RE y RP respectivamente.

II. ESTUDIOS *in vitro*

1. Establecimiento del cultivo primario.

Son conocidas las dificultades inherentes al establecimiento de cultivos primarios en general y los problemas específicos del desarrollo de cultivos provenientes de tumores malignos epiteliales hormonodependientes. Teniendo en cuenta ésto, a fines de establecer cultivos primarios a partir de los adenocarcinomas de mama inducidos *in vivo* por MPA, se evaluó el impacto de diversas variables, las que fueron analizadas en forma particular.

1-a. Métodos de disociación y disgregación de la masa tumoral.

En un primer grupo de experimentos se analizó la capacidad de métodos mecánicos, así como de diversas enzimas proteolíticas, para producir una disgregación efectiva del tumor, la cual permitiera a la vez obtener una alta viabilidad celular y una adecuada adhesividad de las células al sustrato. La recuperación celular fue posteriormente evaluada en forma cualitativa. La Tabla 1 resume los resultados obtenidos en numerosos experimentos, mostrando los distintos protocolos utilizados; el éxito de cada uno de ellos fue evaluado por el rendimiento celular alcanzado, el grado de adhesión al sustrato y el crecimiento de los cultivos. El protocolo de elección fue el F.

1-b. Efecto de la presencia de MPA

Los trabajos previos desarrollados en nuestro laboratorio indicaron que, más allá de su papel inductor, el MPA incrementaba el crecimiento *in vivo* de las líneas de los tumores de mama utilizados en el presente trabajo. Teniendo en cuenta ésto, en el período de optimización de las condiciones de crecimiento *in vitro*, evaluamos la viabilidad de los cultivos primarios en presencia y ausencia de concentraciones nanomolares de MPA. Los resultados indicaron que la hormonodependencia observada en relación al

crecimiento *in vivo* de las líneas C4-HD y C4-HDR, fue también observada en estas experiencias preliminares, llevadas a cabo con el objeto de establecer los cultivos primarios derivados de dichas líneas. En efecto, en ausencia de MPA, los niveles de recuperación celular a partir de los dichos cultivos fueron, en todos los casos, insuficientes a los efectos de lograr el número mínimo de células tumorales necesario para la realización de los experimentos.

1-c. Selección del medio de cultivo apropiado.

Dado que el rojo fenol presenta actividad estrogénica (Hissom, 1989), y que la administración de estrógenos produce la remisión de nuestros tumores *in vivo* (Kordon, 1991), ensayamos la capacidad de diversos medios de cultivo sin rojo fenol, de sostener el crecimiento adecuado de los cultivos primarios. El medio de cultivo de elección fue el DMEM/F12, habitualmente utilizado en cultivos de glándula mamaria (Enami, 1987), resultando superior al DMEM y al RPMI 1640.

1-d. Selección de las concentraciones adecuadas de suero fetal bovino.

El SFB es rico en hormonas esteroides, particularmente estrógenos (Honn, 1975). Teniendo en cuenta ésto se utilizó, como suplemento del medio de cultivo, SFB previamente adsorbido con carbón (SFB "charcolizado" -SFBch-). Este procedimiento, detallado en **Materiales y Métodos**, permite deplecionar selectivamente el suero de diversos compuestos de bajo peso molecular, los que incluyen a las hormonas esteroideas (Clarke, 1990). Las condiciones óptimas de crecimiento se lograron con un 5% de SFB adsorbido con carbón.

Teniendo en cuenta los resultados mencionados en los puntos 1-a, b, c y d, a fin de establecer los cultivos primarios, las células provenientes de la disgregación enzimática de los tumores fueron cultivadas en medio DMEM/F12 sin rojo fenol, suplementado con 5% de SFBch y 1nM de MPA.

2. Morfología de los cultivos primarios.

Los cultivos primarios obtenidos fueron, en todos los casos, cultivos **mixtos** compuestos por dos poblaciones celulares, una de estirpe epitelial [citoqueratina (+), vimentina (-)], y otra fibroblástica [citokeratina (-), vimentina (+)]. Morfológicamente, se observaron agregados celulares (organoides), constituidos por un centro epitelial rodeado por células fibroblásticas (Figura 5). Las células epiteliales se adhirieron formando pequeñas islas, proliferando luego en forma de agregados que se fueron independizando del sustrato. Las células fibroblásticas crecieron formando monocapas típicas, cubriendo la superficie libre. La morfología y forma de crecimiento que presentan los dos tipos celulares en cultivo sugiere que las células transformadas del sistema serían las epiteliales, mientras que los fibroblastos expresarían un fenotipo no tumoral.

3. Proliferación inducida por MPA sobre cultivos de las líneas C4-HD y C4-HDR.

El objetivo central del presente trabajo fue evaluar los mecanismos involucrados en la regulación hormonal del crecimiento de adenocarcinomas mamarios, a través del empleo de cultivos primarios de C4-HD y C4-HDR, establecidos de acuerdo a lo descrito en el punto 1. Las experiencias que se describen a continuación, fueron desarrolladas en subcultivos provenientes de dichos cultivos primarios. A tal efecto, los cultivos primarios fueron tripsinizados, cultivándose las células recuperadas en ausencia de MPA por espacio de 48 horas. Posteriormente, se evaluó la respuesta proliferativa inducida por diferentes tratamientos. Se evaluó, en primer término, las condiciones en las que la estimulación por MPA se hacía evidente, a fin de estudiar los mecanismos involucrados en dicho fenómeno.

3-a. Tiempo de incubación con MPA

En un primer grupo de experimentos se analizó el tiempo de incubación con MPA requerido para la observación de efectos sobre la proliferación celular. Para ello, células provenientes de cultivos primarios de C4-HD fueron incubadas con MPA 1nM, en medio suplementado con 5% de SFBch, durante diferentes períodos de tiempo, evaluándose luego la proliferación celular mediante incorporación de ^3H -timidina. Los resultados obtenidos (Figura 6) muestran que el MPA induce un aumento significativo en la incorporación de ^3H -timidina a las 48 ($p < 0,01$) y a las 72 ($p < 0,05$) horas de incubación, no observándose ningún efecto con 24 horas de incubación.

3-b. Concentración de SFBch

Con el objeto de determinar la concentración de SFBch que brindaba las condiciones óptimas para el análisis del efecto proliferativo inducido por MPA, se analizó el efecto del MPA sobre la proliferación celular de células derivadas de C4-HD, evaluada en medio suplementado con diferentes concentraciones de SFBch (1, 5, 10 y 20%). Los niveles de proliferación fueron determinados a través de la incorporación de ^3H -timidina, luego de 48 horas de incubación con MPA. Los resultados obtenidos (Figura 7) indican que es posible detectar una estimulación significativa de la proliferación celular inducida por MPA en presencia de 1 y 5 % de SFBch ($p < 0,05$). La concentración de elección fue 5% SFBch, ya que permitió observar efectos estimulatorios permitiendo, además, investigar potenciales efectos inhibitorios. Es importante destacar, por otra parte, que las diferencias de incorporación de ^3H -timidina entre los controles incubados con 1 y 20 % de SFBch, en ausencia de MPA, fueron estadísticamente significativas ($p < 0,001$). Esto sugeriría la existencia de factores presentes en el SFB, no eliminados a través del procedimiento de adsorción del mismo, capaces de estimular la proliferación celular.

3-c. Cuantificación de la proliferación celular por recuento microscópico.

Con el propósito de evaluar en nuestro sistema si la incorporación de ^3H -timidina era indicativa de proliferación celular, se realizaron cultivos de células provenientes de la línea C4-HD en multiplacas de 24 pozos, en medio básico con o sin el agregado de 1nM de MPA. Luego de 72 horas de incubación, la proliferación celular fue estimada a través del recuento de células en cámara de Neubauer. Los resultados (Tabla 2), demuestran que el incremento en los niveles de incorporación de ^3H -timidina observado a las 48 hs de incubación con MPA, muestra correlación con el incremento en el número de células ($p < 0,05$) estimado por recuento microscópico.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los puntos 3-a, b y c, en los experimentos que se describen a continuación los cultivos celulares fueron desarrollados en medio suplementado con 5% de SFBch, evaluándose la respuesta proliferativa a través de la incorporación de ^3H -timidina, luego de 48 horas de tratamiento hormonal.

4. Efecto de diferentes concentraciones de MPA sobre la proliferación de cultivos provenientes de las líneas C4-HD y C4-HDR.

Con el objetivo de determinar las concentraciones de MPA en la cuales éste era capaz de inducir la proliferación de las células tumorales *in vitro*, se analizó la respuesta proliferativa en subcultivos incubados con MPA en un rango de concentraciones de 10^{-12} a 10^{-6}M . En la Tablas 3 y 4, se observan los resultados obtenidos en tres experimentos representativos correspondiente a las líneas C4-HD y C4-HDR, respectivamente. Los resultados mostrados en las Figuras 8 y 9, por otra parte, son expresados como

índices de proliferación (IP), representando el promedio de las razones entre las cpm obtenidas para cada tratamiento y las cpm obtenidas para células no tratadas (control-SFBch-), correspondientes a una serie de experimentos diferentes. Los resultados obtenidos indican la capacidad del MPA de estimular significativamente la proliferación de las células derivadas de la línea C4-HD, en concentraciones de 10^{-7} a 10^{-9} M. En relación a las células derivadas de la línea C4-HDR, se observó estimulación significativa con MPA 10^{-8} y 10^{-9} M.

Estos resultados demuestran que el MPA es capaz de estimular el crecimiento *in vitro* de ambas líneas tumorales en concentraciones similares al Kd del RP, y superiores al mismo.

5. Efecto del E_2 sobre la proliferación inducida por MPA.

El E_2 ejerce *in vivo* un efecto inhibitorio del crecimiento inducido por progestágenos en tumores C4-HD, aún en presencia de MPA, mientras que no lo altera en tumores C4-HDR. Investigamos si la acción del E_2 se evidenciaba también sobre células en cultivo. Con este objetivo se evaluó el efecto del E_2 10^{-9} y 10^{-7} M sobre la proliferación celular en cultivos provenientes de las líneas tumorales C4-HDR y C4-HD, tratados o no con MPA. Los resultados obtenidos para la línea C4-HD (Figura 10) muestran que el E_2 , en ambas concentraciones utilizadas, revirtió la estimulación inducida por MPA, sin afectar los niveles basales de proliferación. Por el contrario, los resultados obtenidos para la línea C4-HDR (Figura 11) indican que la administración de E_2 10^{-9} M ó 10^{-7} M fue incapaz de revertir la estimulación producida por MPA. No obstante, sobre esta última línea, el E_2 10^{-7} M produjo una inhibición significativa en los niveles basales de proliferación. Tal como se muestra en la Figura 12, la reversión producida por el E_2 10^{-9} M sobre la estimulación inducida por MPA en células derivadas de C4-HD requiere, al menos, de 48 horas de incubación con las hormonas.

El conjunto de estos resultados sugiere que los cultivos primarios establecidos a partir de las líneas tumorales C4-HD y C4-HDR se comportan en forma similar a los tumores parentales *in vivo*, en cuanto a su respuesta al MPA y a los estrógenos. Mientras que el MPA induce el crecimiento en los cultivos derivados de ambas líneas tumorales, los estrógenos poseen la capacidad de revertir el efecto estimulador del MPA en los cultivos derivados de C4-HD, tanto a concentraciones equimolares como a concentraciones dos órdenes menores. Los estrógenos, por otro lado, no afectan la acción del MPA sobre cultivos derivados de C4-HDR.

6. Determinación de la población celular "blanco" de MPA.

Tal como se ha descrito en el punto 2, los cultivos primarios se hallaron compuestos por dos poblaciones celulares, de estirpe epitelial y fibroblastoide, respectivamente. Con el objeto de determinar la naturaleza de la población celular "blanco" de la acción del MPA, se realizaron 3 ensayos diferentes.

6-a. Cultivos en medio semisólido.

Se realizaron cultivos en agar blando a partir de cultivos mixtos de C4-HD. Se observó crecimiento en las colonias luego de 3 días de incubación (Figura 13). Las células recuperadas a partir de los agregados mostraron por inmunocitoquímica su naturaleza epitelial, y al ser reinoculadas en animales BALB/c tratados con MPA, desarrollaron tumores con una cinética de crecimiento *in vivo* e histología similares a las expresadas por los tumores parentales (Figura 1 y 3A). Los fibroblastos, por su parte, crecieron formando una típica monocapa adherida al sustrato, por fuera de la matriz del agar. Dado que en medio de cultivo semisólido sólo las células transformadas son capaces de proliferar (Freshney, 1992), los resultados mencionados indicarían la naturaleza neoplásica de la población epitelial y la no neoplásica de la fibroblastoide.

Se realizaron, además, cultivos en agar en presencia de MPA

y/o E₂. A este respecto, es importante destacar que las células epiteliales recuperadas a partir de los cultivos primarios se encuentran siempre en forma de agregados, los que no pueden ser disociados sin afectar la viabilidad celular. Esta forma característica de crecimiento, impidió la cuantificación de la proliferación celular en los subcultivos realizados en agar, a través del recuento de colonias. Por lo tanto, las diferencias observadas entre aquellos cultivos realizados en presencia o ausencia de MPA y/o E₂, no pudieron ser cuantificadas.

6-b. Cultivos enriquecidos en células epiteliales o fibroblásticas.

En un segundo grupo de experimentos, empleamos técnicas de sedimentación diferencial, aplicadas a las suspensiones celulares provenientes de la disociación del tumor, procediéndose luego de establecidos los cultivos, a la tripsinización diferencial de los mismos (ver en la sección **Materiales y Métodos**). Este procedimiento secuencial permitió obtener cultivos altamente enriquecidos en células de estirpe epitelial o fibroblástica, caracterizados por técnicas inmunohistoquímicas. La morfología de los cultivos enriquecidos en células epiteliales y fibroblastos se muestra en las **Figura 14** y **Figura 15**, respectivamente.

En ambos tipos de cultivos obtenidos a partir de tumores de la línea C4-HD se analizó, en forma similar a lo realizado para cultivos mixtos (**Figuras 7 y 8**), la acción de diferentes concentraciones de MPA. Los resultados obtenidos, indican que el MPA indujo una marcada estimulación de la proliferación de células epiteliales (**Tabla 5**), en un rango de concentraciones de 10^{-12} a 10^{-7} M, la que fue estadísticamente significativa ($p < 0,05$ y $0,01$) en el análisis de cada experimento individual. Por el contrario, no modificó la respuesta proliferativa de los cultivos enriquecidos en fibroblastos (**Tablas 6**). En la **Figura 16** se grafican los índices de proliferación promedio para la totalidad de experimentos realizados.

6-c. Técnicas autorradiográficas combinadas con inmunohistoquímica.

Con el objeto de confirmar la identidad de las células epiteliales como "blanco" de la acción estimuladora del MPA, se desarrolló un protocolo combinando técnicas autorradiográficas, las que permiten visualizar la timidina incorporada al núcleo, con marcación inmunohistoquímica para células epiteliales (citoqueratina-CK-). Este protocolo permite caracterizar la estirpe de las células que proliferan. En la Figura 17 se observan, a 2 aumentos diferentes, los organoides epiteliales (CK+) mostrando células cuyos núcleos presentan un puntillado negro debido a la incorporación de ^3H -timidina. En la periferia, se observan fibroblastos (CK-) algunos de los cuales presentan también núcleos marcados.

Las células fueron tratadas con MPA 10^{-11} , 10^{-9} y 10^{-8}M y con E_2 10^{-9} y 10^{-7}M . Los datos obtenidos (Tabla 7 y Figura 18) se expresan como índice de proliferación (IP) de células epiteliales, calculado como el N° de células CK(+) que incorporaron timidina sobre N° de células CK(+) totales, o IP de fibroblastos calculado como N° de células CK(-) que incorporaron timidina sobre N° de células CK(-) totales. Los resultados indican que el MPA aumentó significativamente la proliferación de células epiteliales a las tres concentraciones testeadas ($p < 0,01$, $p < 0,05$ y $p < 0,001$ respectivamente), sin afectar la proliferación de fibroblastos. La administración de E_2 , en las dos concentraciones empleadas, no produjo per se variación significativa de la proliferación de células epiteliales o fibroblásticas.

7. Estudio de receptores para estrógenos y progesterona en las células cultivadas.

El tumor C4-HD es representativo de los tumores ductales inducidos por MPA y expresa receptores para estrógenos y Pg, tal como fue mostrado en la Figura 4.

Los experimentos que se describen a continuación, fueron diseñados con el objeto de analizar la posible expresión de RP y RE, en las células provenientes de los cultivos primarios de dichos tumores. A este fin, se emplearon dos metodologías.

7-a. Técnicas inmunohistoquímicas:

Se emplearon anticuerpos monoclonales anti-RP y anti-RE (Immunoreagents) que, según datos previos (Traish, 1990), reconocen tanto a los RP y RE humanos como murinos. Como controles positivos se utilizaron tejidos humanos (biopsias de mama) y útero de ratón. En nuestras condiciones experimentales, estos anticuerpos permitieron detectar los receptores expresados en tejido humano pero, no obstante las descripciones previas citadas, no fue posible detectar la expresión de RE y RP en los tejidos murinos controles (útero), ni en las células provenientes de los cultivos.

7-b. Técnicas bioquímicas:

i. Célula entera Se evaluó mediante esta técnica la presencia de RP y RE en cultivos enriquecidos en células epiteliales y fibroblásticas, provenientes de la línea C4-HD. En la Figura 19 A se muestran los resultados obtenidos en tres experimentos. Las células epiteliales expresaron niveles detectables de RP en todos los experimentos, obteniéndose valores promedio de 475 ± 115 fmol/ 10^5 células (2.45×10^6 sitios por célula) (n=3). En el caso de los estudios realizados sobre cultivos enriquecidos en fibroblastos, los resultados obtenidos son conflictivos, ya que en uno de los dos experimentos realizados se observaron diferencias pequeñas, pero significativas, entre las cpm indicativas de unión específica y las correspondientes a unión inespecífica. Es importante destacar, no obstante, que esta observación podría resultar de la presencia de células epiteliales contaminantes considerando que, en el mismo cultivo, en la

contraparte enriquecida en células epiteliales, se encontró una alta expresión de RP.

Los RE, por otra parte, no fueron detectados en cultivos enriquecidos en fibroblastos. Su expresión en cultivos enriquecidos en células epiteliales fue detectada, aunque no en forma consistente.

ii. Homogenato celular: Se evaluó el contenido de RP y RE en la fracción citosólica de homogenatos celulares provenientes de cultivos enriquecidos en células epiteliales o fibroblásticas, provenientes de la línea C4-HD. Los resultados obtenidos (**Figura 19 B**), muestran niveles detectables de RE y RP en los cultivos epiteliales (RE=6.0±2.5 fmol/10⁵ células y RP=16.6±9.9 fmol/10⁵ células). En cultivos fibroblásticos, por otra parte, no se detectaron valores significativos de RP o RE.

Los resultados obtenidos indican, en su conjunto, que la población epitelial expresa altos niveles de RP. Los mismos sugieren que los fibroblastos no expresarían niveles significativos de RP. Respecto a los RE, las observaciones resultaron más conflictivas, debido a la heterogeneidad de los datos obtenidos. Ellos sugieren, no obstante, que las células epiteliales expresarían niveles variables de RE, mientras que éstos no serían expresados por la población fibroblástica.

8. Evaluación de los efectos progestagénico, androgénico y glucocorticoideo del MPA.

Si bien la acción más conocida del MPA es la progestacional, ejercida a través del RP, se ha descrito que este progestágeno puede unirse también a receptores de andrógenos y glucocorticoides, desencadenando respuestas propias de estas hormonas (Briggs, 1973; Bullock, 1975). Con el objeto de determinar si la

promoción del crecimiento inducida por MPA sobre las células epiteliales de las líneas tumorales estudiadas se debía a una acción progestacional, evaluamos en primer término, en forma comparativa, el efecto del MPA y la Pg sobre la proliferación de cultivos epiteliales provenientes de la línea C4-HD. Los resultados obtenidos (Tabla 8 y Figura 20) indicaron que el MPA y la Pg ejercieron un efecto estimulador similar, cuando fueron empleados a dosis equivalentes. Estos resultados fueron corroborados mediante estudios de radioautografía (Tabla 9 y Figura 21). Los datos obtenidos por esta última técnica indicaron además, que al igual que el MPA, la Pg no alteró los niveles de proliferación basal de fibroblastos. El efecto paralelo que muestran la Pg y el MPA sobre la proliferación de células epiteliales, sugiere que el MPA actuaría a través de un mecanismo de naturaleza progestacional.

Posteriormente, analizamos los efectos sobre la proliferación de células epiteliales provenientes de C4-HD, inducidos por un glucocorticoide (dexametasona) y un andrógeno (dihidrotestosterona-DHT-), ambos administrados en concentraciones de 10^{-9} y 10^{-7} M. Los resultados obtenidos (Tabla 10 y Figura 22) muestran que la DHT fue incapaz de modular los niveles de proliferación de células epiteliales. La dexametasona, por otra parte, no indujo efectos apreciables cuando fue administrada en concentraciones nanomolares. Por el contrario, a concentraciones de 10^{-7} M, indujo efectos similares a los mediados por MPA o Pg; el hecho de que la dexametasona a altas concentraciones incrementa significativamente los niveles de proliferación celular, podría ser atribuido a un efecto mediado a través de un receptor que no es el propio, tal como se ha descrito previamente (Lippman, 1977). No obstante, los resultados mostrando que concentraciones nanomolares de DHT y dexametasona son incapaces de modificar la respuesta proliferativa de células epiteliales, sugieren que los efectos androgénico y glucocorticoideo del MPA no se encontrarían comprometidos en su acción estimuladora de la proliferación.

9. Efectos de anti-hormonas sobre la proliferación inducida por MPA.

Los resultados mencionados en el punto anterior sugieren que el MPA incrementaría los niveles de proliferación celular, en cultivos epiteliales derivados de C4-HD, mediante una acción progestacional. Con el objeto de confirmar si la misma es mediada por el RP, estudiamos en primera instancia la acción del RU486. Este compuesto se comporta como un potente antagonista de RP y RG, actuando a concentraciones nanomolares; a dichas concentraciones no es capaz de antagonizar al RA, para lo cual requiere de concentraciones superiores (Poulin, 1989). Los resultados obtenidos (Tabla 11 A y Figura 23 A) muestran que el RU486 inhibió, en forma prácticamente completa, tanto la proliferación basal de los cultivos como aquella estimulada por MPA, incluso a concentraciones un orden menor respecto de las empleadas para MPA. Teniendo en cuenta la potente acción inhibitoria ejercida por el RU486, realizamos una serie de experimentos adicionales con el objeto de descartar una posible acción inespecífica del mismo. Para ello, evaluamos su acción sobre cultivos primarios de adenocarcinomas de mama hormono-independientes. Los resultados obtenidos (Figuras 24 y 25) mostraron que el RU486 no modificó la proliferación de estos cultivos. Ello sugiere que el efecto inhibitorio del RU486 involucraría la interacción con receptores esteroides. La acción del RU486 sobre la proliferación basal de las células C4-HD podría explicarse en este contexto. La reversión ejercida por el RU486 a concentraciones de 10^{-9} y 10^{-10} M sugiere fuertemente que la acción del MPA no involucraría un efecto de naturaleza androgénica. Esto se vió confirmado al analizar el efecto del compuesto OHF a concentraciones capaces de antagonizar efectos androgénicos (Poulin, 1989); la OHF no ejerció ningún efecto sobre la acción estimuladora inducida por MPA (Tabla 11 B y Figura 23 B).

Considerando a) la incapacidad de concentraciones nanomolares de dexametasona de inducir estimulación sobre la proliferación de

las células epiteliales de C4-HD (Figura 22); b) los hallazgos mostrados (Figuras 23 A y B), indicando que la acción del MPA no involucraría efectos mediados a través de los RA, c) la reversión producida por bajas concentraciones de RU486 sobre la proliferación inducida por MPA (Figura 23 A) y d) los efectos similares inducidos por el MPA y el progestágeno natural, Pg (Figuras 20 y 21), los resultados expuestos sugieren que el efecto promotor de la proliferación celular del MPA involucraría una acción progestacional del mismo, mediada a través de los RP.

10. Efecto de hormonas y antagonistas sobre la proliferación de cultivos primarios derivados de tumores de mama, carentes de RE y RP.

Los experimentos que se describen a continuación fueron desarrollados con el objeto de analizar la capacidad de las hormonas y antagonistas empleadas en los experimentos precedentes, de modular la proliferación de células tumorales que no expresen RE y RP. Para ello, se desarrollaron cultivos primarios derivados del carcinoma de mama 55-HI (carcinoma inducido por MPA, cuya cinética de crecimiento tumoral e histología se muestran en las Figuras 2 y 3B, respectivamente) y cultivos primarios derivados del carcinoma de mama M3 (originado espontáneamente en una hembra múltipara). Los mismos no expresan RE y/o RP (Lanari, 1989; Gritti, 1993). Los resultados obtenidos (Tabla 12 y Figuras 24 y 25) muestran que, en ningún caso, los tratamientos hormonales ensayados (MPA, Pg, dexametasona, DHT) o aquéllos realizados mediante el empleo de antagonistas (RU486 y OHF) fueron capaces de modificar los niveles basales de proliferación sobre dichos cultivos; los mismos constituyen una evidencia a favor de la especificidad de las respuestas observadas previamente para células provenientes de tumores hormonodependientes.

11. Efecto de sueros de ratones ovariectomizados sobre la proliferación de cultivos derivados de C4-HD.

Considerados en conjunto, los resultados obtenidos *in vitro*, mostrados en los puntos precedentes, sugieren que la acción promotora del crecimiento tumoral ejercida por el MPA puede ser atribuida, al menos parcialmente, a un efecto **directo** ejercido sobre las células neoplásicas. Ello no descarta, sin embargo, la posible participación de mecanismos de otra naturaleza. Con el objeto de analizar si la estimulación local del crecimiento tumoral ejercida por el MPA involucra una acción asociada con factores presentes en el suero del animal portador, se realizaron una serie de experimentos adicionales. En los mismos, el medio de cultivo fue suplementado con suero de ratones ovariectomizados (ovx) o suero de animales ovx tratados *in vivo* con MPA.

En una primera serie de experimentos se analizaron los niveles de proliferación de células epiteliales provenientes de tumores C4-HD, en medios de cultivo suplementados con 5% de suero proveniente de ratones hembras:

- a) ovx, [S(ovx)];
- b) ovx, tratados sc con 40mg de MPA depot, [S(ovx-MPA)], obteniéndose el suero luego de 7 días de tratamiento hormonal;
- c) ovx, añadiendo exógenamente al suero concentraciones nanomolares de MPA, [S(ovx)+MPA].

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 13 y en la Figura 26 A. Se observa que el suero de animales ovx tratados *in vivo* con MPA [S(ovx-MPA)] indujo un incremento en los niveles de proliferación celular significativamente mayor que el inducido no sólo por el suero control [(Sovx)], sino también respecto del inducido por el suero de animales ovx suplementado exógenamente con MPA [S(ovx)+MPA] ($p < 0,001$).

La interpretación de estos resultados no es sencilla. Considerando los hallazgos previos (Figuras 7, 8 y 15 y Tabla 13), indicando que la acción estimuladora del MPA no difiere en un amplio rango de concentraciones comprendidas entre 1 y 100 nM, el efecto inducido por [S(ovx-MPA)] no podría explicarse en función de una diferente concentración de MPA presente en [S(ovx-MPA)] respecto de la añadida exógenamente en [S(ovx)+MPA]. Una segunda interpretación posible involucraría la existencia en el suero del animal portador pretratado con MPA, de factores, inducibles por el progestágeno, que potenciarían el efecto estimulador de éste *in vitro*.

Para analizar con mayor detalle este punto, realizamos una segunda serie de experimentos. En los mismos, se analizaron los niveles de proliferación celular en medios de cultivo suplementados con 5% de:

- a) [S(ovx-MPA)] previamente adsorbido con carbón, [S(ovx-MPA)ch],
- b) [S(ovx-MPA)ch] suplementado exógenamente con 10^{-9} , 10^{-8} y 10^{-7} M de MPA, ([S(ovx-MPA)ch]+MPA)
- c) S(ovx) suplementado exógenamente con las mismas concentraciones de MPA [S(ovx)+MPA].

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 13 y en la Figura 26 B. Encontramos que el [S(ovx-MPA)ch] fue incapaz de ejercer efecto estimulador sobre los cultivos. Ello sugiere que la presencia en el suero del MPA constituye un requerimiento indispensable para la manifestación del efecto estimulador inducido por [S(ovx-MPA)]. Se observó, por otra parte, que la suplementación del [S(ovx-MPA)ch] con MPA exógeno, ([S(ovx-MPA)ch]+MPA), fue capaz de inducir niveles de proliferación significativamente superiores a los inducidos por [S(ovx)+MPA], para concentraciones equivalentes de MPA exógeno.

En conjunto, los resultados obtenidos sugieren que la acción del [S(ovx-MPA)] podría explicarse considerando la posibilidad de

que el MPA, administrado *in vivo*, induzca la producción y/o liberación de factores séricos, hormonales o no, capaces de actuar directamente sobre las células tumorales, o bien la expresión de receptores celulares específicos para factores séricos preexistentes. Ambos fenómenos podrían resultar en la potenciación de la acción estimuladora ejercida por el MPA a través de los RP.

III. INOCULO DE CELULAS PROVENIENTES DE CULTIVOS PRIMARIOS EN RATONES.

Con el objeto de determinar si las células presentes en los cultivos primarios conservaban su tumorigenicidad al ser reinoculadas en el animal, las mismas fueron inoculadas en ratones BALB/c, tratados con MPA. Se emplearon en estos ensayos suspensiones de células provenientes de cultivos epiteliales y fibroblásticos de cultivos de la línea C4-HD. Los experimentos se realizaron en forma paralela al desarrollo de los estudios *in vitro* mencionados previamente. Se observó crecimiento tumoral en los ratones inoculados con células provenientes de cultivos enriquecidos en células epiteliales a partir del día 15 a 20, pero no en aquéllos inoculados con células provenientes de cultivos fibroblásticos. Estas observaciones indicarían que las células epiteliales en cultivo mantienen su capacidad tumorigénica, capacidad no compartida por los fibroblastos.

Del mismo modo se procedió a la inoculación de colonias epiteliales, obtenidas a partir de cultivos en agar blando, en ratones BALB/c tratados con MPA, observándose desarrollo de tumores a partir del día 15.

Con el objetivo de determinar si los tumores originados a partir del inóculo de células epiteliales en cultivo poseían las características de los tumores originales, se evaluó posteriormente;

a. su hormonodependencia *in vivo*: Mediante pasajes singeneicos de estos tumores en ratones tratados y no tratados con MPA, se observó que los mismos sólo se desarrollaban en ratones tratados con MPA. El tratamiento con E_2 , por otra parte, produjo la remisión de los tumores. Estos resultados indican que los tumores originados a partir de los cultivos primarios, empleados para el desarrollo de los experimentos *in vitro*, comparten la dependencia hormonal característica de la línea parental.

b. su cinética de crecimiento: Los estudios de cinética de crecimiento realizados (**Figura 27**) revelaron que los tumores originados a partir de los cultivos primarios presentaron el mismo patrón de crecimiento que la línea parental (**Figura 1**).

Esquema 1

MODELO EXPERIMENTAL DE CARCINOGENESIS INDUCIDA POR PROGESTAGENOS

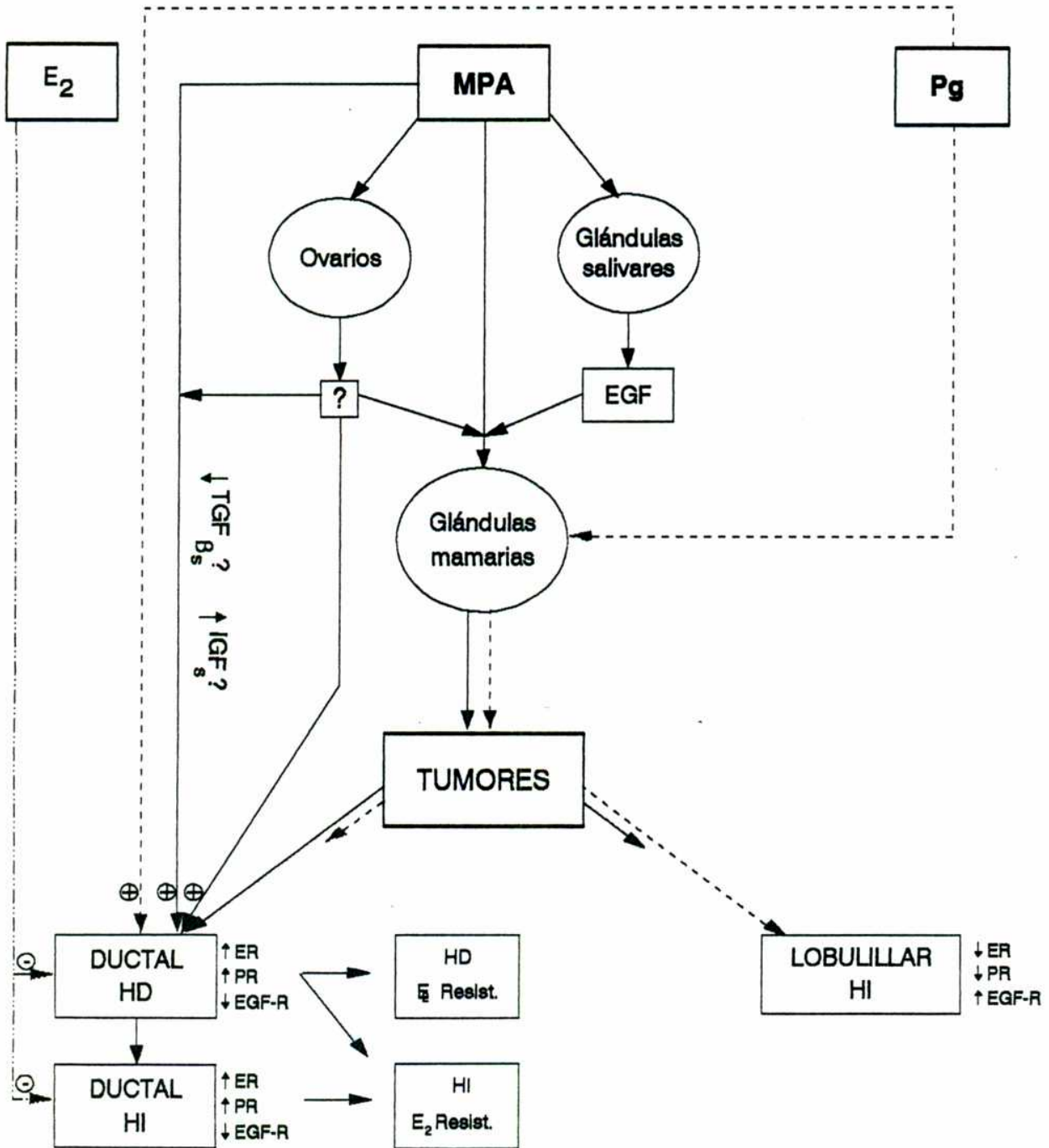
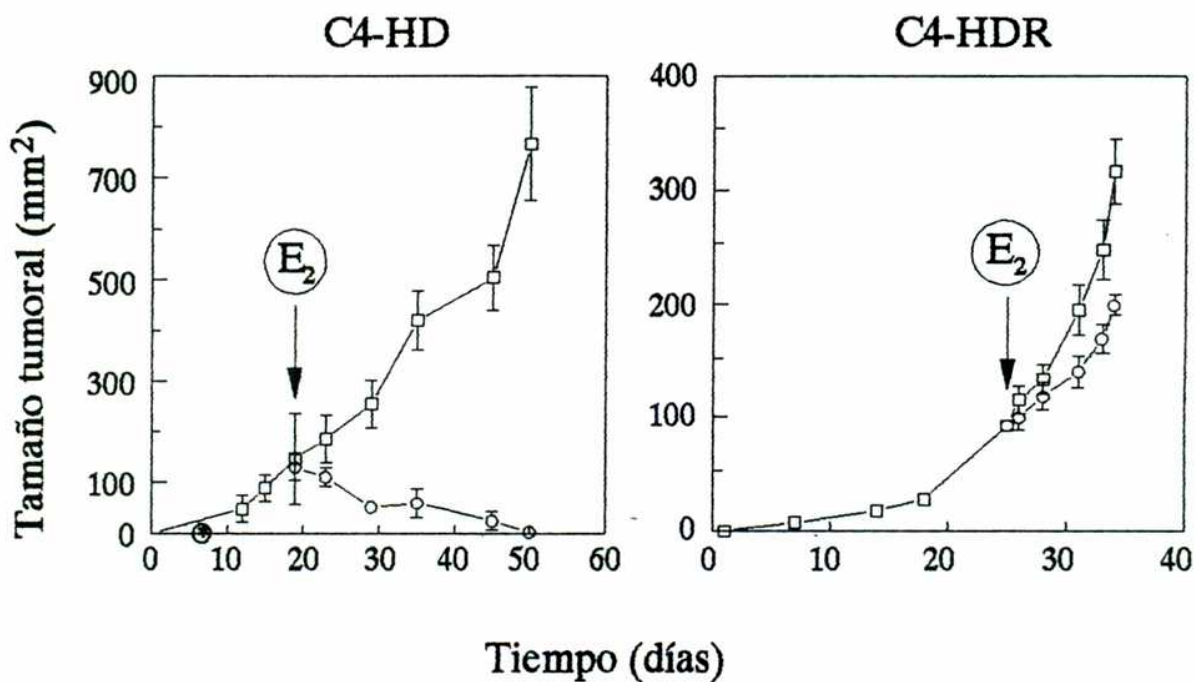


Figura 1

Cinética de crecimiento in vivo de las líneas tumorales C4-HD Y C4-HDR



□ MPA

○ E₂

*: Los tumores no crecieron en hembras sin tratar con MPA.

Figura 2

Cinética de crecimiento de la línea 55-HI (carcinoma lobulillar)

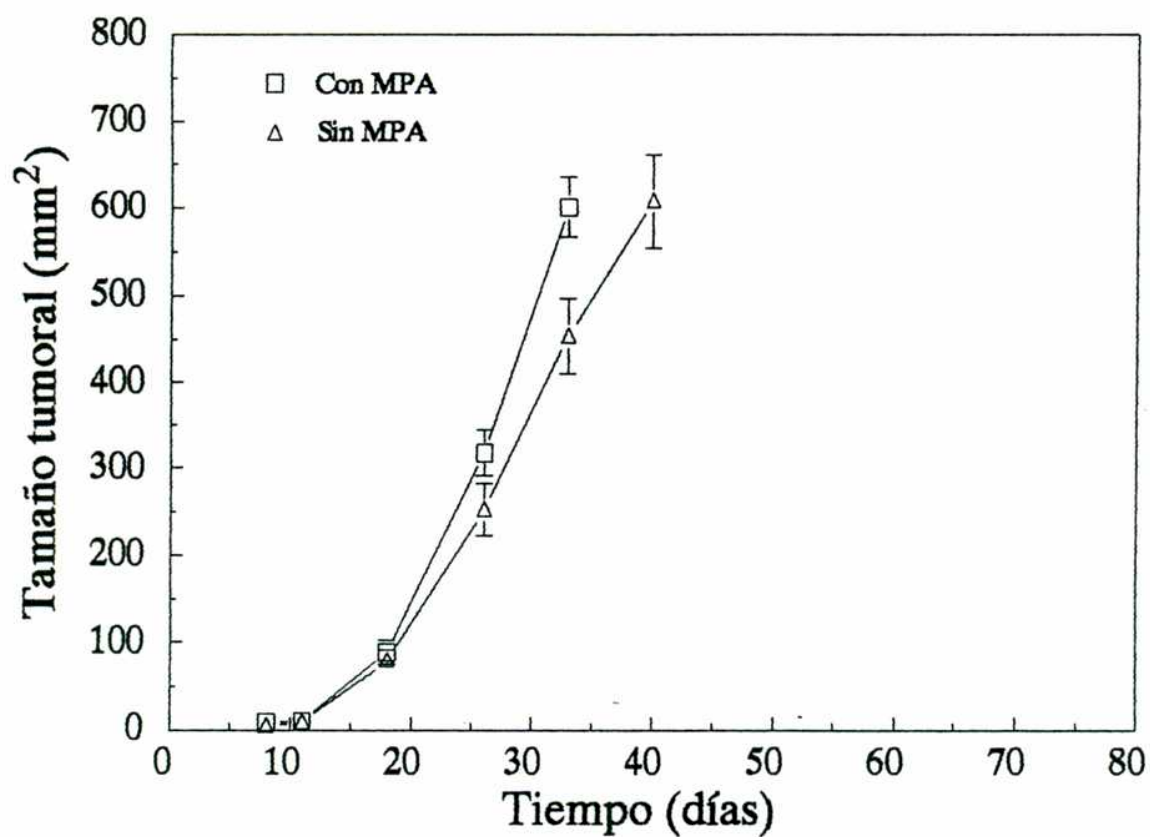
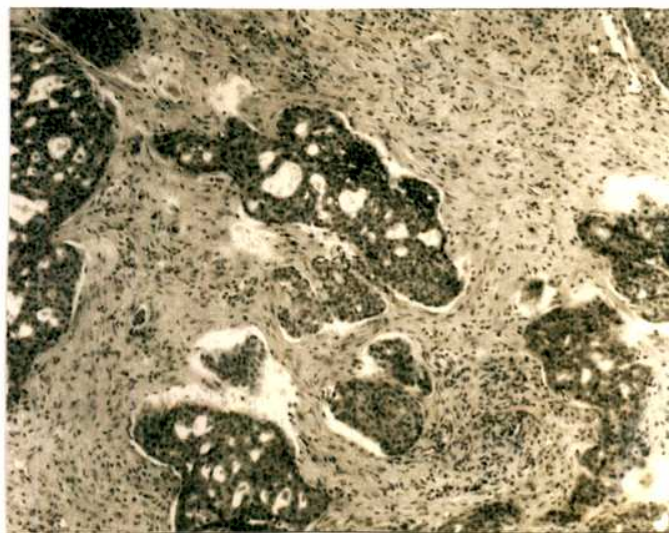
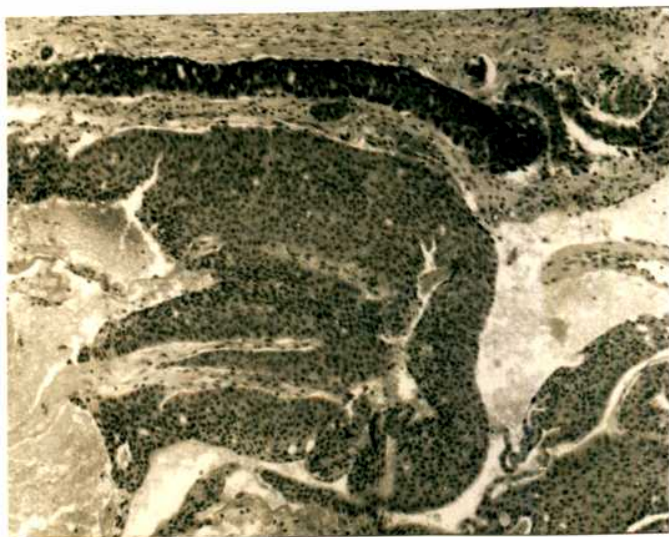
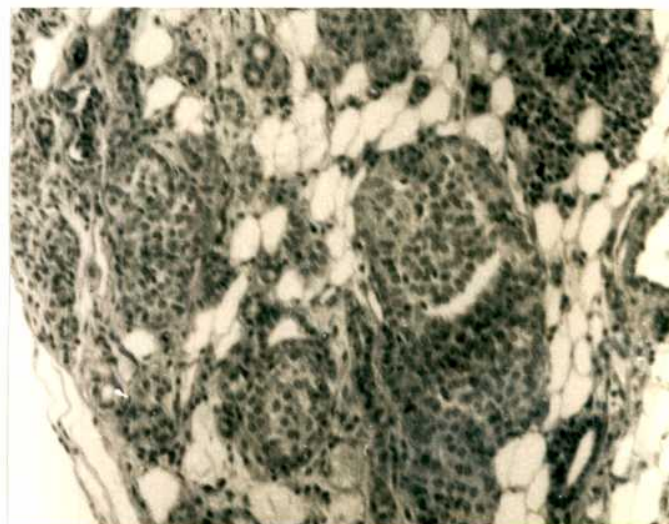
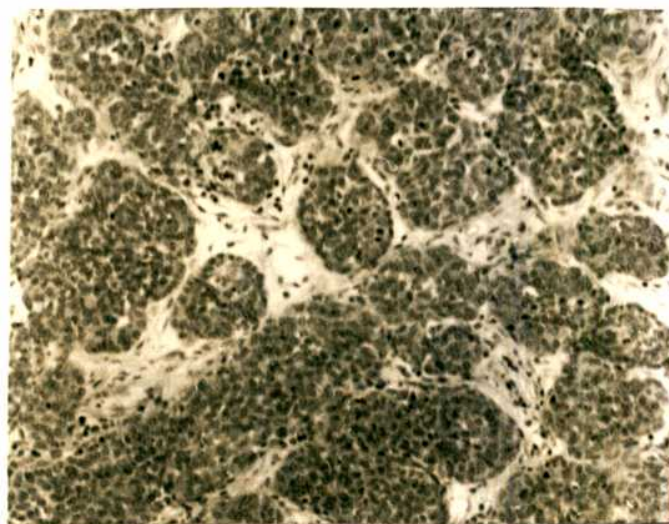


Figura 3
Cortes histológicos de un tumor ductal (A) y de
uno lobulillar (B).



A



B

Figura 4

Gráficos de Scatchard para RE y PR de la línea CH-HD.

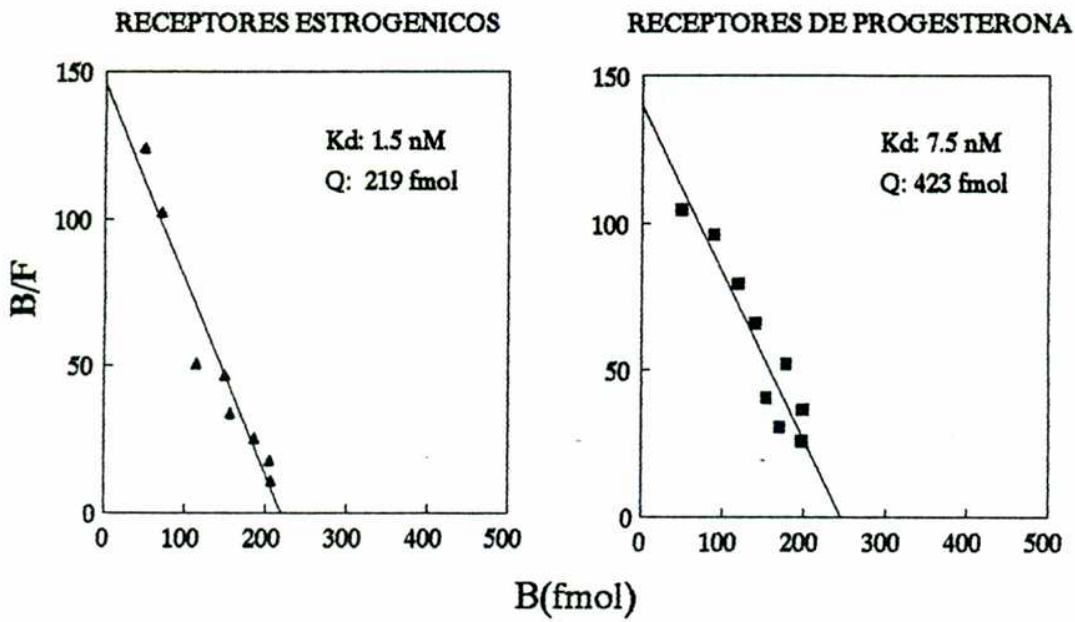


Tabla 1

**Tratamientos de disgregación de tumores, utilizados
en el establecimiento de cultivos primarios**

Tratamiento	Concentración	Rendimiento celular	Adhesión al sustrato y crecimiento
enzimático			
a) Colagenasa tipo II + Hialuronidasa + BSA	0,125% 0,1% 4%	+	++
b) Colagenasa tipo I + Hialuronidasa	900 U/ml 100 U/ml	++	++
c) Pronasa + Deoxirribonucleasa (DNAasa I)	0,01% $2 \times 10^{-3} \%$	+++	++
d) Pronasa + Deoxirribonucleasa (DNAasa I)	0,25% $2 \times 10^{-4} \%$	+++	++
e) Colagenasa cruda	150-200 U/ml	+++	++++
f) Colagenasa + Tripsina + BSA	0,25% 0,25% 0,5%	++++	++++
mecánico			
		--	--

Figura 5

**Cultivo de C4-HD. Isla epitelial rodeada
de fibroblastos.**

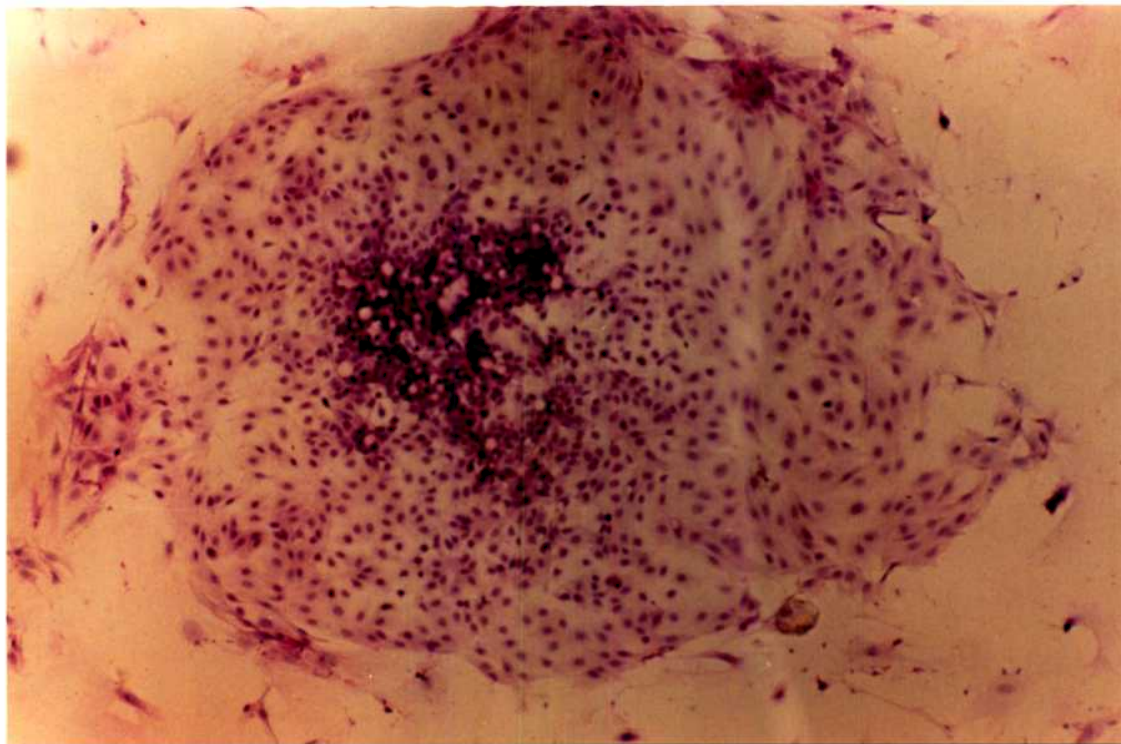


Figura 6
Incorporación de ^3H -Timidina en cultivos
de la línea C4-HD tratados con MPA

Tiempos de incubación
con MPA

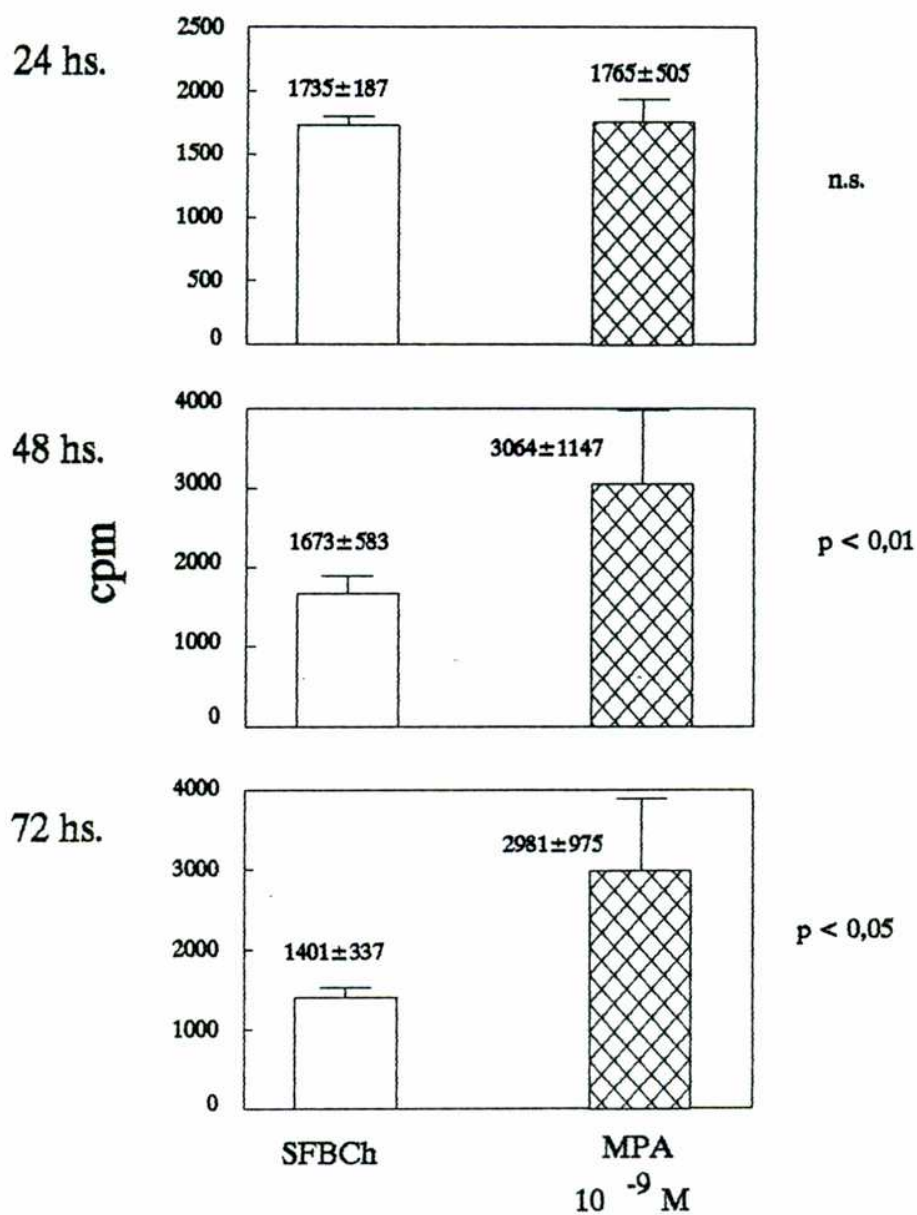
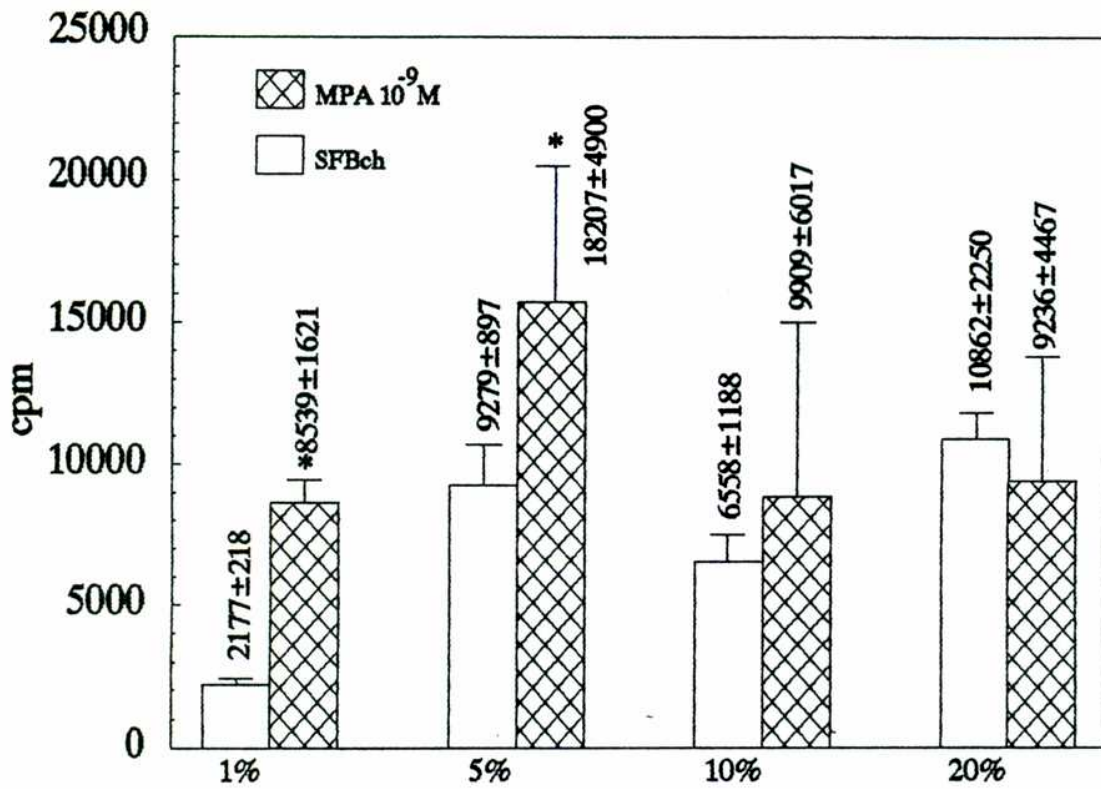


Figura 7

Efecto de distintas concentraciones de SFBch



*: $p < 0,05$

SFBch 1% vs 20%: $p < 0,001$

Tabla 2

Recuento de células luego de 3 días de incubación con MPA

Tratamiento	N° de Células ($\times 10^4$)	
	Experimento 1	Experimento 2
CONTROL	49,10 \pm 3,9 n = 3	35,07 \pm 6,5 n = 4
MPA 10 ⁻⁹ M	83,96 \pm 4,1* n = 8	64,36 \pm 9,5** n = 4

Exp 1: p < 0,05

Exp 2: p < 0,01

TABLA 3

Efecto de diferentes concentraciones de MPA sobre la incorporación de ³H-timidina de cultivos mixtos de C4-HD

TRATAMIENTO	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	\bar{X} I.P. \pm DS
	cpm \pm DS			
SFBch	7174,76 \pm 873	10250,33 \pm 690	17915,54 \pm 790	1
MPA10 ¹² M	7099,45 \pm 993	12007,60 \pm 1139	-	0,870 \pm 0,1
MPA10 ¹¹ M	6727,23 \pm 1069	9776,34 \pm 598	19976,43 \pm 1001	0,183 \pm 0,22
MPA10 ¹⁰ M	8533,45 \pm 1790**	11084,53 \pm 680	19715,33 \pm 1502	1,176 \pm 0,09
MPA10 ⁹ M	9954,23 \pm 798**	12185,98 \pm 560*	24429,11 \pm 1596***	1,650 \pm 0,47
MPA10 ⁸ M	14404,30 \pm 967***	14009,40 \pm 640***	26453,43 \pm 1977***	1,770 \pm 0,61
MPA10 ⁷ M	9866,43 \pm 1080**	12623,33 \pm 826**	21760,33 \pm 1201**	1,840 \pm 0,07
MPA10 ⁶ M	8960,31 \pm 2300	-	-	1,625 \pm 0,91

* p < 0,05

** p < 0,01

*** p < 0,001

Se muestran 3 experimentos representativos.

Los I.P. promedio se calcularon considerando el total de experimentos realizados.

TABLA 4

Efecto de diferentes concentraciones de MPA sobre la incorporación de ³H-timidina de cultivos mixtos de C4-HDR

TRATAMIENTO	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	\bar{X} I.P. \pm DS
	cpm \pm DS			
SFBch	16170.72 \pm 1123	5996.32 \pm 726	11973.22 \pm 1501	1
MPA10 ⁻¹² M	16679.54 \pm 1026	.	11026.32 \pm 1236	1,070+0,09
MPA10 ⁻¹¹ M	18111.33 \pm 1992	6296.67 \pm 892	12560.99 \pm 1706	1,444+0,13
MPA10 ⁻¹⁰ M	19200.31 \pm 2172	.	13399.44 \pm 978	1,235+0,10
MPA10 ⁻⁹ M	23802.31 \pm 1207**	8808.29 \pm 760*	15399.94 \pm 920**	1,555+0,57
MPA10 ⁻⁸ M	19025.22 \pm 971**	9010.54 \pm 433**	15726.22 \pm 1250**	1,676+0,86
MPA10 ⁻⁷ M	18020.66 \pm 1779	7270.07 \pm 992	13425.27 \pm 1348	1,694+0,86
MPA10 ⁻⁶ M	18526.22 \pm 2804		12026.78 \pm 1988	2,022+1,01

* p<0,05

** p<0,01

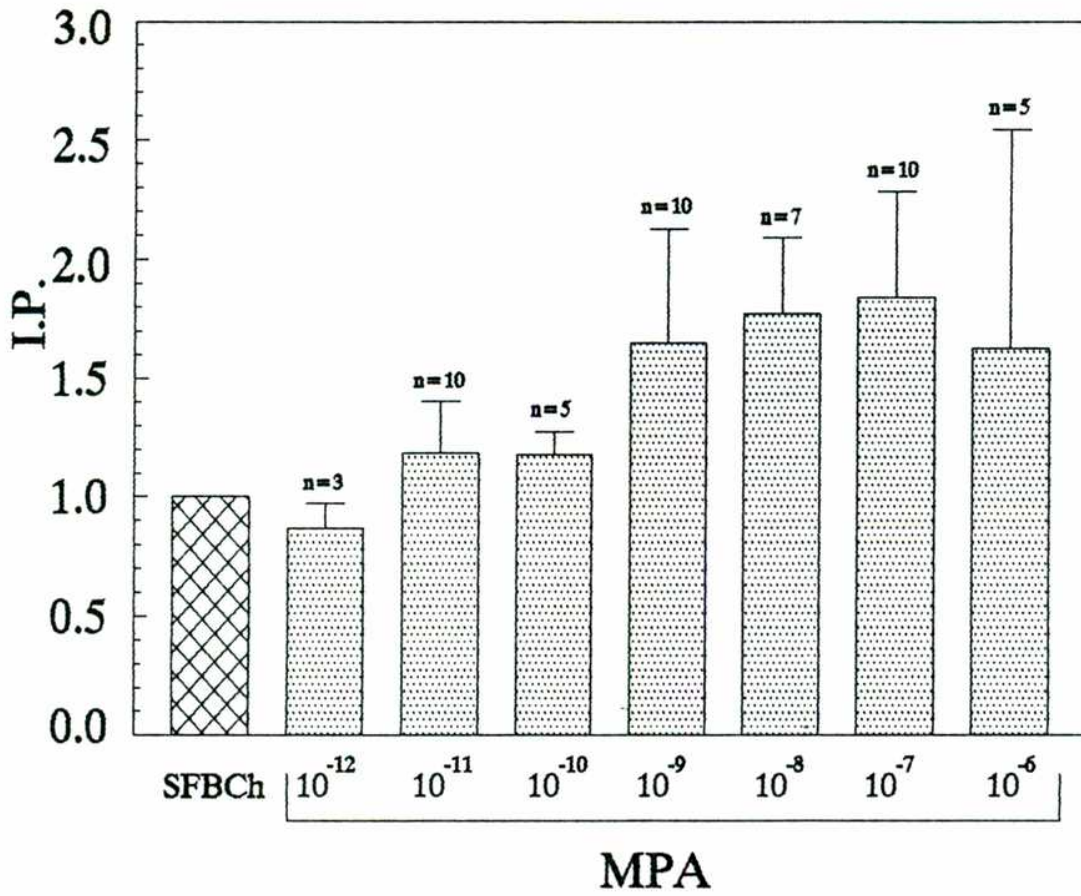
*** p<0,001

Se muestran 3 experimentos representativos.

Los I.P. promedio se calcularon considerando el total de experimentos realizados.

Figura 8

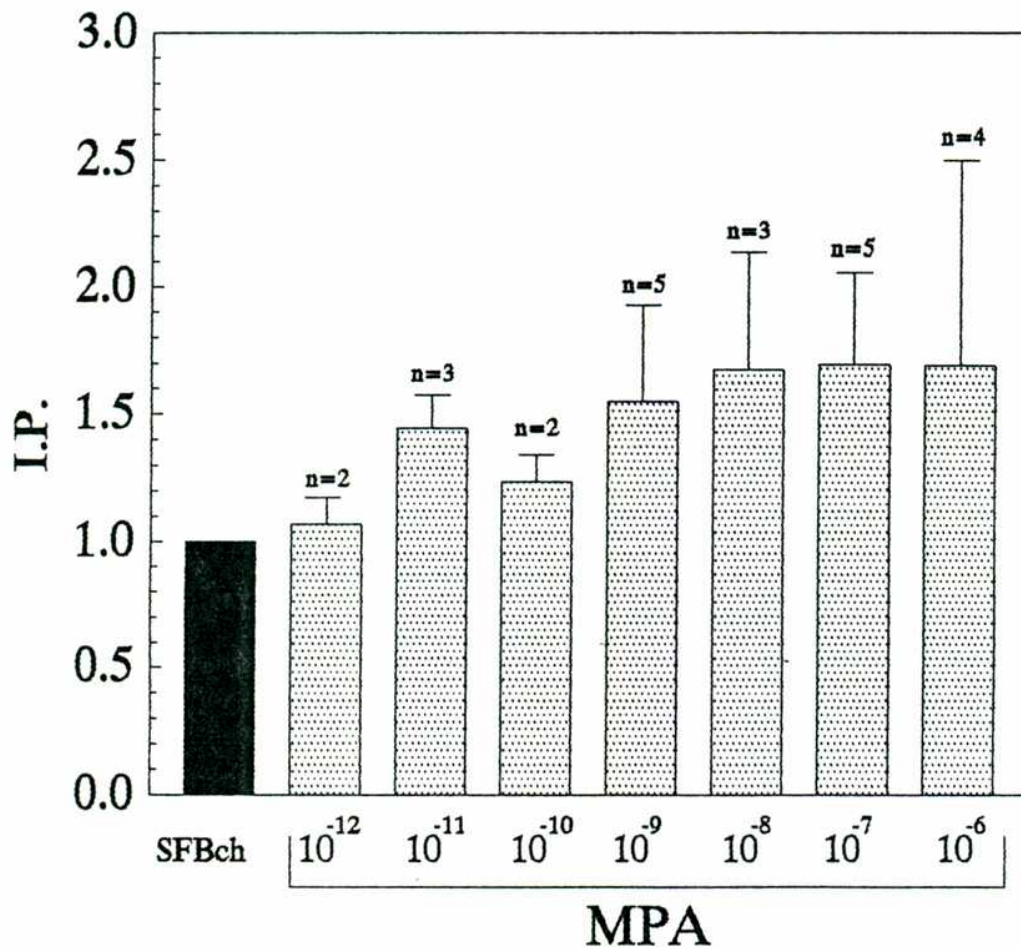
Incorporación de ^3H -timidina en cultivos mixtos de C4-HD incubados con distintas concentraciones de MPA.



Los resultados se expresan como IP promedio de n experimentos.

Figura 9

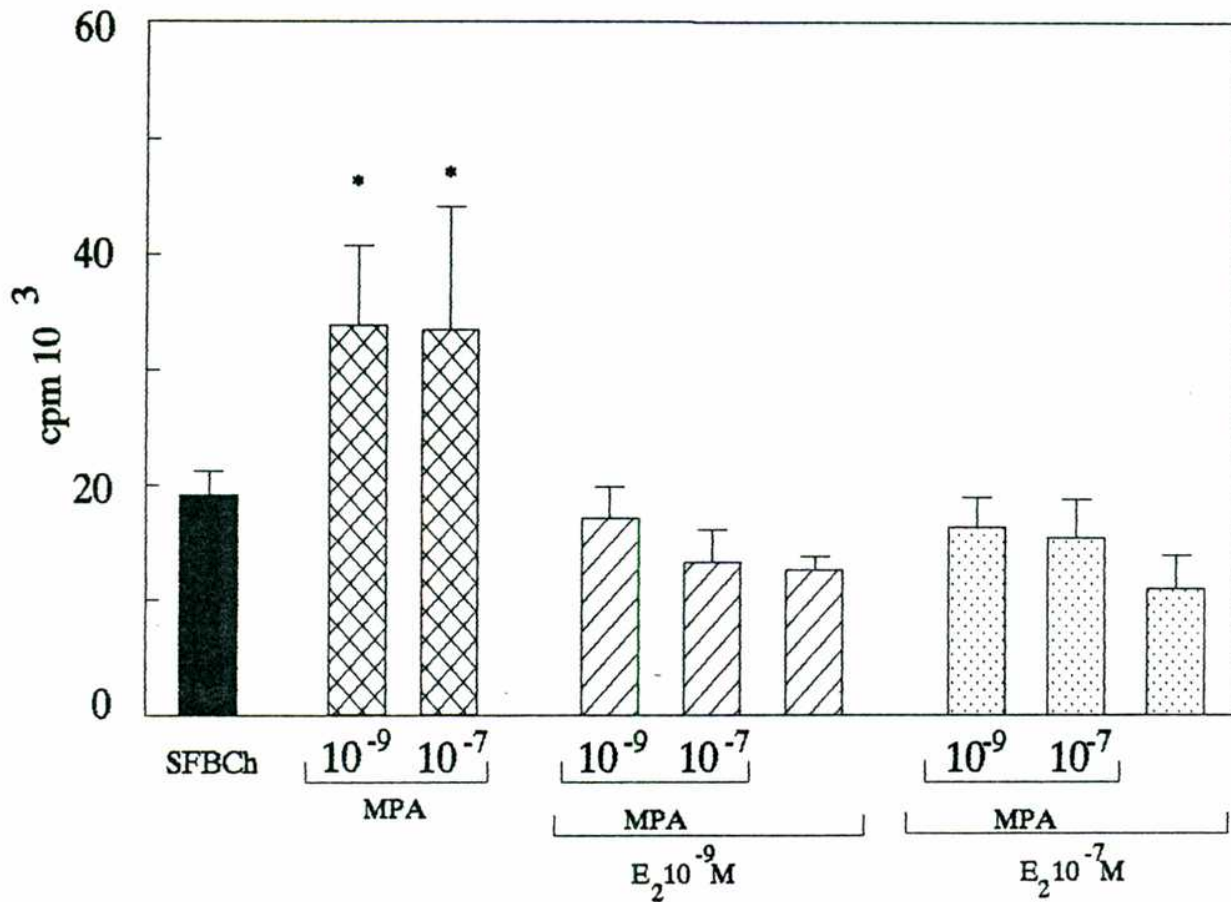
Incorporación de ^3H -timidina en cultivos mixtos de C4-HDR incubados con distintas concentraciones de MPA.



Los resultados se expresan como IP promedio de n experimentos.

Figura 10

Efecto de estradiol sobre la proliferación inducida por MPA
en cultivos mixtos de la línea C4-HD



Tratamientos vs control: MPA 10⁻⁹M: p<0,05

MPA 10⁻⁷M: p<0,05

E₂10⁻⁹M: ns

E₂10⁻⁷M: ns

Tratamientos entre sí: MPA10⁻⁹M+E₂10⁻⁹M vs MPA10⁻⁹M: p<0,01

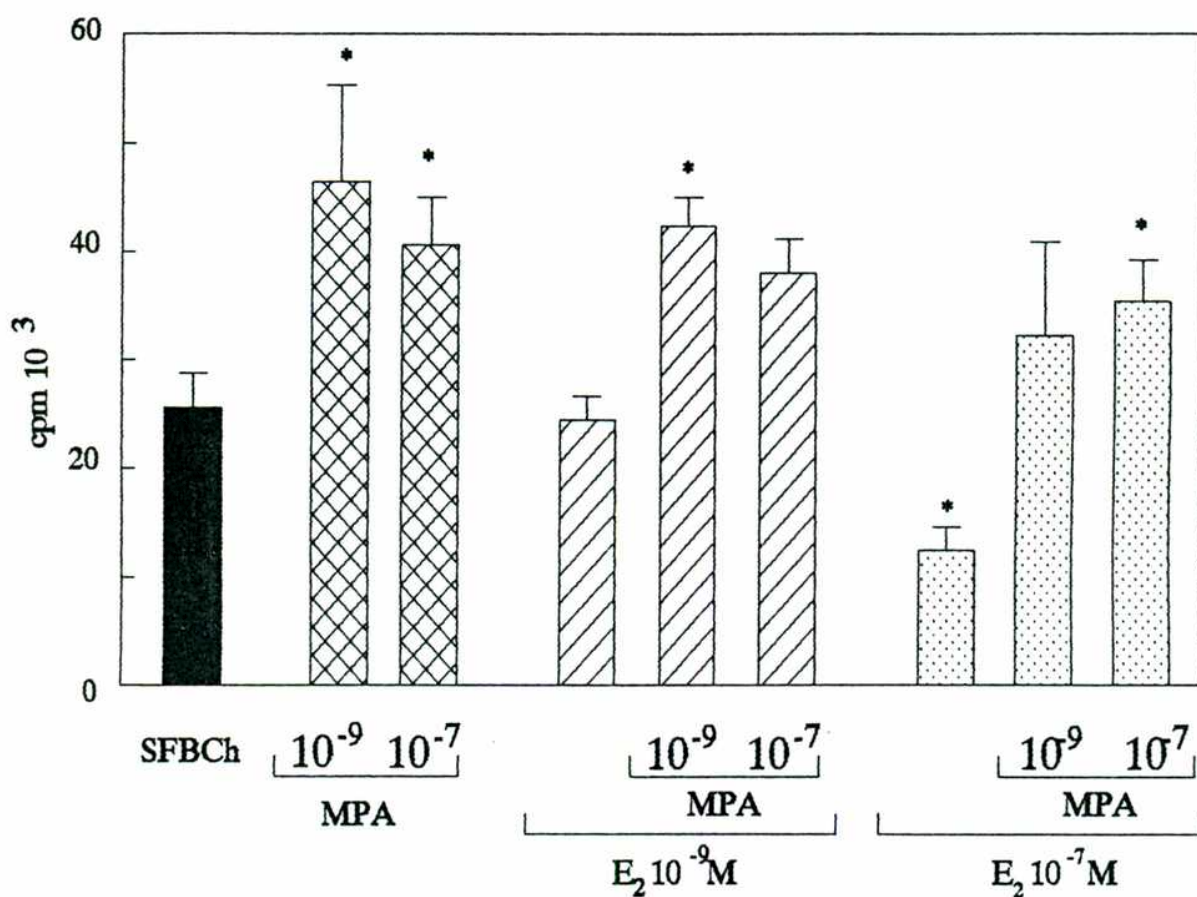
MPA10⁻⁷M+E₂10⁻⁹M vs MPA10⁻⁷M: p<0,001

MPA10⁻⁹M+E₂10⁻⁷M vs MPA10⁻⁹M: p<0,001

MPA10⁻⁷M+E₂10⁻⁷M vs MPA10⁻⁷M: p<0,01

Figura 11

Efecto de estradiol sobre la proliferación inducida por MPA
en cultivos mixtos de la línea C4-HDR



Tratamientos vs control: MPA 10^{-9} M: $p < 0,05$
 MPA 10^{-7} M: $p < 0,05$
 MPA 10^{-9} M + E₂ 10^{-9} M: $p < 0,05$
 MPA 10^{-7} M + E₂ 10^{-7} M: $p < 0,05$
 E₂ 10^{-7} M: $p < 0,05$

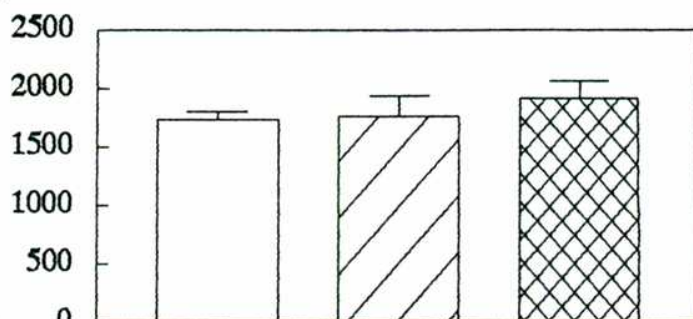
Tratamientos entre sí: MPA + E₂ vs MPA: ns

Figura 12

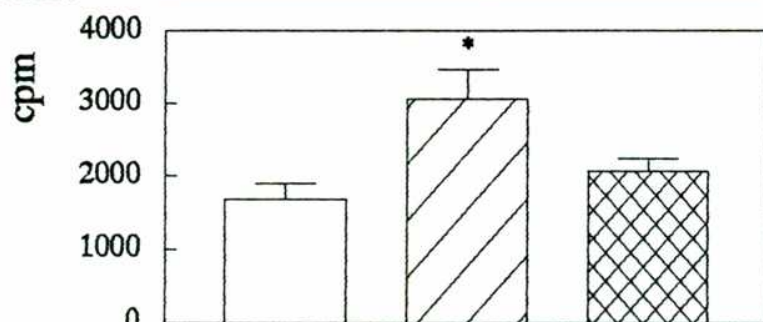
Incorporación de ^3H -Timidina en cultivos de la línea C4HD tratados con E_2 o MPA

Tiempos de incubación con E_2

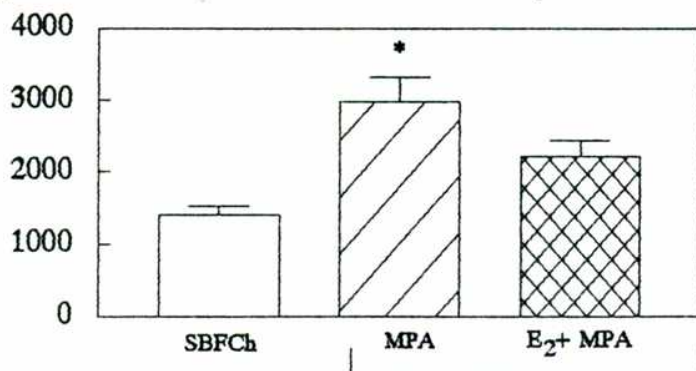
24 hs.



48 hs.



72 hs.

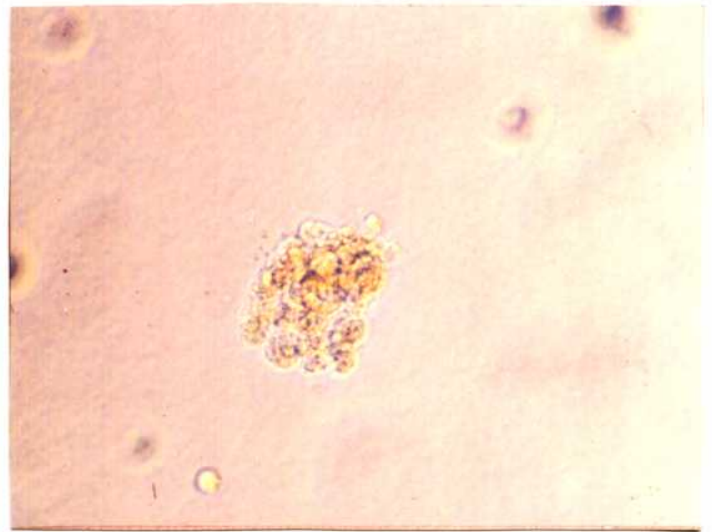
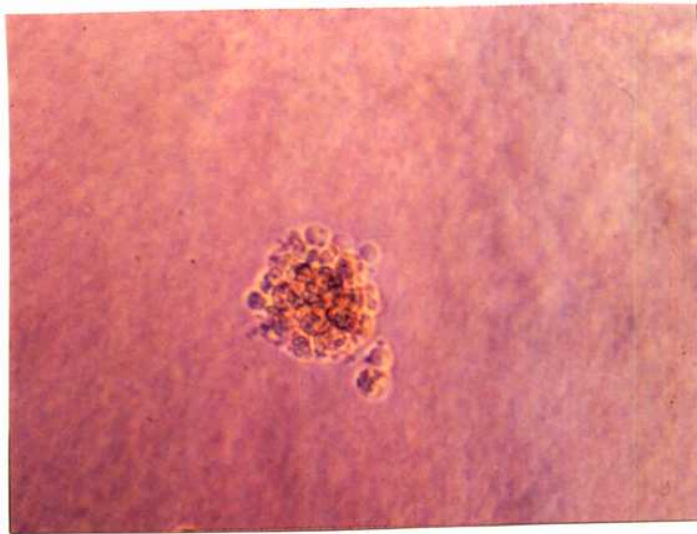


10^{-9} M

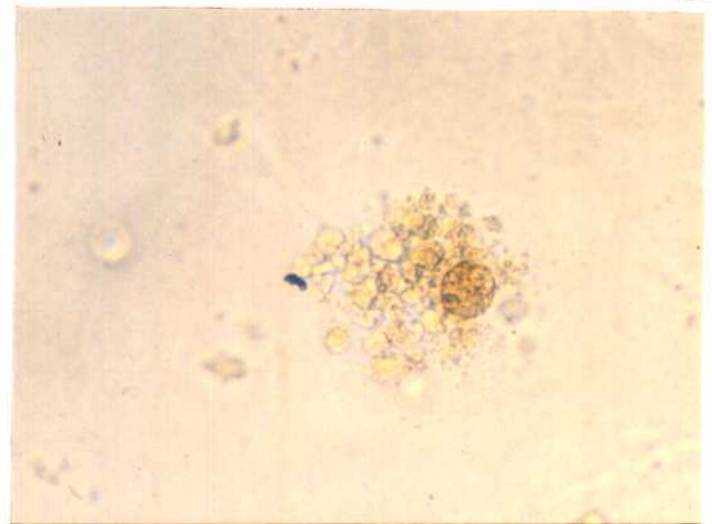
MPA vs SFBCh : $p < 0,05$ (48 y 72 hs)

MPA vs $\text{E}_2 + \text{MPA}$: $p < 0,05$ (48 y 72 hs)

Figura 13
Cultivo en agar de tumores de la línea C4-HD



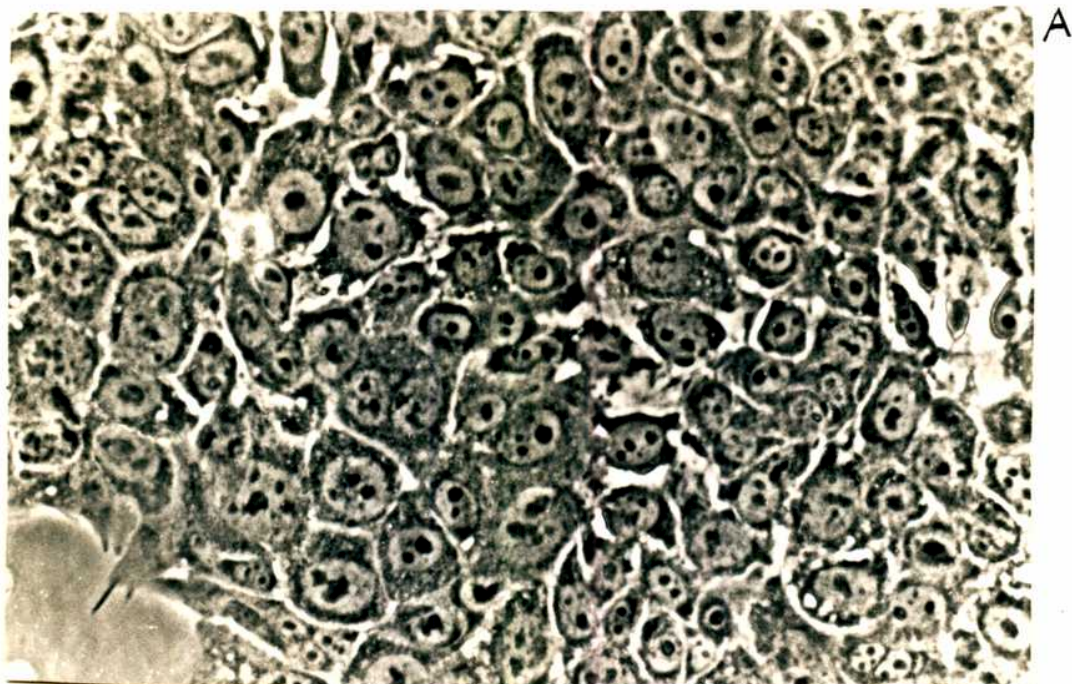
A



B

A. Cúmulos celulares recién sembrados.
B. Colonias epiteliales y fibroblastos (72 hs de cultivo).

Figura 14
Cultivo de la línea C4-HD enriquecido en células epiteliales



- A. Células epiteliales creciendo en monocapa.
B. Células epiteliales creciendo en múltiples capas.
(Microscopía de contraste de fase, 200 x).

Figura 15

Cultivo de la línea C4-HD enriquecido en fibroblastos.



Microscopía de contraste de fase. 200x

TABLA 5

Efecto del MPA sobre la incorporación de ^3H -timidina
en cultivos de C4-HD enriquecidos en células epiteliales

TRATAMIENTO	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3
	cpm \pm DS		
SFBch	7039 \pm 912	25790 \pm 4281	13261 \pm 2510
MPA10 ⁻¹² M	10539 \pm 2145**	27294 \pm 4425	-
MPA10 ⁻¹¹ M	12558 \pm 1881**	34030 \pm 5937*	21603 \pm 2351**
MPA10 ⁻¹⁰ M	13903 \pm 2617**	29316 \pm 5649*	-
MPA10 ⁻⁹ M	10679 \pm 2214**	34512 \pm 3661*	31498 \pm 5355**
MPA10 ⁻⁸ M	13637 \pm 2274**	35085 \pm 3616**	32717 \pm 3986**
MPA10 ⁻⁷ M	13776 \pm 2012**	30174 \pm 3330*	27119 \pm 1462*
MPA10 ⁻⁶ M	-	31062 \pm 8339	19970 \pm 3240

* p<0,05

** p<0,01

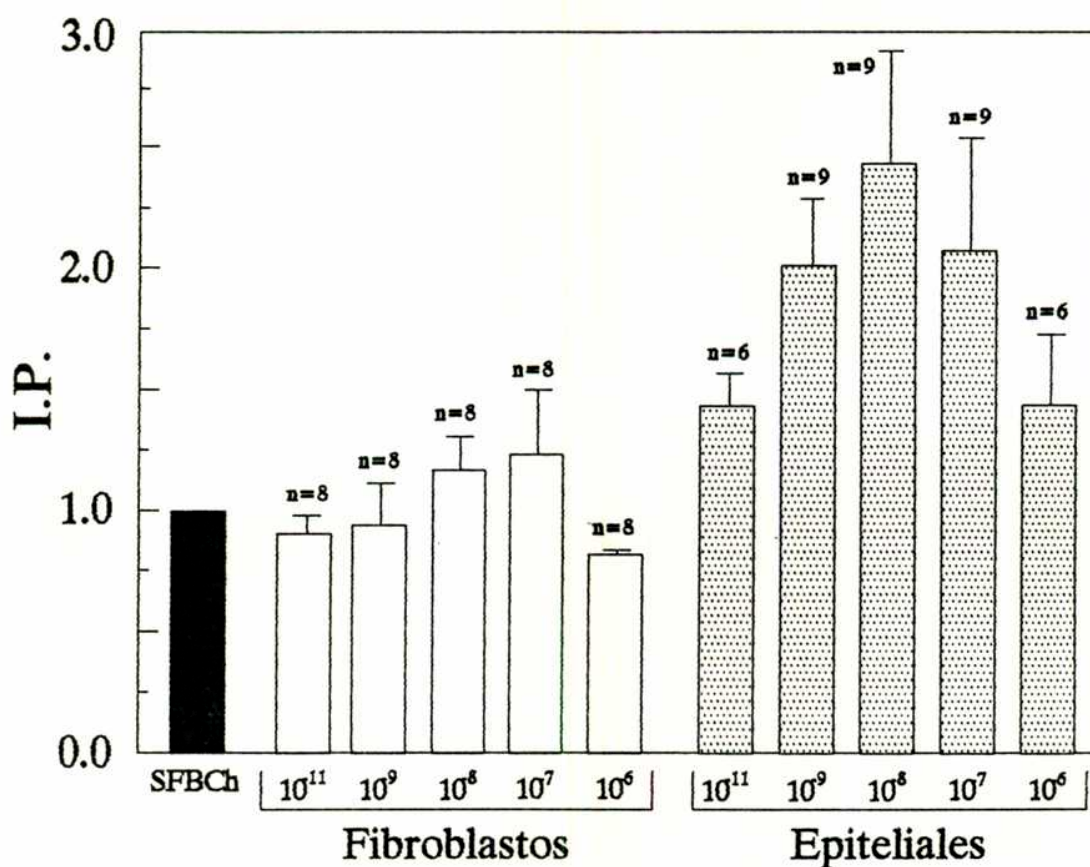
TABLA 6

**Efecto del MPA sobre la incorporación de ³H-timidina
en cultivos de C4-HD enriquecidos en fibroblastos**

TRATAMIENTO	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3
	opm±DS		
SFBch	10621±2067	7174±873	21185±531
MPA10 ¹² M		7099±523	
MPA10 ¹¹ M	9874±1417	6727±369	19022±912
MPA10 ¹⁰ M	19259±1416	7933±390	20109±793
MPA10 ⁹ M	9903±1746	7554±690	16768±499
MPA10 ⁸ M	11266±1860	8404±960	17848±592
MPA10 ⁷ M	10727±1496	9866±1080	18842±856
MPA10 ⁶ M	8984±1809		

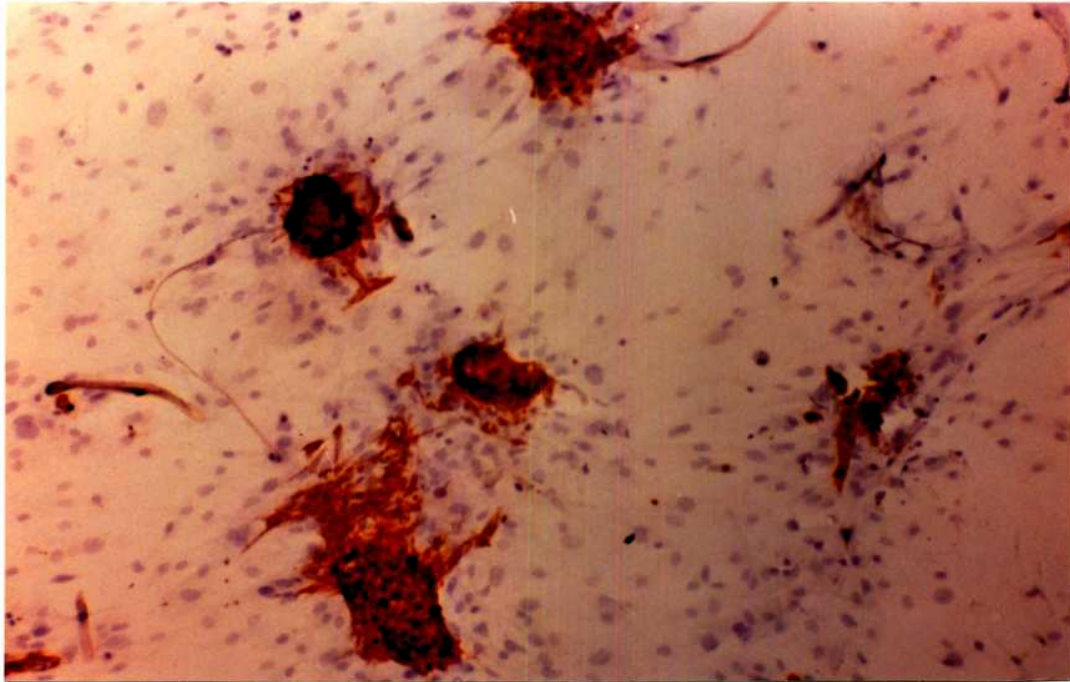
Figura 16

Efectos de MPA sobre la incorporación de ^3H -timidina de cultivos enriquecidos provenientes de la línea C4-HD.

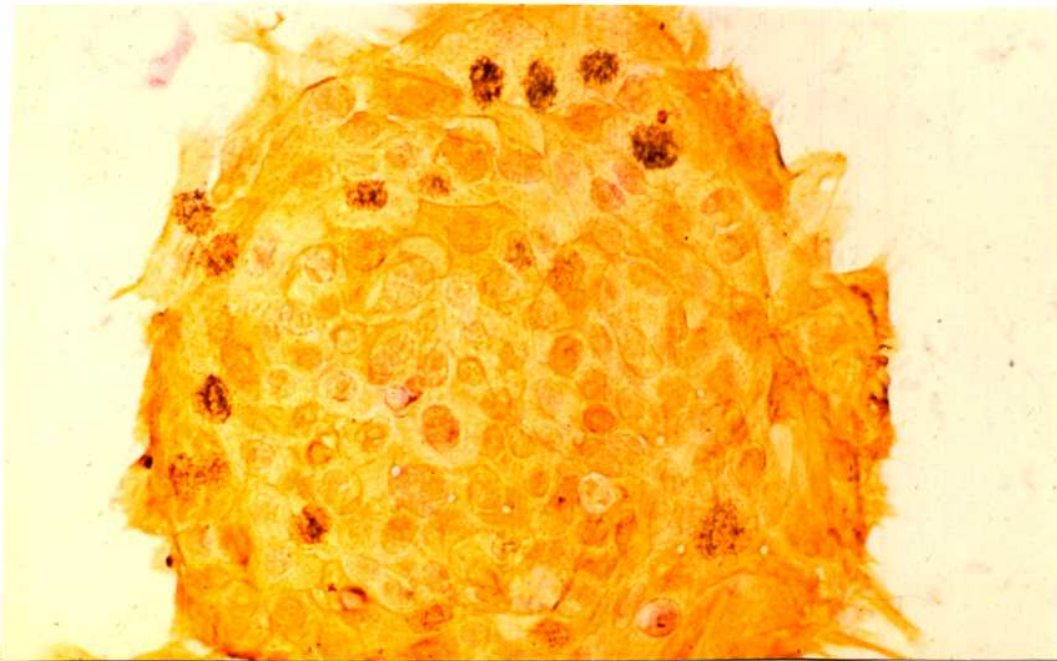


Los resultados se expresan como IP promedio de n experimentos.

Figura 17 Radioautografía



A



B

A. Islas epiteliales CK (+), rodeadas por fibroblastos CK (-). 10x
B. Isla epitelial CK (+) con incorporación de timidina. 1000x

Tabla 7

Efectos de MPA y E₂ sobre la proliferación celular de cultivos de C4-HD, evaluada por radioautografía.

TRATAMIENTO		Experimento 2	Experimento 2	Exp.1+2
		I.P.($\bar{X} \pm DS$) (Células marcadas/totales)		I.P.($\bar{X} \pm ES$)
EPITELIALES	CONTROL	0,055±0,03	0,050±0,01	0,052±0,002
	MPA10 ⁻¹¹ M	0,123±0,02**	0,131±0,02**	0,127±0,004**
	MPA10 ⁻⁸ M	0,108±0,01**	0,098±0,005*	0,103±0,05*
	MPA10 ⁻⁶ M	0,179±0,03***	0,181±0,001***	0,180±0,001***
	E ₂ 10 ⁻⁸ M	0,093±0,02		0,093
	E ₂ 10 ⁻⁷ M	0,043±0,02		0,043
FIBROBLASTOS	CONTROL	0,331±0,102	0,299±0,06	0,315±0,015
	MPA10 ⁻¹¹ M	0,257±0,03	0,199±0,05	0,191±0,066
	MPA10 ⁻⁹ M	0,282±0,07	0,280±0,16	0,278±0,003
	MPA10 ⁻⁶ M	0,282±0,04	0,270±0,06	0,279±0,003
	E ₂ 10 ⁻⁸ M	0,391±0,04		0,391
	E ₂ 10 ⁻⁷ M	0,354±0,04		0,354

*: p < 0,05

** : p < 0,01

***: p < 0,001

Los resultados se expresan como I.P.($\bar{X} \pm SD$) correspondientes a 2 experimentos realizados por triplicado. En la última columna se indican los I.P. promedio de ambos experimentos.

Figura 18

Efectos de MPA y E₂ en la proliferación celular de cultivos de la línea C4-HD, evaluada por radioautografía.

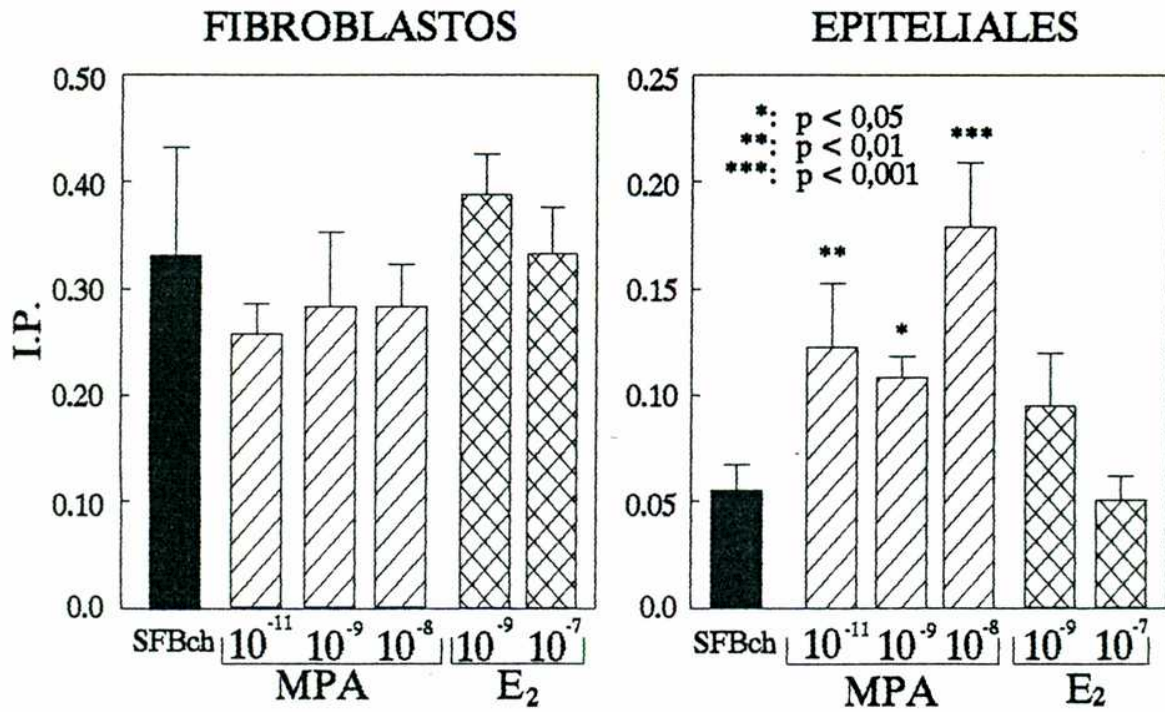


Figura 19 A

Receptores de estrógeno y progesterona.
Determinación en célula entera.

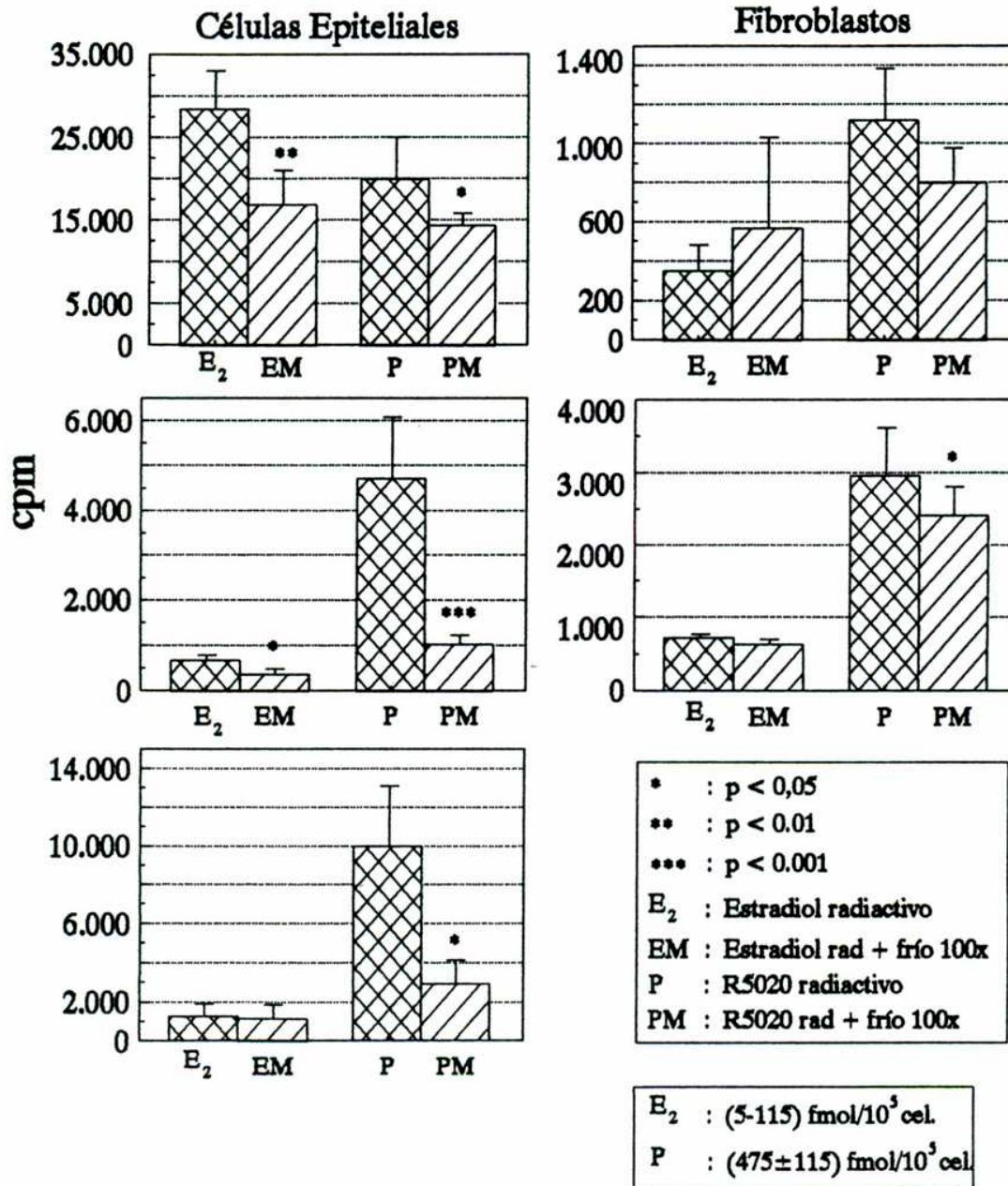


Figura 19 B
Receptores de estrógeno y progesterona.
Determinación en citosol.

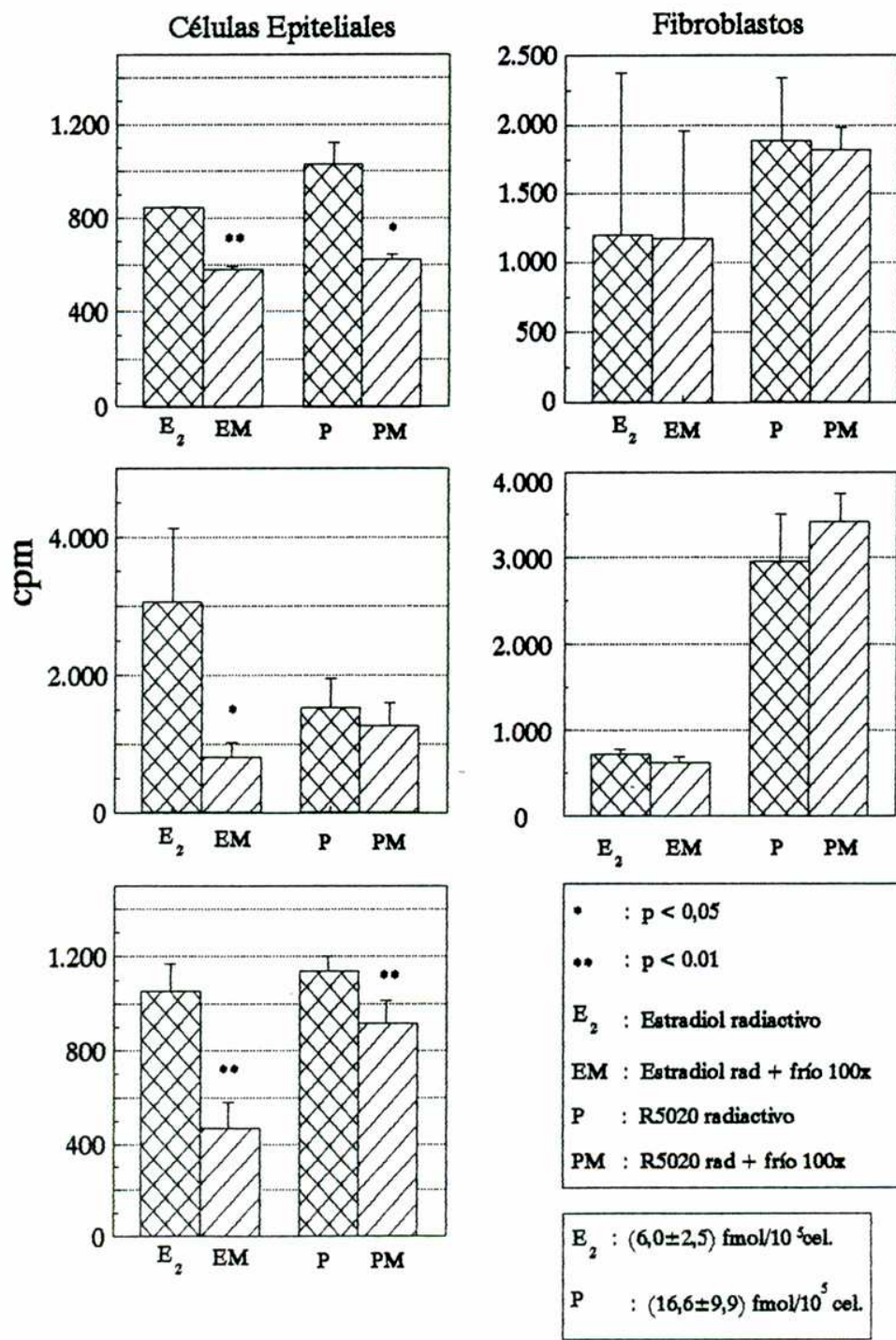


Tabla 8

Efectos de MPA y Pg sobre la proliferación de cultivos
epiteliales de la línea C4-HD

Tratamiento	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	
	cpm ± DS			
SFBCh	13261 ± 2510	28220 ± 5221	6944 ± 1268	
MPA 10E-11M	21603 ± 2351	36859 ± 5773*	13811 ± 3025**	} ns
Pg 10E-11M	32983 ± 8639**	36559 ± 11737	13714 ± 2714**	
MPA 10E-9M	31498 ± 5355**	46598 ± 8704**	14762 ± 3447**	} ns
Pg 10E-9M	37535 ± 6480**	39411 ± 5937**	10365 ± 3228*	
MPA 10E-7M	32717 ± 4986**	40736 ± 4405**	12067 ± 1968**	} ns
Pg 10E-7M	32983 ± 9870**	44976 ± 10115**	13401 ± 4818**	

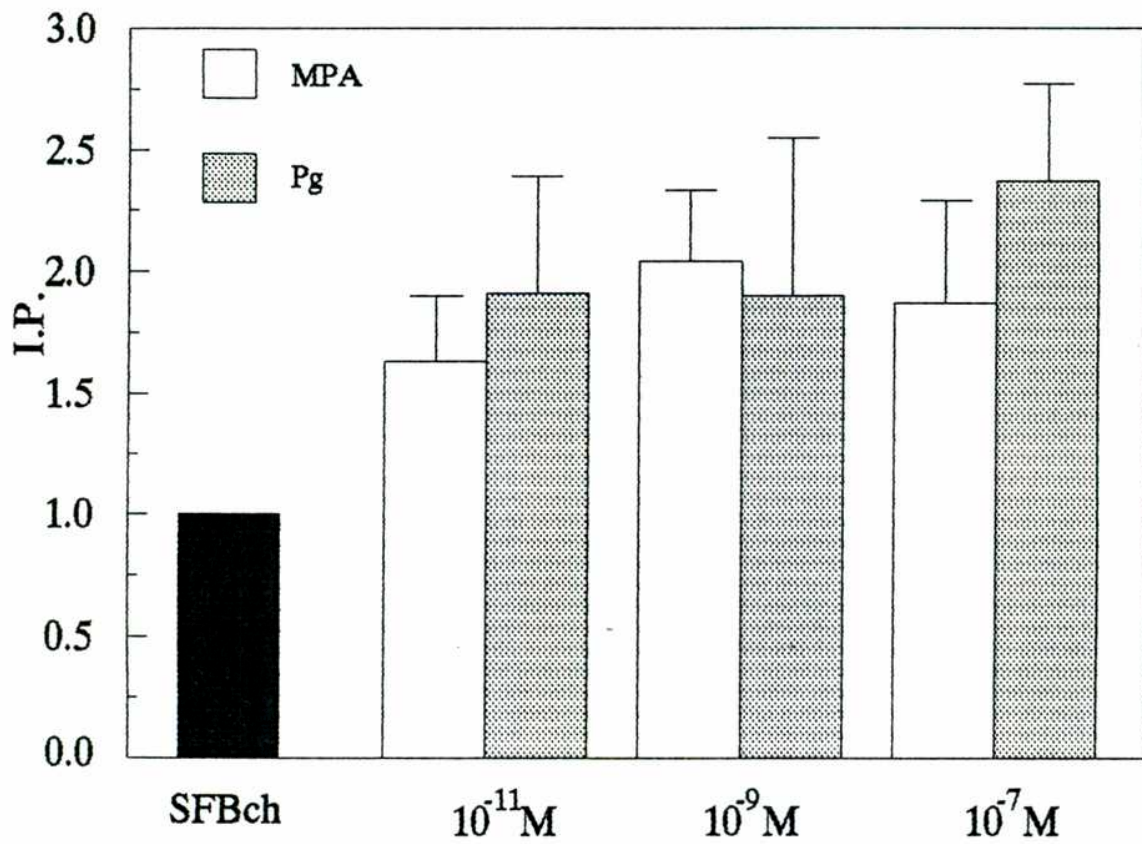
Tratamientos vs control: * : p < 0,05

** : p < 0,01

Tratamientos entre sí : Pg vs MPA: ns

Figura 20

Efectos de MPA y Pg sobre la proliferación de cultivos epiteliales de la línea C4HD



Los datos se expresan como I.P. promedio, correspondientes a 5 experimentos realizados.

Tabla 9

Efectos de MPA y Pg sobre la proliferación de cultivos de C4-HD evaluada por radioautografía.

TRATAMIENTO		Experimento 1	Experimento 2	I.P.
		$\bar{X} \pm DS$ (Células marcadas/totales)		$\bar{X} \pm ES$
EPITELIALES	CONTROL	0,055±0,03	0,050±0,01	0,052±0,002
	MPA10 ⁻⁴ M	0,123±0,03**	0,131±0,02**	0,127±0,004**
	Pg10 ⁻⁴ M	0,114±0,03	0,133±0,02**	0,123±0,009**
	MPA10 ⁻³ M	0,108±0,01**	0,098±0,005*	0,103±0,05*
	Pg10 ⁻³ M	0,154±0,03**	0,113±0,01*	0,133±0,02**
	MPA10 ⁻² M	0,179±0,03***	0,181±0,001***	0,180±0,001***
	Pg10 ⁻² M	0,139±0,02*	0,140±0,020***	0,139±0,0005**
FIBROBLASTOS	CONTROL	0,331±0,102	0,299±0,06	0,315±0,015
	MPA10 ⁻⁴ M	0,257±0,03	0,119±0,05	0,191±0,066
	Pg10 ⁻⁴ M	0,309±0,03	0,190±0,01	0,250±0,058
	MPA10 ⁻³ M	0,282±0,07	0,280±0,16	0,278±0,003
	Pg10 ⁻³ M	0,301±0,04	0,270±0,04	0,285±0,015
	MPA10 ⁻² M	0,282±0,04	0,270±0,06	0,279±0,003
	Pg10 ⁻² M	0,256±0,05	0,281±0,04	0,268±0,012

- *: p < 0,05
- ** : p < 0,01
- ***: p < 0,001

Los resultados se expresan como I.P. ($\bar{X} \pm DS$), correspondientes a 2 experimentos realizados por triplicado. La última columna muestra los I.P. promedio de ambos experimentos.

Figura 21

Efectos de MPA y Pg sobre la proliferación de cultivos de C4-HD evaluada por radioautografía.

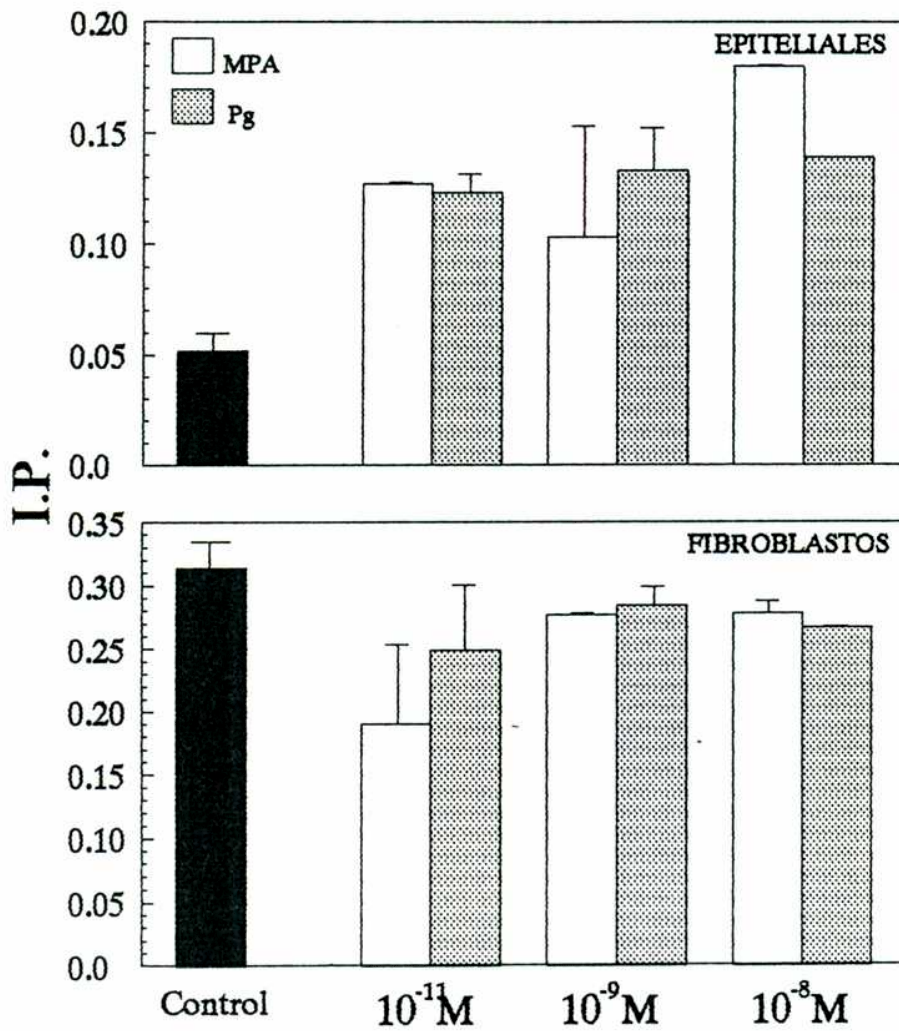


TABLA 10

Efectos de dexametasona y dihidrotestosterona sobre la incorporación de ³H-timidina en cultivos epiteliales de C4-HD

CONC.	HORMONA	N	CPM ($\bar{X} \pm DS$)
10 ⁹ M	MPA	8	1502 ± 328**
	Pg	7	1541 ± 461***
	DEX	8	716 ± 145
	DHT	6	850 ± 161
10 ⁷ M	MPA	4	2025 ± 131***
	Pg	4	1432 ± 109**
	DEX	7	1566 ± 456**
	DHT	7	793 ± 199
	CONTROL	8	823 ± 149

Tratamientos vs control: **: p < 0,01
***: p < 0,001

Tratamientos entre sí: MPA 10⁹ M vs DEX 10⁹ M: p < 0.001
MPA 10⁹ M vs DHT 10⁹ M: p < 0.01
MPA 10⁹ M vs Pg 10⁹ M : ns
MPA 10⁷ M vs DEX 10⁷ M: ns
MPA 10⁷ M vs DHT 10⁷ M: p < 0.001
MPA 10⁷ M vs Pg 10⁷ M : ns

Figura 22

Efectos de dexametasona y dihidrotestosterona sobre la incorporación de ^3H -timidina en cultivos epiteliales de C4-HD

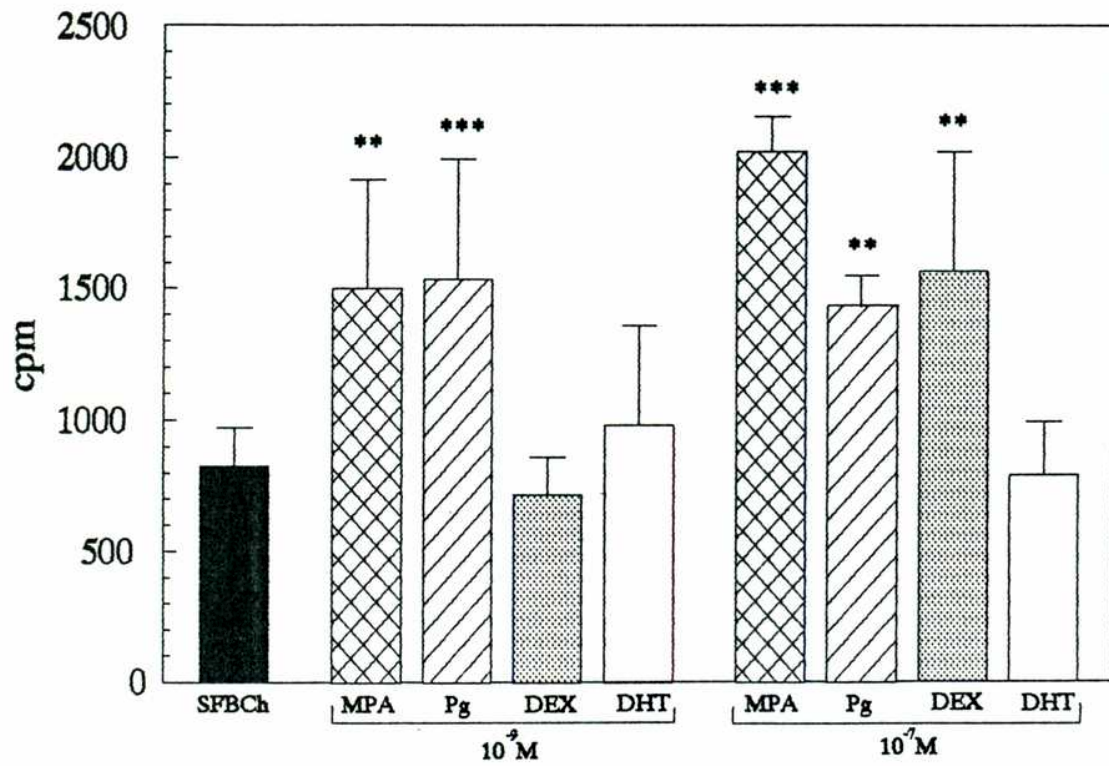


Tabla 11 A

Efectos de RU486 sobre la incorporación de ^3H -timidina en cultivos de la línea C4-HD tratados con MPA

Tratamiento		Experimento 1 cpm±DS	Experimento 2 cpm±DS	Experimento 3 cpm±DS
MPA				
	CONTROL	14984±4518	374±399	14449±797
—	RU486 10E-10M	768±409***		
	RU486 10E-9M	1392±372***	713±460	3314±895***
		35731±5847***	6196±2341***	28249±2249***
10^{-9}M	RU486 10E-10M	1384±193***		
	RU486 10E-9M	1509±346***	774±224	3558±631***

Tratamientos vs control:

Exp.1: MPA 10^{-9}M : p<0,001
 RU 10^{-10}M : p<0,001
 RU 10^{-9}M : p<0,001

Exp.2: MPA 10^{-9}M : p<0,001
 RU 10^{-9}M : ns

Exp.3: MPA 10^{-9}M : p<0,001
 RU 10^{-9}M : p<0,001

Tratamientos entre sí:

Exp.1: MPA 10^{-9}M +RU 10^{-10}M vs MPA 10^{-9}M :
 MPA 10^{-9}M +RU 10^{-9}M vs MPA 10^{-9}M :
 Exp.2: MPA 10^{-9}M +RU 10^{-9}M vs MPA 10^{-9}M :
 Exp.3: MPA 10^{-9}M +RU 10^{-9}M vs MPA 10^{-9}M :

p<0,001

Tabla 11 B

Efecto de la flutamida (OHF) sobre la incorporación de ³H-timidina en cultivos epiteliales de la línea C4-HD tratados con MPA.

TRATAMIENTO		Experimento 1 cpm±DS	Experimento 2 cpm±DS	Experimento 3 cpm±DS
-	Control	374±399	3504±1018	4155±1100
	OHF	2406±441**	4286±996	5673±272
MPA 10 ⁻⁶ M	Control	6196±2341***	9578±3503**	5296±1139*
	OHF	5645±1581***	7394±1535**	6741±901**
MPA 10 ⁻⁵ M	Control	-	-	6794±208**
	OHF	-	-	6829±2627**
MPA 10 ⁻³ M	Control	-	-	7111±1640**
	OHF	-	-	7146±2005**

Tratamientos vs control: * p < 0,05
 ** p < 0,01
 *** p < 0,001

Tratamientos entre sí: MPA + OHF vs MPA : ns

Figura 23

Efectos de RU486 y Flutamida sobre la incorporación de ^3H -timidina en cultivos epiteliales de la línea C4-HD.

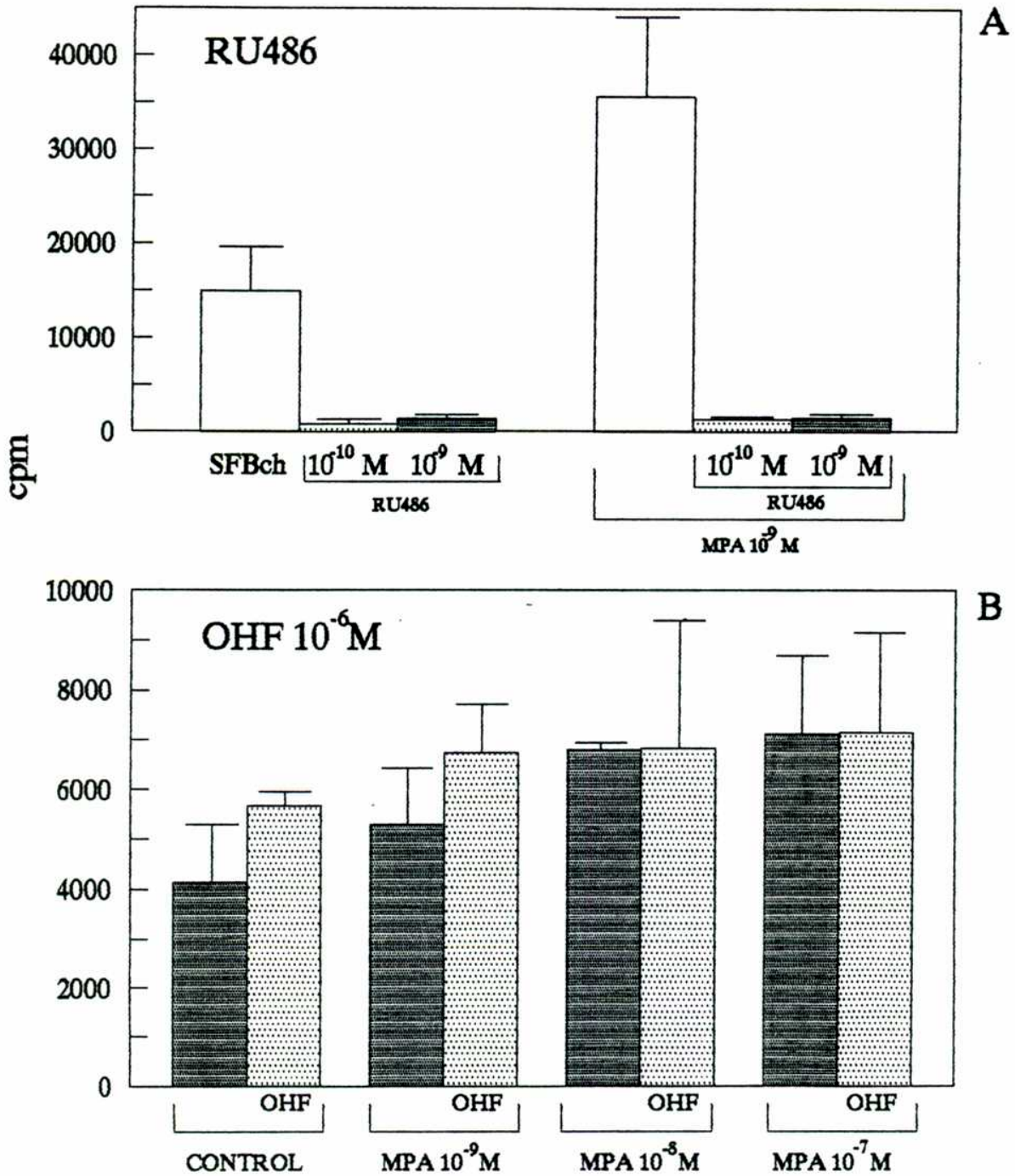


Tabla 12

Efectos de hormonas y antagonistas sobre la proliferación de cultivos de los tumores autónomos M3 y 55-HI.

Tratamiento	M3	55-HI	
SFBch	117371±4173	28103±6714	
MPA 10E-11M	111404±3065		
MPA 10E-9M	123065±4720	25164±2803	
MPA 10E-7M	107660±4918	30151±5634	
Pg 10E-11M	122698±17177	-	
Pg 10E-9M	107983±6843		
Pg 10E-7M	108290±3699	-	
E2 10E-11M	112420±10589	-	
E2 10E-9M	108809±4187	32809±7142	
E2 10E-7M	109621±1438	-	
DEX 10E-9M	117579±3542	-	
DHT 10E-9M	109976±1435	-	
RU486 10E-11M	111591±3499	-	
RU486 10E-9M	112289±4742	26135±1135	
RU486 10E-7M	101908±5937	-	
OHF 10E-6M	105266±3484	26042±7988	
MPA 10E-9M	+RU 10E-9M	105358±2808	32364±4981
MPA 10E-9M	+OHF 10E-6M	119786±3450	36559±6736
	Pg+RU 10E-9M	102836±3095	-

Figura 24

Efectos de hormonas y antagonistas sobre la incorporación de ^3H -timidina en cultivos de la línea autónoma M3

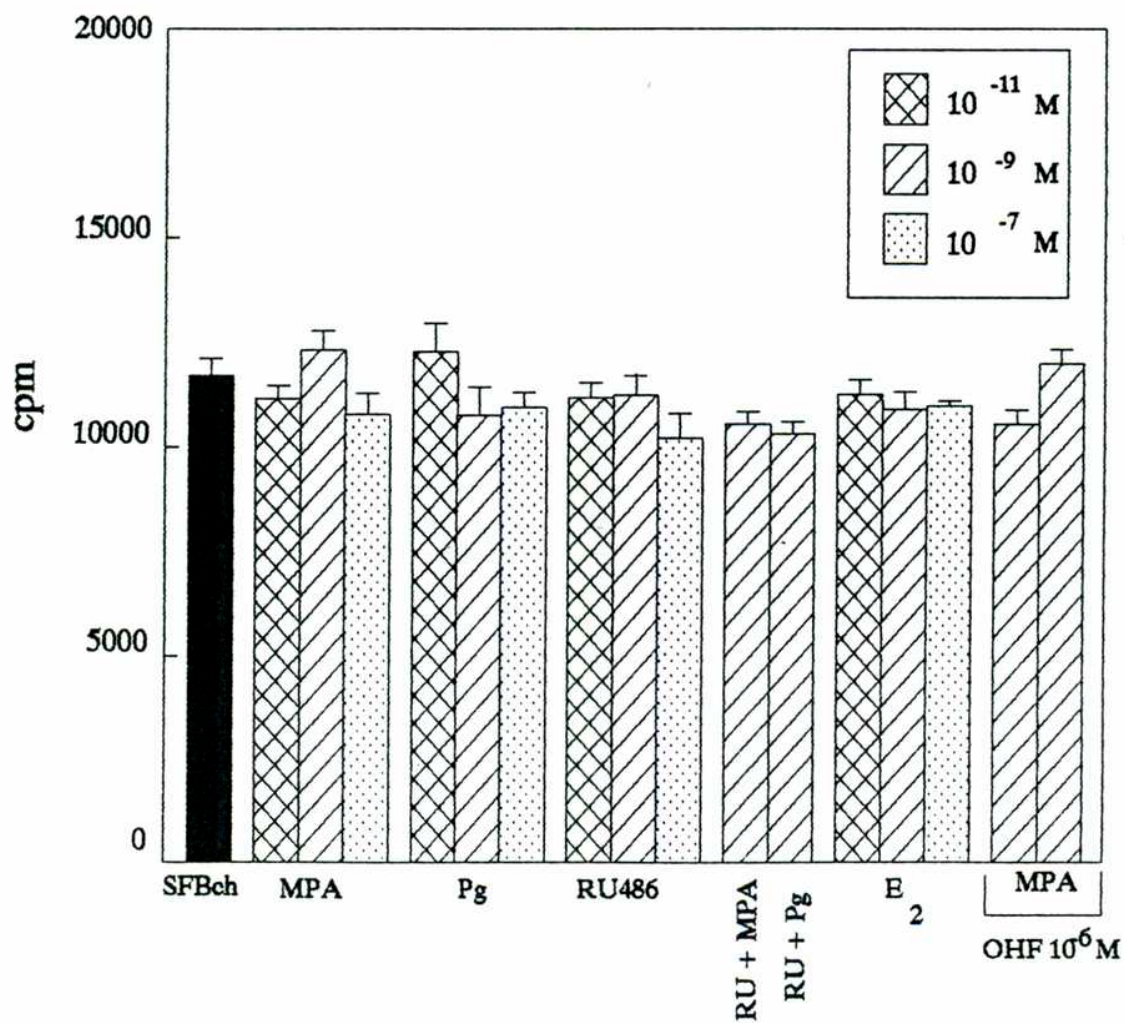


Figura 25

Efectos de hormonas y antagonistas sobre la incorporación de ^3H -timidina en cultivos de la línea autónoma 55-HI

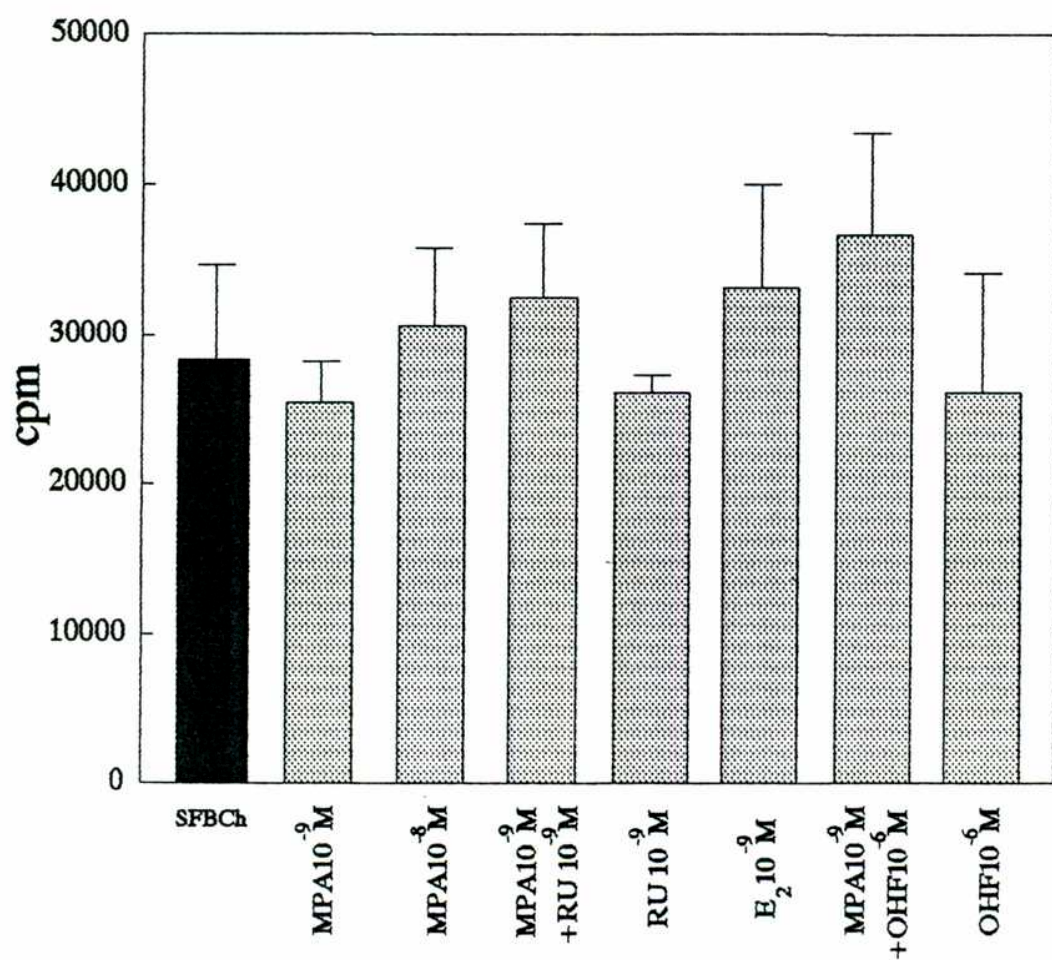


Tabla 13

Efecto de sueros de ratones ovariectomizados tratados (Ovx-MPA) o no (Ovx) con MPA sobre la incorporación de ³H-timidina de cultivos epiteliales de C4-HD

Tratamiento	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3
	cpm ± DS		
1. S(ovx)	1804±369	430±187	699±629
2. S(ovs) + MPA E10-9M	2619±327	1049±463	2660±671
3. S(ovx) + MPA E10-8M	3133±392	-	-
4. S(ovx) + MPA 10E-7M	3213±927	-	
5. S(ovx - MPA)	-	4233±1097	21727±1948
6. S(ovx - MPA)ch	1656±530	-	
7. S[(ovx - MPA)ch] + MPA 10E-9M	3675±832		
8. S[(ovx - MPA)ch] + MPA 10E-8M	4971±2315		
9. S[(ovx - MPA)ch] + MPA 10E-7M	5312±1285	-	-

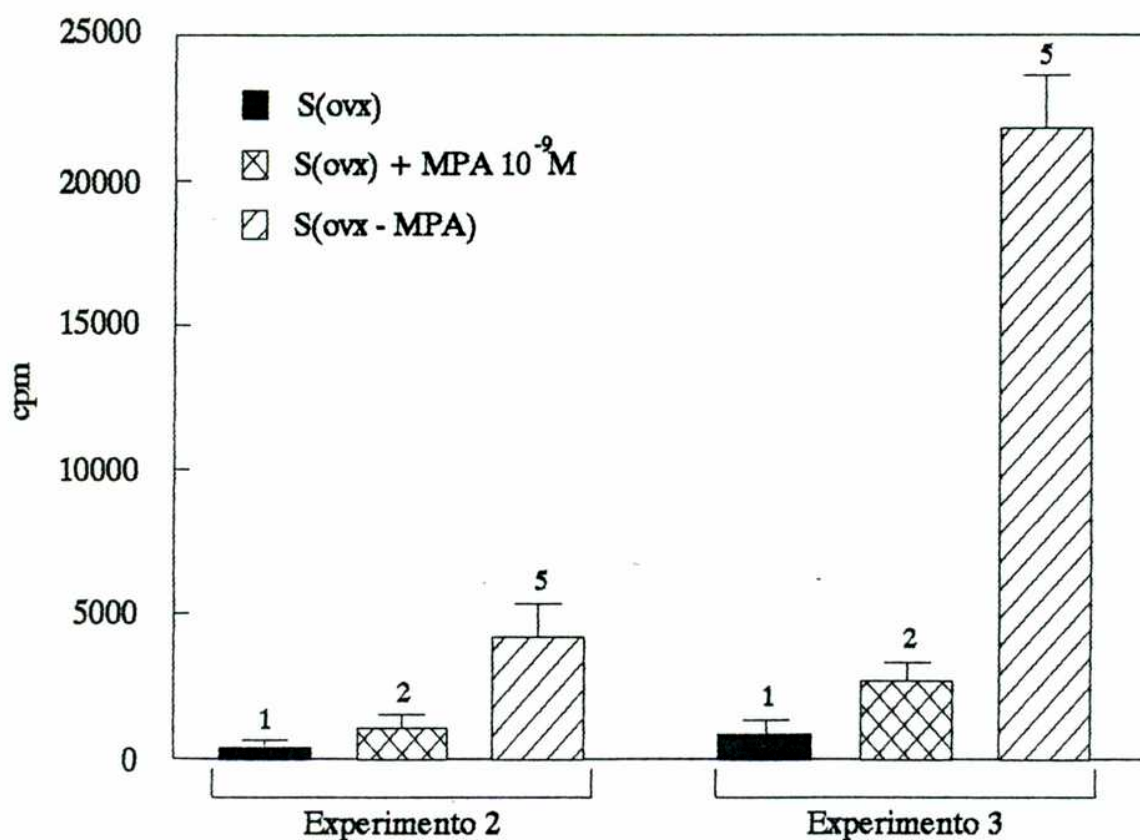
Experimento 1: 2, 3 y 4 vs 1: p<0,01
7 vs 6: p<0,05
8 y 9 vs 6: p<0,001

Experimento 2: 2 vs 1: p<0,05
5 vs 1: p<0,001
5 vs 2: p<0,05

Experimento 3: 2 vs 1: p<0,01
5 vs 1: p<0,001
5 vs 2: p<0,001

Figura 26 A

Efecto de sueros de ratones ovariectomizados tratados (Ovx-MPA) o no (Ovx) con MPA sobre la incorporación de ^3H -timidina en cultivos de C4-HD enriquecidos en células epiteliales.

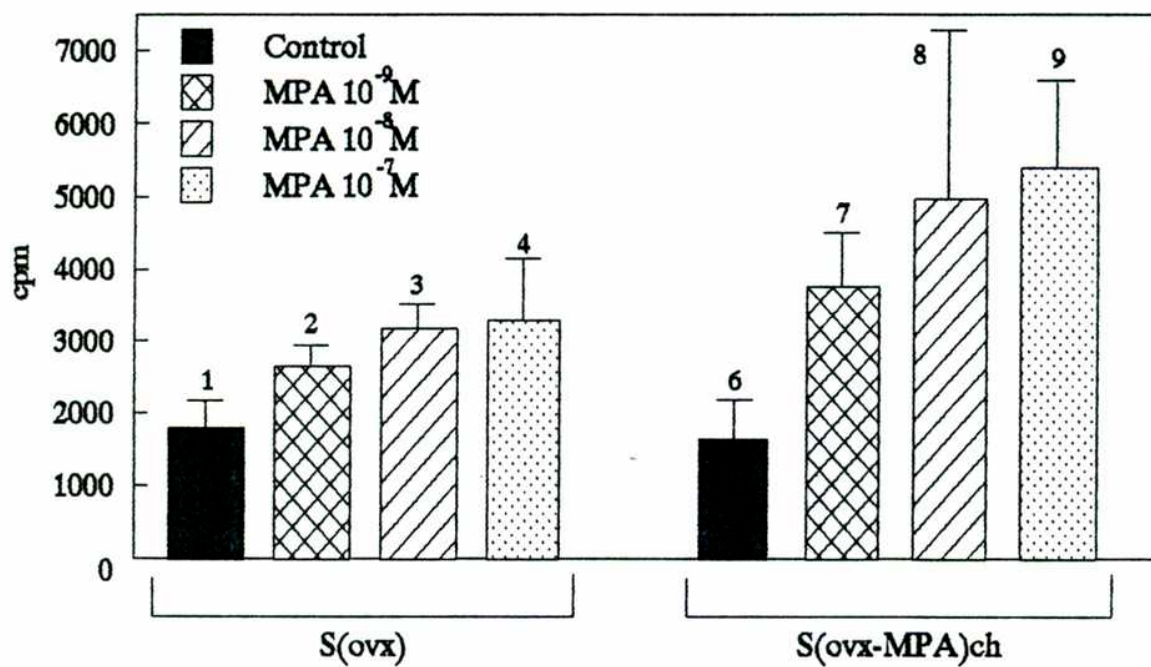


Tratamientos vs control: Exp.2: 2 vs 1:p<0,05 ; 5 vs 1:p<0,001
Exp.3: 2 vs 1:p<0,01 ; 5 vs 1:p<0,001

Tratamientos entre sí: Exp.2: 5 vs 2:p<0,05
Exp.3: 5 vs 2:p<0,001

Figura 26 B

Efecto del agregado de MPA al suero de ratones ovx, tratados con MPA, previamente adsorbido con carbón: S(ovx-MPA)ch



7 vs 2 : p<0,05

8 vs 3 : p<0,01

9 vs 4 : p<0,01

Figura 27

Cinética de crecimiento de tumores originados a partir del
inóculo de células en cultivo.

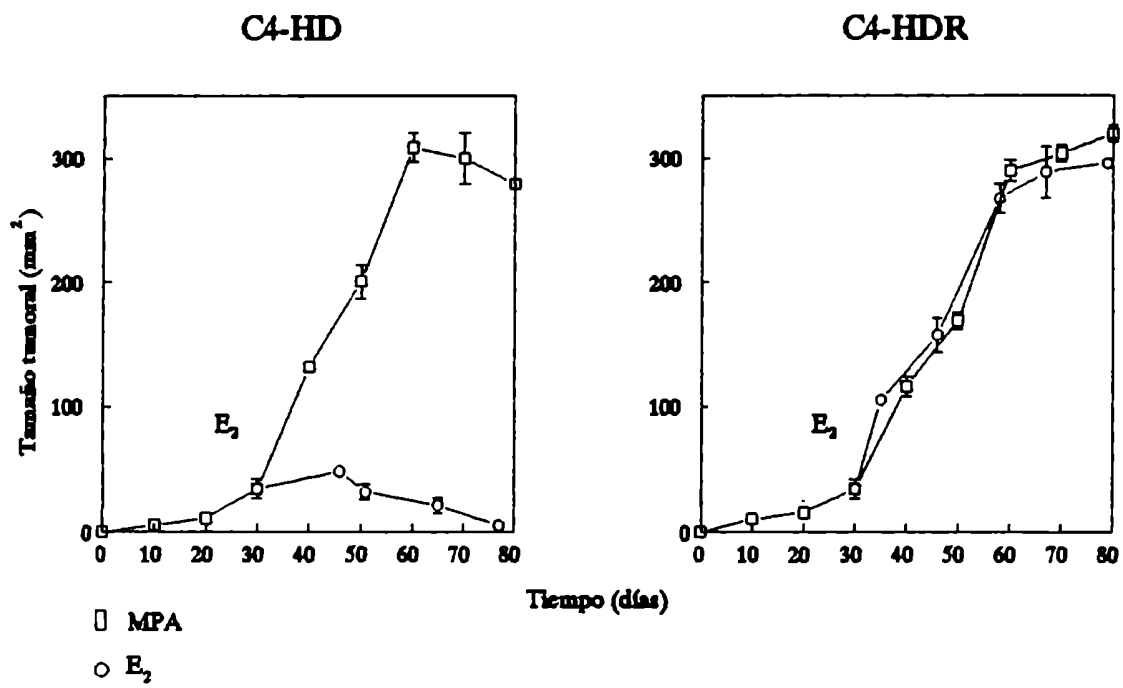


Tabla 14

Receptores para progesterona en distintas líneas celulares

Referencia	Línea celular	RP	RP (*) (sitios/cel)
Bergink, 1983	MCF-7	96000±30000 sitios/cel	96000±30000
Natoli, 1983	MCF-7	90000 sitios/cel	90000
Olea-Serrano, 1985	MCF-7	168000 sitios/cel 6 14 fmol/μg DNA	168000
Olea-Serrano, 1985	CAMA-1	3.4 fmol/μg DNA	40900
Olea-Serrano, 1985	ZR-75-1	4.2 fmol/μg DNA	50500
Taylor, 1984	MCF-7	3.7 fmol/μg DNA	44500
Vegeto, 1990	T47-D	122 fmol/mg prot	
Murphy, 1989	T47-D	3x10 ⁶ sitios/cel	3x10 ⁶
Van der Berg, 1990	ZR-75-1	81-1237 fmol/mg prot	

(*) Conversión realizada considerando 1 μg DNA = 5x10⁴ células

D I S C U S I O N

DISCUSION

En el año 1986 se demostró en nuestro laboratorio que la administración prolongada de acetato de medroxiprogesterona (MPA) a ratones hembra de la cepa BALB/c, inducía adenocarcinomas de mama con una incidencia actuarial del 76% y una latencia media de 52±2 semanas (Lanari, 1986a). El análisis histológico reveló que se trataba de carcinomas ductales, en su mayoría quísticos, infiltrativos y con distintos grados de diferenciación (Molinolo, 1987). Los tumores primitivos fueron transplantados en hembras singeneicas, obteniéndose diversas líneas tumorales. Algunas de ellas crecieron significativamente más rápido y con menor latencia en ratones tratados con MPA, demostrando un patrón de crecimiento hormonodependiente (HD). Otras, crecieron en forma autónoma u hormonoindependiente (HI) (Lanari, 1989). Tanto en las líneas HD como en algunas HI, no obstante, se demostró la presencia de altos niveles de RE y RP (Lanari, 1989). Esta observación, en coincidencia con lo descrito por otros autores (Murphy y col., 1991), indica que los tumores pueden adquirir un comportamiento autónomo aún cuando expresen receptores esteroideos.

Respecto de la regulación del crecimiento *in vivo* de estos tumores, se estableció que el MPA, en adición a su papel en la inducción tumoral, jugaba un rol importante en la promoción del crecimiento de las líneas tumorales HD; la Pg fue asimismo capaz de promover el crecimiento de dichos tumores, en forma similar al MPA. La mayoría de las líneas MPA-D conservaron, durante su crecimiento en los animales transplantados y a través de los sucesivos pasajes, la sensibilidad a las hormonas estimuladoras. La ovariectomía, por otra parte, inhibió significativamente el desarrollo tumoral (Kordon, 1990). Una marcada inhibición fue también observada ante el tratamiento con benzoato de estradiol (BE) o 17 β -estradiol (E₂), aún en ratones tratados con MPA o Pg. Este efecto inhibitorio afectó tanto a tumores HD como HI, positivos para RE, obteniéndose, sin embargo, variables resistentes a la inhibición estrogénica. Se

analizó, por último, el efecto de los andrógenos. Los hallazgos indicaron que los mismos no jugarían un rol significativo como reguladores del crecimiento tumoral (Kordon y col., 1991).

En numerosos modelos experimentales, incluyendo al presente, se han descrito tanto efectos carcinogénicos (Frank y col., 1979; Concannon y col., 1980; Sun, 1984; Danguy y col., 1980; Russo y col., 1989; Nagasawa y col., 1988), como teratogénicos (Prahada y col., 1985), inducidos por la administración del MPA. Los resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio, sugiriendo la capacidad del MPA de actuar como inductor y/o estimulador del desarrollo de adenocarcinomas mamarios, constituyen hallazgos sumamente interesantes, teniendo en cuenta el empleo de progestágenos como el MPA en una amplia variedad de protocolos terapéuticos aplicados al tratamiento de tumores de mama humanos (Sun, 1984; Campio, 1983; Cortés Funes, 1983).

Los motivos expuestos nos condujeron a explorar con mayor profundidad los mecanismos involucrados en la acción que ejercen los progestágenos sobre el desarrollo y crecimiento de los adenocarcinomas mamarios inducidos por MPA. En la regulación hormonal del crecimiento neoplásico se han propuesto mecanismos moduladores tanto **negativos** como **positivos**, **locales** -ejercidos ya sea directamente sobre las células tumorales o sobre el estroma-, o por el contrario, **sistémicos**, que comprometen a órganos distantes. Los modelos de tumores hormono-dependientes *in vivo*, sin embargo, no permite discernir la participación relativa de cada uno de dichos mecanismos. En este sentido, los cultivos primarios establecidos a partir de tumores constituyen una herramienta valiosa, ya que permiten el estudio de la acción hormonal sobre las células tumorales, eliminando las posibles interacciones con factores del huésped. El objetivo de este trabajo fue establecer un modelo experimental *in vitro*, representativo de los tumores inducidos por MPA, que permitiera el estudio de a) la capacidad de los progestágenos de promover de modo directo el crecimiento

tumoral y b) los mecanismos involucrados en la acción estimuladora mediada por los progestágenos.

El cultivo primario del cáncer de mama primitivo resulta sumamente dificultoso, hecho que se ve reflejado en la escasa variedad de líneas celulares provenientes de tumores sólidos (Smith, 1991). La línea celular humana más comunmente utilizada, MCF-7, deriva de un derrame pleural metastásico proveniente de un adenocarcinoma mamario (di Marco, 1980). En modelos murinos, han sido desarrollados cultivos primarios de carcinomas mamarios espontáneos, hormonoindependientes, de origen lobulillar (Paul, 1975). Los protocolos descritos en los mismos, sin embargo, no nos resultaron de utilidad para el establecimiento de los cultivos primarios a partir de los adenocarcinomas mamarios inducidos por MPA. Debido a ello, en la primera etapa del presente trabajo, se han determinado las condiciones óptimas de crecimiento *in vitro* de los cultivos primarios derivados de las líneas C4-HD y C4-HDR. En un primer grupo de experimentos, analizamos diversos procedimientos en función de su capacidad de lograr una efectiva disgregación de la masa tumoral y una alta recuperación celular. Los medios mecánicos no resultaron apropiados. Por otra parte, se observaron resultados variables al emplear diversas combinaciones enzimáticas (Tabla 1). El tratamiento de los tumores con colagenasa cruda (protocolo e), utilizado por el grupo de Limon para cultivos primarios de tumores de mama humanos (Limon y col., 1986; Pandis y col., 1992), resultó en la obtención de cultivos primarios con una alta proporción de células epiteliales y muy escasas células mesenquimáticas; no obstante, los resultados obtenidos no fueron regulares, ya que algunos lotes de colagenasa cruda mostraron ser tóxicos para nuestras células, hecho que coincide con datos de la bibliografía (Limon y col., 1986). Teniendo en cuenta esta dificultad, utilizamos una modificación de dicho método, empleando colagenasa tipo II y tripsina (protocolo f) en *buffer* fosfato suplementado con BSA. Las suspensiones celulares resultantes contuvieron una considerable proporción de fibroblastos, por lo

cual implementamos posteriormente protocolos que permitiesen la separación de las poblaciones epitelial y fibroblástica.

Para estudiar los efectos producidos por el agregado exógeno de hormonas sobre la proliferación celular *in vitro*, fue necesario excluir la presencia de hormonas y de otros potenciales mitógenos de los elementos constitutivos del medio de cultivo. El procedimiento utilizados en el presente trabajo, a tal efecto, es el empleo de medios de cultivo suplementados con SFB, previamente sujeto a un proceso de adsorción con carbón (SFBch). Este procedimiento es capaz de remover con gran eficiencia diversas moléculas de bajo peso molecular, entre ellas los esteroides y algunos factores de crecimiento (Rudland y col., 1980). En nuestro sistema hemos encontrado que concentraciones de 1% y 5% de SFBch fueron eficaces para mantener una adecuada viabilidad; sin embargo, la utilización de SFBch 5% fue la concentración óptima a los fines de permitir la detección de los efectos moduladores positivos y negativos de las hormonas, ejercidos sobre la proliferación celular (Figura 6).

Los efectos hormonales sobre la proliferación celular *in vitro*, descritos en el presente trabajo, fueron cuantificados mediante ensayos de incorporación de ³H-timidina. Es aceptado usualmente que la incorporación nuclear de ³H-timidina constituye una medida válida estimativa de la proliferación celular. Los estudios realizados por Rochefort y col. (Rochefort y col., 1980), no obstante, sugieren que algunas hormonas pueden afectar la incorporación de timidina de un modo no correlativo respecto de la proliferación celular. Este autor observó que la DHT era capaz de incrementar significativamente la incorporación de timidina al núcleo, en cultivos provenientes de tumores inducidos por NMU, sin modificar el índice de proliferación. Al analizar este aspecto en nuestro sistema, encontramos que la incorporación de ³H-timidina al núcleo se correlacionaba con el incremento del número de células, medido a través del recuento directo (Tabla 2).

En forma similar a lo observado por otros autores, los cultivos primarios que obtuvimos a partir de los tumores primitivos presentaron una gran heterogeneidad celular; la misma es atribuible no sólo a la presencia de distintas poblaciones de una misma progenie (células epiteliales en diversos estadios de diferenciación) (Heppner, 1983), sino también a la presencia de distintas estirpes celulares (células tumorales- epiteliales- y estromales). Dichas subpoblaciones expresan diferentes niveles de proliferación basal, así como distinto comportamiento frente a los tratamientos. La proporción de cada una de las poblaciones celulares, adherentes en los cultivos primarios, mostró un grado relativamente alto de variabilidad en los diferentes experimentos, lo cual indujo una considerable dispersión en los valores absolutos de proliferación evaluados a través de la incorporación de ³H-timidina. El empleo de diferentes porciones del tumor a fin de establecer los cultivos primarios y las diferentes características del proceso de disgregación tumoral, atribuibles a la heterogeneidad observada en los distintos lotes de enzimas empleadas, podrían contribuir asimismo a la dispersión de resultados obtenidos.

El objetivo central de la presente Tesis consistió en analizar los mecanismos a través de los cuales el MPA induce la promoción del crecimiento tumoral. Es importante destacar, en primera instancia, que el establecimiento de los cultivos primarios demandó la presencia de concentraciones nanomolares de MPA. En ausencia del progestágeno, los niveles de rendimiento celular se observaron disminuidos; en estas últimas condiciones, la recuperación celular fue insuficiente a los efectos de desarrollar los experimentos programados. Esta primera observación sugirió que en los cultivos primarios desarrollados *in vitro*, el MPA ejercía una acción estimuladora, similar a la observada *in vivo*.

Resultados posteriores confirmaron esta hipótesis. Al evaluar los efectos del MPA sobre la proliferación de cultivos mixtos provenientes de las líneas tumorales C4-HD y C4-HDR (Figuras 8 y 9)

se observó que el agregado exógeno de MPA producía, en ambos casos, un incremento en los niveles basales de proliferación. Mientras que en algunos de estos experimentos se encontró un aumento significativo de la proliferación con 1nM de MPA, en otros la concentración de progestágeno necesaria para obtener tales incrementos fue de 1 a 2 órdenes mayor (Tablas 3 y 4). Al repetir estos estudios en cultivos enriquecidos en células epiteliales (Tabla 5 y Figura 16), se observaron aumentos significativos en un rango más amplio de concentraciones de MPA, que incluía valores marcadamente menores (desde 0,001 a 100 nM). Pudo observarse además, que para cada concentración de MPA utilizada, los índices de proliferación (IP) obtenidos para cultivos enriquecidos en células epiteliales fueron superiores que aquéllos correspondientes a cultivos mixtos. Por el contrario, en los cultivos enriquecidos en células fibroblásticas, el MPA fue incapaz de modificar significativamente los niveles basales de proliferación (Tabla 6 y Figura 16). El hecho de que el efecto del MPA no fuera evidente para todas las concentraciones utilizadas sobre cultivos mixtos, podría explicarse por la presencia en ellos de fibroblastos, los cuales por tener una alta tasa de crecimiento basal (Figura 21) y ser ésta independiente de la presencia de MPA, podrían enmascarar la respuesta proliferativa de las células epiteliales. Los resultados obtenidos fueron luego confirmados a través de la realización de técnicas radioautográficas, desarrolladas en forma conjunta con marcación inmunohistoquímica (Figura 21). Los mismos sugieren que la acción promotora del crecimiento tumoral ejercida *in vivo* por el MPA se puede explicar, al menos parcialmente, a través de una acción directa de este progestágeno sobre las células que conforman el tumor. Por otro lado, permiten postular que las células epiteliales constituirían la población celular "blanco" de dicha acción.

Tal como se mencionó previamente, los estrógenos consituyen otro grupo de hormonas importante en la regulación del crecimiento *in vivo* de los adenocarcinomas de mama de nuestro modelo

experimental. Los mismos poseen la capacidad de producir la remisión de tumores HD, aún en presencia de las hormonas estimuladoras, MPA y Pg. En algunos experimentos *in vivo*, donde los animales fueron expuestos a estrógenos, surgieron variables resistentes a dicha inhibición, denominadas HDR. Los tumores C4-HD y C4-HDR, utilizados en este trabajo, son representativos de líneas sensibles y resistentes a la inhibición estrogénica *in vivo*, respectivamente. De modo similar a lo realizado en relación al MPA, investigamos si la inhibición estrogénica ejercida sobre la acción estimuladora del MPA, involucraba un efecto directo sobre las células tumorales. Con este propósito, se estudió la acción del E₂ sobre la proliferación de cultivos mixtos provenientes de las líneas tumorales C4-HD y C4-HDR, estimulados por MPA. Los resultados obtenidos (Figuras 10) indican que el E₂ revirtió la acción estimuladora inducida por el MPA en cultivos de la línea C4-HD. Es importante destacar que la actividad inhibitoria del E₂ se manifestó incluso en concentraciones dos órdenes de magnitud inferiores respecto de las empleadas para el MPA. Por el contrario, en cultivos de la línea estrógeno-resistente (C4-HDR), el MPA aumentó significativamente la proliferación aún cuando fue administrado conjuntamente con concentraciones equimolares de E₂ (Figura 11). El tratamiento con E₂ de los cultivos derivados de la línea C4-HD, por otra parte, no indujo modificaciones en los niveles de proliferación de fibroblastos y células epiteliales, evaluados a través de ensayos de incorporación de ³H-timidina y técnicas autorradiográficas (Figuras 10 y 18). En los cultivos derivados de la línea C4-HDR, no obstante, se observó una inhibición significativa de la incorporación de ³H-timidina frente a la administración de E₂ 10⁻⁷M. La naturaleza de tal inhibición no resulta clara. No obstante, las altas concentraciones de E₂ empleadas (dos órdenes superiores respecto del K_d del RE) plantean la posible participación de mecanismos de naturaleza inespecífica. En este trabajo no se estudiaron los mecanismos a través de los cuales el E₂ revierte la proliferación inducida por MPA. Existen trabajos realizados sobre células provenientes de carcinomas de

mama humanos que han demostrado que la administración de estrógenos podría modular la expresión de RP (Eckert y col., 1982; Nardulli y col., 1988; Vegeto y col., 1990). En nuestro modelo, evidencias previas indican que la acción de los estrógenos involucraría mecanismos independientes de aquéllos comprometidos en la estimulación inducida por MPA, ya que tumores HI, independientes del MPA para su crecimiento *in vivo*, también mostraron ser inhibibles por E₂ (Kordon y col., 1991). Una posible explicación para este fenómeno la podría constituir la modulación estrogénica de la expresión de factores de crecimiento presentes en el SFB. Previamente hemos demostrado que el MPA es capaz de regular negativamente la síntesis de TGFβ (Elizalde y col., 1990); la administración de estrógenos podría resultar en un aumento en la expresión de este factor inhibitorio, o de sus receptores, mecanismo que sería independiente de la presencia de RP.

Los resultados presentados indican que, al igual que lo observado respecto de la acción estimuladora del MPA, la inhibición de dicha estimulación inducida por los estrógenos *in vivo* sería inducida a través de una acción hormonal directa ejercida sobre las células epiteliales. En efecto, dicha población celular es la que modifica su tasa de proliferación en respuesta a la administración *in vitro* de MPA y E₂. Los efectos desencadenados por estas hormonas sobre la proliferación de células epiteliales, podrían estar mediados por su interacción directa con las mismas, y/o a través de su interacción con las células fibroblásticas. En este último sentido, es importante considerar que las observaciones realizadas *in vitro* fueron logradas a través de técnicas que involucraban el cocultivo de células epiteliales y fibroblastos; por lo tanto, una acción mediada por esta última población sobre la proliferación de las células epiteliales, no podría ser descartada. En dicho caso, resultaría probable que las células fibroblásticas respondan a la presencia de hormonas, si bien no variando sus niveles de proliferación, secretando factores capaces de modular la proliferación de las células epiteliales. Aún en los

experimentos realizados con cultivos enriquecidos en células epiteliales, la población remanente de fibroblastos podría ser suficiente a los fines de mediar este tipo de efectos regulatorios.

Numerosas evidencias sugieren la existencia de mecanismos parácrinos, a través de los cuales las células estromales podrían afectar la proliferación de las células neoplásicas. En ratones atímicos, se ha observado que el co-inóculo de células de la línea MCF-7 con fibroblastos provenientes de biopsias malignas, era capaz de aumentar tanto la toma como el crecimiento de los tumores originados (Picard y col., 1986; Horgan y col., 1987). En modelos desarrollados *in vitro* se ha demostrado, además, que el empleo de medios condicionados por fibroblastos estimulaba la proliferación de células tumorales mamarias, observándose este efecto sólo en el caso de células que expresasen RE, lo cual sugiere que las hormonas esteroideas se hallarían involucradas en la acción estimuladora (van Roozendaal y col., 1992; Ryan y col., 1993). No sólo los fibroblastos de origen mamario demostraron ejercer una estimulación parácrina sobre el crecimiento de células tumorales de mama; dicha estimulación se observó también en cocultivos de células tumorales con fibroblastos humanos provenientes de diversos órganos (Mukaida y col., 1991), medios condicionados por células de la línea 3T3 (Chetrite y col., 1993) o por estroma de tejidos adyacentes a la mama (van Roozendaal y col., 1992).

En vista de estas observaciones evaluamos, posteriormente, la presencia de receptores esteroideos en cada una de las poblaciones celulares presentes en los cultivos primarios. La detección inmunohistoquímica, combinada con marcación para las diferentes estirpes celulares (citoqueratina, vimentina), ha sido propuesta como una técnica relativamente sencilla para evaluar la distribución de receptores esteroideos *in vitro* (Taylor-Papadimitriou, 1987). Sin embargo, utilizando anticuerpos anti-RP y anti-RE, los cuales de acuerdo con referencias previas (Traish, 1990) reconocerían tanto aquellos receptores expresados por células

tivadores transcripcionales que interactúan fuertemente con el DNA. Por lo tanto, la fracción de receptores ocupados resultaría más resistente a la extracción (Press, 1989). Debido a la presencia continua de MPA, durante el período de establecimiento de los cultivos, parte de los receptores podrían encontrarse aún ocupados en el momento de la determinación.

Respecto de la población fibroblástica, los resultados obtenidos sugieren que la misma no expresa RP o RE. Los niveles significativos de RP en fibroblastos, detectados sólo en uno de los experimentos realizados, podría explicarse en función de la presencia de células epiteliales remanentes, las cuales analizadas por separado en el mismo experimento, mostraron una alta expresión de RP. La ausencia de RP y RE demostrada en los fibroblastos de nuestro sistema, coincide con hallazgos anteriores, demostrando que en biopsias de carcinomas mamarios, sólo las células epiteliales (tumoraes), expresan receptores esteroideos, mientras que el estroma que acompaña a los tumores no posee receptores (Petersen, 1987; Giani, 1993). Es importante destacar que esta particular distribución de receptores no es compartida por la glándula normal. En ella, las células estromales expresan un alto contenido de receptores hormonales (Daniel, 1987).

La expresión de receptores esteroideos por parte de las células de estirpe epitelial y su ausencia en células fibroblásticas, constituyen una fuerte evidencia acerca de que tanto el MPA como los estrógenos, ejercen sus efectos en forma directa, actuando sobre la población epitelial.

En adición al modelo presentado aquí, en diversos modelos, tanto humanos como murinos, se ha establecido que los progestágenos son capaces de modular el crecimiento de carcinomas de mama. En modelos humanos, es generalmente aceptado que la acción predominante de los progestágenos sobre el crecimiento de adenocarcinomas de mama es de naturaleza inhibitoria. Sin embargo,

si bien se han descrito efectos inhibitorios ejercidos por el progestágeno sintético R5020 en ausencia de estrógenos (Horwitz, 1985), la actividad de los progestágenos se halla generalmente asociada con una acción antagónica ejercida sobre la estimulación estrogénica (Vignon, 1983; Danguy, 1980). Más aún, se ha sugerido que en condiciones libres de estrógenos, los progestágenos son capaces de promover efectos estimulatorios sobre el crecimiento tumoral (Simon, 1984; Braunsberg, 1987; Hissom, 1989). En efecto, en experimentos llevados a cabo sobre dos líneas estrógeno-dependientes, ZR-75-1 (van der Berg, 1990) y T-47D (Hissom, 1987; Chamness, 1989), se ha demostrado que los progestágenos actúan como inhibidores de la proliferación celular en presencia de estrógenos; en ausencia de los mismos, por el contrario, muestran un efecto estimulatorio. En modelos murinos, por otra parte, existe sólo un reducido número de estudios relativos a la acción de los progestágenos *per se*, sobre el crecimiento de tumores de mama. En la mayoría de ellos, se describen acciones sinérgicas ejercidas sobre la estimulación inducida por hormonas hipofisarias como la PRL o por estrógenos (Van Nie, 1965; Matsusawa, 1975; Welsch, 1987; Robinson, 1987). En pocos trabajos, por otra parte, se han detectado efectos estimulatorios de la proliferación mediados por progestágenos, en ausencia de otras hormonas. Así, en experiencias *in vitro* llevadas a cabo en cultivos en agar derivados de tumores de mama hormono-dependientes inducidos por NMU, se observó que tanto la Pg como el R5020, estimulaban la formación de colonias al ser empleados a concentraciones nanomolares (Manni y col., 1987). A concentraciones mayores, no obstante, ambas drogas indujeron el efecto contrario (Manni y col., 1988). En forma similar a lo observado en nuestro modelo experimental, la promoción del crecimiento tumoral por progestágenos, ha sido descrita por Yanai y Nagasawa (Nagasawa, 1988), quienes observaron que la administración de Pg a ratones de las cepas SHN y GR/A, portadores de carcinomas mamarios espontáneos, era capaz de inducir un incremento significativo en el TLI de dichos tumores. Posteriormente Watson y col. demostraron que el crecimiento de

adenocarcinomas mamarios ovario-dependientes MXT (modelo desarrollado en hembras F₁ C57/DBA portadoras de un trasplante hipofisario en la cápsula renal), es promovido por dosis fisiológicas de Pg (Watson, 1977; Kiss, 1986a y 1986b). Más aún, se ha observado que la administración *in vivo* de antiprogestágenos como ZK 98299, RU486 (Michna y col., 1989; Schneider y col., 1989) y onapristona (Michna y col., 1990), bloquea el crecimiento de diversas clases de tumores de mama experimentales.

Los mecanismos de acción mediante los cuales los progestágenos modulan el crecimiento tumoral, han sido estudiados fundamentalmente en modelos humanos. En los mismos se postula la intervención de diversos sistemas de receptores. Como fue referido en la sección Introducción, los derivados sintéticos de la Pg, entre ellos el MPA, presentan alta afinidad por los receptores de Pg (PR), así como también por los de andrógenos (RA) (Bullock, 1975; Bardin, 1975; Labrie, 1977; Perez-Palacios, 1981) y glucocorticoides (RG) (Briggs, 1973; Mattsson, 1983; Blosey, 1984). En el tejido mamario, además de RE y RP, se ha descrito la expresión de RA y RG en un número sustancial de biopsias y líneas celulares establecidas (Poulin y col., 1989). La documentada correlación existente entre la presencia de RP en ciertas biopsias mamarias y la respuesta a la terapia hormonal, ha constituido clásicamente una evidencia de la acción inhibitoria de los progestágenos ejercida a través de este receptor. Numerosos hallazgos experimentales apoyan esta hipótesis; mediante estudios de competencia, ha sido demostrado que el R5020 inhibe la proliferación de células tumorales tanto *in vivo* como *in vitro*, a través de su interacción con los RP (Chalbos, 1982; Vignon, 1983; Horwitz, 1985). Sin embargo, existe también un amplio número de casos en que dicha correlación no es estricta (Dao, 1982; Jones, 1987; Sutherland, 1988; Chamness, 1989). Una posible explicación, la proveen evidencias acerca de que los progestágenos podrían, adicionalmente, inhibir la proliferación celular a través de efectos no progestacionales. Sutherland y col. (1988), trabajando

con cinco líneas tumorales RP(+), observaron que los niveles máximos de inhibición del crecimiento inducidos por MPA para cada una de ellas, no correlacionaban con los niveles de RP expresados. Van der Berg y col. (1990) demostraron que el MPA era capaz de inducir efectos inhibitorios similares sobre dos variantes de la línea tumoral ZR-75-1, una de ellas con niveles muy bajos de PR y la otra con niveles 20 veces superiores. Ambos hallazgos sugieren que el MPA estaría ejerciendo los efectos antiproliferativos a través de mecanismos que no comprometan al RP. Confirmando esta hipótesis, se han demostrado acciones inhibitorias del MPA mediadas a través de los RA expresados por células de la línea de carcinoma humano ZR-75-1 (Poulin, 1989; Poulin, 1991) y más recientemente, en la línea MFM-223, carente de RP (Hackenberg y col., 1993). Por otro lado, la participación de los RG en la inhibición inducida por MPA ha sido descrita en la línea MCF-7 (Braunsberg y col., 1987), y ZR-75-1 (Poulin, 1989).

En nuestro sistema, la presencia de altos niveles de RP expresados por células epiteliales sugería que la acción del MPA podría involucrar una acción de naturaleza progestacional. No obstante, teniendo en cuenta las evidencias discutidas en los párrafos anteriores, fue necesario examinar la participación de otros potenciales mecanismos en la actividad estimuladora del MPA. Con este propósito, se evaluaron los efectos sobre la proliferación de células epiteliales derivadas de la línea C4-HD, inducidos por los ligandos naturales de los RP y RA (Pg y DHT, respectivamente), y por un glucocorticoide sintético, de alta afinidad por el RG (dexametasona). Por otro lado, la interacción del MPA con los sistemas de receptores involucrados, fue evaluada mediante el uso de los antagonistas esteroideos RU486 y OHF. El RU486 (11 β -(4-dimetil-amino-fenil)-17 β -hidroxi-17 α -(prop-1-inil)-estra-4,9-dien-3-ona) es un análogo esteroideo y potente antagonista de glucocorticoides y progesterona. En concentraciones nanomolares se une con gran afinidad tanto al RG como al RP, compitiendo con sus ligandos naturales (Philibert, 1984). La acción antagónica del

RU486 involucraría, a) la prevención de la transformación del receptor y/o b) la interferencia de la interacción del receptor unido al DNA con el complejo transcripcional. Ha sido sugerido que el RU486 ejercería su acción antiglucocorticoidea actuando a ambos niveles, mientras que su efecto antiprogestagénico parecería estar asociado sólomente con el segundo mecanismo de acción (Beck y col., 1993). Por otro lado, el RU486 también posee una débil acción antiandrogénica, y antagonizaría con el RA a concentraciones mayores que aquéllas a las que interactúa con los RP y PG (Baulieu, 1987). La hidroxiflutamida (OHF), por otra parte, constituye un potente antagonista androgénico no esteroide, monoespecífico, que interactúa con el RA a concentraciones micromolares (Poulin, 1989).

Los resultados obtenidos indicaron que la Pg resultó capaz de promover la proliferación celular de un modo análogo al MPA, tanto en lo que respecta a las dosis estimulatorias (Tabla 8 y Figuras 20), como en lo relativo a la naturaleza de la población celular "blanco" de su acción (Tabla 9 y Figura 21). La DHT y la dexametasona, por otra parte, no alteraron la proliferación de células epiteliales, cuando fueron administradas en concentraciones del orden del Kd de sus respectivos receptores (1 nM) (Tabla 10 y Figura 22). Considerados en conjunto, estos hallazgos sugieren la naturaleza progestacional de las acciones mediadas por el MPA. En los ensayos de competencia realizados, se observó que el RU486, a bajas concentraciones (0,1 y 1 nM), produjo una reversión de la acción del MPA (Figura 23 A). Ello sugeriría, nuevamente, que el RA no se encuentra comprometido en los efectos del progestágeno, ya que como se mencionó en forma previa, la interacción del RU486 con los RA tendría lugar a concentraciones mayores. Esta presunción se vio confirmada, además, por la incapacidad de la OHF 1 uM de revertir la estimulación inducida por diversas concentraciones de MPA (Figura 23 B).

Considerados en su conjunto, los resultados previamente expuestos indicarían que a) el MPA actuaría incrementando la

proliferación de sus células "blanco", mediante una acción **progestacional**, comparable con aquella desencadenada por su contraparte natural, Pg; b) la estimulación inducida por MPA se encontraría **mediada fundamentalmente a través de los RP** y no involucraría a los RG y RA.

En esta serie de experimentos, sin embargo, hemos obtenido algunos resultados conflictivos. Si bien la incapacidad de la dexametasona 1nM de modificar las tasas de proliferación de las células epiteliales, sugiere que dicha población no es sensible a la acción de glucocorticoides, la administración de dexametasona 100nM produjo un incremento significativo en los niveles de proliferación, similar al mediado por la Pg (Tabla 10). Teniendo en cuenta que los RP y RG presentan cierto grado de homología (Hollenberg, 1985), y que a concentraciones farmacológicas, los glucocorticoides son capaces de inducir respuestas celulares a través de los RP (Rouseau, 1973; Lippman, 1977), este hallazgo podría ser atribuido a una acción del glucocorticoide producida a través del RP. Por otro lado, hemos observado que, en algunos experimentos, el RU486 produjo una marcada inhibición en los niveles de proliferación basal (grupos experimentales no tratados con progestágeno) (Tabla 11 A, experimentos 1 y 3); esta inhibición no fue evidente en los experimentos donde dichos niveles fueron muy bajos (Tabla 11 A, experimento 2). Una potencial citotoxicidad del compuesto resultaría improbable, ya que al ensayar su efecto sobre otras líneas tumorales hormono-independientes no se observó inhibición (Figuras 24 y 25). Dado que dichas líneas no presentan receptores esteroideos, esta observación sugiere que los efectos inhibitorios del antagonista sobre células derivadas de C4-HD involucrarían la mediación de receptores hormonales. No obstante, estos hallazgos podrían encontrar una explicación alternativa. En efecto, no puede descartarse la posibilidad de que el RU486 pueda ejercer *per se*, un efecto inhibitorio sobre la proliferación celular. En este sentido, es importante señalar que para ciertos antagonistas hormonales, tales como el Tamoxifen (Freiss, 1993), ha

sido demostrada su capacidad de ejercer efectos modulatorios *per se*, fenómeno que se manifiesta en ausencia de hormonas estimuladoras. Esta hipótesis, no ha sido analizada en el presente trabajo.

Los cultivos primarios establecidos a partir de los adenocarcinomas C4-HD y C4-HDR resultaron ser un modelo apropiado para el estudio del mecanismo de la acción hormonal, dado que las células epiteliales retuvieron sus receptores hormonales y la capacidad de responder a señales estimuladoras e inhibitorias de la proliferación. Las características morfológicas y de crecimiento *in vitro* de las células epiteliales y fibroblásticas (Figuras 14 y 15), así como la capacidad de las primeras de proliferar en medio de cultivo semisólido, sugieren fuertemente que las células epiteliales constituirían la población transformada en nuestro sistema, mientras que los fibroblastos presentarían un fenotipo no tumoral. Esta hipótesis fue confirmada posteriormente. En efecto, al inocular ratones BALB/c tratados con MPA con células provenientes de cultivos enriquecidos en células epiteliales, se observó el desarrollo de adenocarcinomas de mama con el mismo patrón de crecimiento que expresaran las líneas parentales (Figura 27). No se observó desarrollo de tumores, por otra parte, al inocular células provenientes de cultivos enriquecidos en fibroblastos. Es importante destacar que en nuestro modelo, la metodología general empleada en los pasajes singéneos de los tumores (descrita en la sección **Materiales y Métodos**) hace posible el hecho de que, al menos parte del estroma que acompaña el crecimiento tumoral, se halle compuesto por fibroblastos del huésped, y no por aquéllos involucrados en la génesis del tumor.

Numerosos trabajos han demostrado que la producción de factores de crecimiento, de naturaleza autócrina, parácrina y/o endócrina, juegan un papel crítico en los mecanismos responsables de la estimulación hormonal del crecimiento tumoral. Los resultados obtenidos en el presente trabajo, no excluyen la potencial

participación de tales mecanismos en la estimulación del crecimiento tumoral inducida por el MPA. En efecto, más allá de su acción directa, el MPA podría actuar induciendo la producción de factores de crecimiento, por el propio estroma del tumor o por órganos distantes, capaces de promover el crecimiento tumoral. Con el objetivo de investigar la participación de tales factores en el proceso del crecimiento tumoral estimulado por el MPA, se implementó un sistema *in vitro*, en el cual las células epiteliales derivadas de la línea C4-HD, fueron cultivadas en presencia de suero de ratones ovariectomizados (carentes de progestágenos endógenos), tratados -[S(ovx-MPA)]- o no -[S(ovx)]- con MPA. Es importante destacar los resultados previos obtenidos *in vivo* en nuestro laboratorio, demostrando que en ratones ovx, los tumores no se desarrollaban, pudiéndose revertir el efecto de la ovariectomía mediante la administración de MPA (Kordon, 1990).

Los resultados (Tabla 13; Figura 26 A) indicaron que el medio suplementado con [S(ovx-MPA)] produjo un notable incremento en los niveles de proliferación celular, mayor no sólo que el observado en presencia del suero control, [S(ovx)], sino también que aquél inducido por el [S(ovx)] suplementado exógenamente con MPA 1nM -[S(ovx)+MPA]- (Tabla 13, experimentos 2 y 3; Figura 26 A). La mayor estimulación inducida por [S(ovx-MPA)], respecto del [S(ovx)+MPA], difícilmente podría ser explicada en función de diferencias en las concentraciones de MPA presentes en cada una de ellos. En efecto, los resultados *in vitro* mostrados anteriormente (Tabla 5 y Figura 16) indicaron que la respuesta proliferativa de las células tumorales no varió significativamente para un amplio rango de concentraciones de MPA. Por otra parte, los resultados obtenidos en estudios anteriores (Molinolo, 1987) indicaron que los niveles séricos de MPA presentes en los animales tratados con este progestágeno, se hallaron comprendidos en el rango de 40-100 ng/ml; estas concentraciones son similares a las añadidas exógenamente al [S(ovx)] en nuestros ensayos.

El efecto observado podría explicarse considerando la posibilidad de que el MPA induzca la producción de factores séricos capaces de estimular la proliferación de las células tumorales. Dichos factores no se encontrarían presentes en los sueros de animales no tratados, [S(ovx)], lo cual indicaría que su síntesis y/o liberación podría estar regulada por el MPA. Los mismos podrían actuar *per se*, o requiriendo la presencia del MPA. Para analizar este punto, empleamos suero de animales tratados con MPA, sujeto previamente a un proceso de adsorción con carbón -[S(ovx)-MPA]ch-, realizado con el objeto de eliminar el MPA sérico. Los resultados indicaron que la estimulación del crecimiento inducida por el [S(ovx)-MPA]ch no difirió significativamente de aquella observada para el suero control -[S(ovx)]- (Tabla 13, experimento 1; Figura 26 B). Ello sugiere que los factores inducibles por MPA no mostrarían acción estimuladora *per se*. No obstante, la confirmación de tal hipótesis requería descartar la posibilidad de que el pretratamiento con carbón, más allá de eliminar al MPA, excluyera también a los potenciales factores en estudio. Ello fue analizado suplementando tanto el [S(ovx)-MPA]ch como el [S(ovx)] con MPA exógeno. Los resultados obtenidos, empleando tres concentraciones diferentes de MPA como suplemento exógeno, indican que, para todos los casos, los niveles de proliferación inducidos por [S(ovx)-MPA]ch fueron superiores a los inducidos por [S(ovx)] (Tabla 13, experimento 1; Figura 26 B).

Los hallazgos mencionados sugieren que, más allá de su acción directa sobre la proliferación de las células neoplásicas, el MPA podría inducir, además, la producción parácrina y/o endócrina de factores de crecimiento, capaces asimismo de estimular el crecimiento tumoral en presencia de MPA.

Hallazgos realizados en otros laboratorios, en diversos modelos de adenocarcinomas de mama experimentales, han indicado que la acción promotora hormonal sobre el crecimiento tumoral involucra la participación de factores de crecimiento (GF), los cuales

ejercerían una acción mitogénica sobre las células tumorales (Lippman, 1976; Imai, 1982; Huff, 1986; Lippman, 1986; Bronzert, 1987; Arteaga, 1992). En trabajos *in vivo* llevados a cabo en nuestro laboratorio (Kordon, en prensa), habíamos demostrado que la administración de MPA induce un incremento muy pronunciado en los niveles séricos de EGF, detectables recién al cabo de un mes de tratamiento continuo con MPA. Sin embargo, algunas evidencias sugieren que no sería éste el factor de crecimiento involucrado en la acción del MPA; a) los S(o_{vx}) utilizados en los experimentos descritos fueron obtenidos a partir de ratones sometidos al tratamiento con MPA durante 7 días, según fue descrito en la sección **Materiales y Métodos**; b) no se ha detectado la expresión de REGF en los tumores HD (Lanari, 1989) y c) hemos observado que el EGF proveniente de la glándula salival de animales portadores de tumores no ejercía efecto sobre el crecimiento tumoral (Kordon, en prensa).

En nuestro modelo se ha demostrado, asimismo, la capacidad del MPA de modular la producción de factores de crecimiento tales como TGF β e IGF-II, así como la expresión de RIGF-II (Charreau, 1992). Ambos GF han demostrado previamente su capacidad de mediar diversos efectos hormonales ejercidos sobre la proliferación de células tumorales de mama en cultivo. La actividad TGF β fue determinada en medio condicionado por células derivadas de la línea MCF-7, observándose que los niveles de este GF se incrementaban notablemente por tratamiento con antiestrógenos, a concentraciones inhibitorias de la proliferación (Lippman, 1986). Más aún, en dicho modelo se logró posteriormente la supresión de la acción antiestrogénica mediante la administración de anticuerpos anti-TGF β (Knabbe, 1987). La acción inhibitoria mediada por TGF β , sin embargo, sería más evidente en líneas estrógeno-independientes y RE(-), sugiriendo que este tipo de actividad "antiestrogénica" no involucraría a los RE (Arteaga, 1988). Se ha observado, por otra parte, que la mayoría de las líneas tumorales mamarias presentan RIGF y responden al agregado exógeno de IGF-I con un incremento en

sus tasas de proliferación (Huff, 1986; Cullen, 1992; Pollak, 1992; Brunner, 1992). No sólo la acción estrogénica involucraría la mediación por IGFs. Goldfine y col. (1992) describieron una compleja serie de interacciones entre la progesterona (Pg), los RIGF-I y el IGF-II. En la línea celular T-47D se observó que los progestágenos incrementaron la expresión de RIGF-I y, conjuntamente con los estrógenos, fueron capaces de aumentar la producción de IGF-II. El IGF-II interactuaría luego con los RIGF-I, disminuyendo su expresión a través de un mecanismo de retroalimentación negativa. Se agrega aún más complejidad al sistema, al considerar a las proteínas ligadoras de IGF (*IGF Binding Proteins -BP-*), las cuales son capaces de modular la interacción de los IGF con sus receptores. Figueroa y Yee detectaron la expresión de mRNA para estas BP en células de cáncer de mama, así como su regulación por estrógenos y progestágenos (Figueroa, 1992). Estas experiencias demuestran, en conjunto, que a) los IGFs presentan, tanto en modelos *in vivo* como *in vitro*, un efecto mitogénico sobre células de tumor de mama; b) las hormonas esteroideas son capaces de interactuar con algunos de los componentes del sistema IGF.

La naturaleza de los factores inducibles por MPA en el presente modelo, no ha sido aún analizada. Los sistemas ideales para este tipo de estudios son aquéllos en los que se utiliza medio químicamente definido (sin agregado de suero) (Allegra y col., 1978; Barnes y col., 1979; Darbre y col., 1984). Los experimentos en curso contemplan el análisis de los efectos de IGF y TGF β , así como de otros factores de crecimiento, sobre la proliferación celular de cultivos provenientes de los tumores inducidos por MPA, mediante el empleo de medios de cultivo libres de SFB.

C O N C L U S I O N E S

Los resultados obtenidos en el presente trabajo de Tesis permiten concluir que:

1. Los cultivos primarios demostraron ser una herramienta adecuada para estudiar ciertos aspectos de los mecanismos de regulación hormonal en este modelo, ya que la respuesta hormonal de las células neoplásicas en cultivo se demostró similar a la del tumor *in vivo*. La constancia del fenotipo hormono-responder (los cultivos reinoculados en ratones de la misma cepa originaron tumores de similar comportamiento) contribuye a validar aún más la eficacia del sistema.
2. Las células epiteliales constituirían la población neoplásica del sistema establecido *in vitro*. Los fibroblastos presentes en los cultivos primarios, por otra parte, presentarían un fenotipo normal.
3. La acción estimuladora ejercida por el progestágeno sintético MPA, sobre el crecimiento *in vivo* de los adenocarcinomas de mama C4-HD y C4-HDR, puede ser atribuida, al menos parcialmente, a un efecto de la hormona ejercido en forma directa sobre las células epiteliales.
4. El MPA promovería el crecimiento tumoral a través de un efecto de naturaleza progestacional, mediado fundamentalmente por los receptores de progesterona, presentes en las células neoplásicas en niveles elevados.
5. Los estrógenos inhibirían el crecimiento tumoral, a través de un efecto directo ejercido sobre las células epiteliales. La naturaleza de dicho efecto, no ha sido estudiada hasta el presente.

6. En adición a la inducción directa de la proliferación celular, el MPA induciría la síntesis y/o liberación de factores estimulatorios, que serían capaces de actuar sinérgicamente con el progestágeno en la promoción del crecimiento tumoral.

for CAVDIA CANAR
quis GRACIELA DEAN

R E F E R E N C I A S B I B L I O G R A F I C A S

Adams EF, Braunsberg H, Newton CJ, Shaikh N, James VH. Effects of human breast fibroblasts on growth and 17 β -estradiol dehydrogenase activity of MCF7 cells in culture. *Breast Cancer Res & Treat* 11: 165-172, 1988.

Adams EF, Braunsberg H, Newton CJ, Tait GH, Reed MJ, James VHT. Paracrine influence of human breast stromal fibroblast on breast epithelial cells: secretion of a polypeptide which stimulates reductive 17 β -oestradiol dehydrogenase activity. *Int J Cancer* 42: 119-122, 1988.

Allegra JC, Lippman ME. Growth of a human cancer cell line in serum-free, hormone-supplemented medium. *Cancer Res* 38: 3823-3829, 1978.

Antunes CMF, Strolley PD, Rosenshein NB: Endometrial cancer and estrogen use. Report of a large case-control study. *N Engl J Med* 300: 9-13, 1979.

Arteaga CL. Interference of the IGF system as a strategy to inhibit breast cancer growth. *Breast Cancer Res & Treat* 22: 101-106, 1992.

Arteaga CL, Tandon AK, Von Hoff DD, Osborne CK. Transforming Growth Factor β : Potential autocrine growth inhibitor of estrogen receptor-negative human breast cancer cells. *Cancer Res* 48: 3898-3904, 1988.

Ballaré C, Bravo AI, Laucella S, Sorin I, Cerdeiro R, Loza J, Sousa Martinez F, Gauman N, Mordoh J. DNA synthesis in estrogen receptor-positive human breast cancer takes place preferentially in estrogen receptor-negative cells. *Cancer* 64: 842, 1989.

Bardin CW, Bullock LP, Janne O y Jacob ST. *J Steroid Biochem* 7: 221, 1975.

Barnes D, Sato G. Growth of a human mammary tumor cell line in a serum free medium. *Nature* 281: 388-389, 1979.

Bashford RF: The incidence of cancer of the mama in female mice of known age. *Proc Roy Soc B* 81:310, 1909. Citado por Welsch CW Nagasawa H. Prolactin and murine mammary tumorigenesis: a review. *Cancer Res* 37: 951, 1977.

Baulieu EE. Steroid hormone antagonists at the receptor level: a role for the heat shock protein MW 90,000 (hsp90). *J. Cell Biochem* 35: 161-174, 1987.

Beck CA, Estes PA, Bona BJ, Muro-Cacho CA, Nordeen SK y Edwards DP. The steroid antagonist RU486 exerts different effects on the glucocorticoid and progesterone receptors. *Endocrinology* 133(2): 728-740, 1993.

Baulieu EE. Contragestion and other clinical applications of RU486, an antiprogestosterone at the receptor. *Science* 245: 1351-1357, 1989.

Baulieu EE. A rationale for combined antiestrogen plus progestin administration in breast cancer. In: Campio L., Robustelli Della Cuna G y Taylor RW (eds), *Role of Medroxyprogesterone in Endocrine-Related Tumors*, Vol 2. Raven Press, New York, pp 15-23, 1983.

Bélangier A, Le Goff JM, Prolx L, Caron S, Labrie F. Presence of C-19 steroids in mammary Shionogi carcinoma (SC115) in castrated mice. *Cancer Res* 45:6293, 1985.

Biskin MS, Biskin GR. The development of tumors in rat's ovaries after transplantation into the spleen. *Proc Soc Exper Biol Med* 55: 176, 1944.

Bittner JJ: Some possible effects of nursing on the mammary gland tumor incidence in mice. *Science* 84: 162, 1936.

Bittner JJ, Cole HL: Induction of mammary cancer in agent-free mice bearing pituitary isografts correlated with inherited hormonal mechanism. J Natl Cancer Inst 27: 1283, 1961.

Blosey HC, Wander HE, Koebberling J, Nagel GA. Pharmacokinetic and pharmacodynamic basis for the treatment of metastatic breast cancer with high-dose medroxyprogesterone acetate. Cancer 54: 1208-1215, 1984.

Braunsberg H, Coldham NG, Leake RE, Cowan SK, Wong W. Actions of a progestagen on human breast cancer cells: mechanisms of growth stimulation and inhibition. Eur J Cancer Clin Oncol 23: 563-571, 1987.

Breznick T, Cohen JG: Altered methylation of endogenous viral promoter sequences during mammary carcinogenesis. Nature 295: 255, 1982.

Briggs MH y Briggs M. Glucocorticoids properties of progestagens. Selection and characterization of a breast cancer cell line resistant to the α -androgen LY-117018. Steroids 22: 555-559, 1973.

Bronzert DA, Pantazis P, Antoniadis HN, Kasid A, Davidson N, Dickson RB. Synthesis and secretion of platelet-derived growth factor by human breast cancer cell lines. Proc Natl Acad Sci USA 84: 5763-5767, 1987.

Brunner N, Moser C, Clarke R, Cullen K. IGF-I and IGF-II expression in human breast cancer xenografts: relationship to hormone independence. Breast Cancer Res & Treat 22: 39-45, 1992.

Bullock LP, Barthe PL, Mowszowicz I, North DN, Bardin CW. The effect of progestins on submaxillary gland epidermal growth factor:

demonstration of androgenic, synandrogenic and antiandrogenic actions. *Endocrinology* 97: 189-195, 1975.

Burns EL, Schenken JR. Quantitative studies on relationship between estrogen and mammary gland carcinoma in strain C3H mice. *Proc Soc Exp Biol* 43: 608, 1940.

Calandra RS, Charreau EH, Giaroli MR, Baldi A, Calvo JC, Pujato D y Arrighi L. Receptores para esteroides y prolactina en carcinomas mamarios humanos. *Medicina (Bs.Aires)* 40: 718, 1980.

Campio L., Robustelli Della Cuna G y Taylor RW (eds). *Role of Medroxyprogesterone in Endocrine-Related Tumors, Vol 2*. Raven Press, New York, 1983.

Chalbos D, Vignon F, Keydar I, Rochefort H. Estrogens stimulate cell proliferation and induce secretory proteins in a human breast cancer cell line (T-47D). *J Clin Endocr Metab* 55: 276-283, 1982.

Chamness GC. Progestin actions and progesterone receptors in breast cancer. Meeting Report. *Cancer Res* 49: 7176-7179, 1989.

Chetrite G, Delalonde L, Pasqualini JR. Comparative effect of embryonic mouse fibroblasts (BALB/c-3T3) on the proliferation of hormone-dependent (T-47D) and hormone-independent (MDA-MB-231) human breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res & Treat* 25: 29-35, 1993.

Clark JH, Markaverich BM. Progesterone and progestins. In: C. Wayne Bardin, E. Milgrom and P. Mauvais-Jarvis (eds), Raven Press, New York, 1983.

Clark JH, Hsueh AJW, Peck EJ. Regulation of estrogen receptor replenishment by progesterone. *Ann NY Acad Sci* 286: 161-179, 1977.

Clarke CL, Sutherland RL. Progestin regulation of cell proliferation. *Endocrine Rev* 11: 266-300, 1990.

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* 106: 1173-1177, 1980.

Cortés Funes H, Madrigal PL, Perez Mangas G, Mendiola C. Medroxyprogesterone acetate at two different high doses for the treatment of advanced breast cancer. In: Campio L, Robustelli Della Cuna G y Taylor RW (eds), *Role of Medroxyprogesterone in Endocrine-Related Tumors*, Vol 2. Raven Press, New York, 1983.

Cowie AT, Folley SJ, Malpress SH, Richardson KC. Studies on the hormonal induction of mammary growth and lactation in the goat. *J Endocrinol* 8: 64-88, 1952.

Cullen KJ, Allison A, Martire I, Ellis M, Singer C. Insulin-like growth factor expression in breast cancer epithelium and stroma. *Breast Cancer Res & Treat* 22: 21-29, 1992.

Cunha GR, Cooke PS, Mee S, Higgins SJ, Donjacour AA, Bigsby RM, Young P. Mesenchymal-epithelial interactions in androgen-induced prostatic growth and development. In Iacobelli S. et al (eds.): *Hormones and Cancer*. Raven Press, New York, 1980, pp 460-471.

Danguy A, Legros N, Devleeschouwer N, Heuson-Stennon JA, Heuson JC. Effects of medroxyprogesterone acetate (MPA) on growth of DMBA-induced rat mammary tumors: Histopathological and endocrine studies. In: Iacobelli S, Di Marco A (eds) *Role of Medroxyprogesterone in Endocrine-Related Tumors*. Raven Press, New York, 1980, pp 21-28.

Daniel CW y Silberstein GB. Postnatal development of the rodent mammary gland. In: The Mammary Gland, Development, Regulation and Function. Neville MC and Daniel CW (eds). Plenum Press. New York and London 1987.

Dao TL, Sinha DK, Nemoto T, Patel J. Effect of estrogen and progesterone on cellular replication of human breast tumors. Cancer Res 42: 359-362, 1982.

Dao C, Sunderland H. Mammary carcinogenesis by 3-methylcholanthrene I. Hormonal aspects in tumor induction and growth. J Natl Cancer Inst 23: 567, 1959.

Darbre P, King R. Effects of Estradiol and Tamoxifen on human breast cancer cells in serum-free culture. Cancer Res 44: 2790-2793, 1984.

Darbre P, Page M, King RJB. Androgen regulation by the long terminal repeat of mouse mammary tumor virus. Mol Cell Biol 6: 2847, 1986.

Davies OL, Doldsmith PL, Statistical Methods in Research and Production, 1972, p 178, Oliver & Boyd, Edinburgh.

Dembinski TC y Shiu RPC. Growth factors in mammary gland development and function. In: The Mammary Gland, Development, Regulation and Function. Neville MC and Daniel CW (eds). Plenum Press. New York and London 1987.

di Marco A. Role of Medroxyprogesterone Acetate in endocrine-related tumors. Iacobelli S and di Marco A (eds), pp. 1-20, Raven Press, New York, 1980.

Dickson C, Peters G. Proteins encoded by mouse mammary tumor virus. In Vogt PK y Koprowski (eds) Mouse mammary tumor virus. Current topics in Microbiology and Immunology , Vol 106, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp: 1-34, 1983.

Dilley WG, Nandi S. Rat mammary gland differentiation in vitro in the absence of steroids. Science 161: 59-60, 1968.

Dipple A, Lowley PD, Brooks P. Theory of tumor initiation by chemical carcinogens. Dependence of activity on structure of ultimate carcinogens. Europ J Cancer 4: 493, 1968.

Dockerty MB, Lovelady SB, Foust GTJr. Carcinoma of the corpus uteri in young women. Am J Obst Gynecol 61: 966-981, 1951.

Durbin PW, Willams MH, Jeung N, Arnold JS. Development of spontaneous mammary tumors over the life-span of the female Charles River (Sprague Dawley) rat: The influence of ovariectomy, thyroidectomy, and adrenalectomy-ovariectomy. Cancer Res 26: 400, 1966.

Eckert RL, Mullik A, Rorke EA, Katzenellenbogen BS. Estrogen receptor synthesis and turnover in MCF-7 breast cancer cells measured by a density shift technique. Endocrinology 114: 629-637, 1986.

Eckert RL and Katzenellenbogen BS. Effects of estrogens and antiestrogens on estrogen receptor dynamics and the induction of progesterone receptor in MCF-7 human breast cancer cells. Cancer Res 42: 139-144, 1982.

Eidne KA, Flanagan CA y Millar RP. Science 229: 989, 1985.

El Etreby MF, Graf KJ, Gunzel P, Neuman F. Evaluation of effects of sexual steroids on the hypothalamic-pituitary system of animals and

men. In: Mechanism of toxic action on some target organs. Arch Toxicol, Suppl 2: 11, 1979.

Enami J, Enami S, Kawamura K, Kahomoto K, Hata M, Koezuka M and Koga M. Growth of normal and neoplastic mammary epithelial cells of the mouse by mammary fibroblast conditioned medium factors. In: Growth and Differentiation of mammary epithelial cells in culture. J Enami & R Ham (eds), 1987, pp. 125-152, Japan Scientific Societies Press, Tokyo.

English HF, Kloszewski ED, Valentine EG, Santen RJ. Proliferative response of the Dunning R3327H experimental model of prostatic adenocarcinoma to conditions of androgen depletion and repletion. Cancer Res 46: 839, 1986.

Figueroa JA, Yee D. The insulin-like growth factor binding proteins in human breast cancer. Breast Cancer Res & Treat 22: 81-90, 1992.

Foulds L, Neoplastic Development Vol 1, Academic Press, Londres, 1969; citado por Darbre P, King RJB, J Cell Biol 99: 1410, 1984.

Frank DW, Kirton KT, Murchison TE, Quinlan WJ, Coleman TJ, Gilbertson TJ, Feenstra ES, Kimball FA. Mammary tumors and serum hormones in the bitch treated with medroxyprogesterone acetate and progesterone for four years. Fertil Steril 31: 340, 1979.

Frantz AG. The ovaries and the breast II. The breast. In: Williams (ed) Textbook of Endocrinology, ed 6. WB Saunders, Philadelphia, pp 400-411, 1981.

Freiss G, Rochefort H and Vignon F. Anti-growth factor action of antiestrogens in breast cancer cells. Breast Cancer Res & Treat 28: 69-88, 1993.

Freshney RI. Culture of epithelial cells. R.I. Freshney (ed). Wiley-Liss, Inc., New York, 1992.

Ganzina F. High dose medroxyprogesterone acetate (MPA) treatment in advanced breast cancer. A review. Tumori 65: 563, 1979.

Gardner WU. Hormonal imbalances in tumorigenesis. Cancer Res 8: 397, 1948.

Gass GH, Brown J, Okey AB. Carcinogenetic effect of oral diethylstilbestrol on C3H male mice with and without the mammary tumor virus. JNCI 53: 1369, 1974.

Giani C, Campani D, De Negri F, Gigliotti A, Fabbri R, Bonacci R, Fierabracci P, Mammoli C, Squartini F and Pinchera A. Evidence of epithelial expression of progesterone receptor in breast cancers with marked fibrosis and limited metastatic node diffusion. In: Breast cancer. From biology to therapy. Squartini F, Bevilacqua G, Conte PF and Subone A (eds), Annals of the New York Academy of Sciences, vol. 698, pp. 148-153, 1993.

Goldfine ID, Papa V, Vigneri R, Rosenthal S. Progesterone regulation of insulin and insulin-like growth factor I receptors in cultured human breast cancer cells. Breast Cancer Res & Treat 22: 69-79, 1992.

Gordon GG, Altman K, Southern AL, Olivo J. Human hepatic testosterone A-ring reductase activity: Effects of Medroxyprogesterone acetate. J Clin Endocrinol Metab 32: 457-461, 1971.

Gottardis M, Erturk E, Rose DP. Effects of progesterone administration on N-nitroso-N-methylurea-induced rat mammary carcinogenesis. Eur J Cancer Clin Oncol 19: 1479-1484, 1983.

Gritti MF, García Palazzo I, Medina P, Bonfil RD. Caracterización de la línea celular M3MC obtenida a partir del adenocarcinoma de mama murino M3. *Medicina* 51(5): 436, 1991. *Journal of Invasion and Metastasis*, 1993 (en prensa).

Gurpide E. Metabolic influence of the actions of estrogens: Therapeutic implications. *Pediatrics* 62: 1114-1120, 1978.

Hackenberg R, Hawighorst T, Filmer A, Nia AH and Schulz K-D. Medroxyprogesterone acetate inhibits the proliferation of estrogen- and progesterone-receptor negative MFM-223 human mammary cancer cells via the androgen receptor. *Breast Cancer Res & Treat* 25:217-224, 1993.

Harrison JD, Morris DL, Ellis IO, Jones JA, Jackson I. Preliminary results of randomized controlled trial of adjuvant tamoxifen in the treatment of gastric carcinoma. In: Bresciani et al. (eds) *Progress in Cancer Research and Therapy*, Vol 35: Hormones and Cancer 3, Raven Press, New York, pp 540-543, 1988.

Haslam SZ. Progesterone effects on deoxiribonucleic acid synthesis in normal mouse mammary glands. *Endocrinology* 122: 860-867, 1988.

Haslam SZ. Mammary fibroblasts influence on normal mouse mammary epithelial cell responses to estrogen in vitro. *Cancer Res* 46: 310-316, 1986.

Haslam SZ. Role of sex steroids hormones in normal mammary gland function. In: *The mammary gland. Development, Regulation and Function*, pp 499. Neville MC and Daniel CW (eds). Plenum Press NY and London, 1990.

Haslam SZ, Counterman LJ. Mammary stroma modulates hormonal responsiveness of mammary epithelium in vivo in the mouse. *Endocrinology* 129:2017- 2023, 1991.

Heppner G, Miller BE. Tumor heterogeneity. Biological implications and therapeutic consequences. Breast Cancer Metast Rev 2: 5-23, 1983.

Herbst AL, Ulfelder H, Poskanzer DC. Adenocarcinoma of the vagina: Association of maternal stilbestrol therapy with tumor appearance in young women. N Engl J Med 284: 878, 1971.

Hissom JR, Bowden RT, Moore MR. Effects of progestins, estrogens and anti-hormones on growth and lactate dehydrogenase in the human breast cancer cell line T-47D. Endocrinology 125: 418-423, 1989.

Hollenberg SM et al. Nature 318: 635, 1985.

Honn KV, Singley JA, Chavin W. Fetal bovine serum: A multivariate standard. Proc Soc Exp Biol Med 149: 344-347, 1975.

Hooker CW, Forbes TR. Specificity of the intrauterine test for progesterone. Endocrinology 45: 71-74, 1949.

Horgan K, Jones DL, Mansel RE. Mitogenicity of human fibroblasts in vivo for human breast cancer cells. Br J Surg 74: 227-229, 1987.

Houdebine L-M, Teyssot B, Devinoy E, Ollivier-Bousquet M, Djiane J, Kelly PA, Fevre J. Role of Progesterone in the development and the activity of the mammary gland. In: Progesterone and Progestins, Wayne B., Milgrom E. and Mauvais-Jarvis P. (eds), Raven Press, New York, 1983.

Horwitz KB, Freidenberg GR. Growth inhibition and increase of insulin receptors in antiestrogen-resistant T-47Dco human breast cancer cells by progestins: implications for endocrine therapies. Cancer Res 45: 167-173, 1985.

Hsu SM, Raine L y Fanger H. A comparative study of the peroxidase-antiperoxidase method and a avidin-biotin complex for studying

polypeptide hormones with radioimmunoassay antibodies. Am J Clin Pathol 75:734-738, 1981a.

Huff KK, Kaufman D, Gabbay KH, Spencer EM, Lippman ME, Dickson RB. Secretion of a Insuline-like growth factor-I-related protein by human breast cancer cells. Cancer Res 46: 4613-4619, 1986.

Huggins C, Moon RC, Morii S. Extinction of experimental mammary cancer I. Estradiol-17 β and Progesterone. Proc Natl Acad Sci USA 48: 379-386, 1962.

Huggins G, Briziarelli G, Sutton H. Rapid induction of mammary carcinoma in the rat and the influence of hormones on the tumors. J Exp Med 109: 25, 1959.

Imagawa W, Tomooka Y y Nandi S. Serum-free growth of normal and tumor mouse mammary epithelial cells in primary culture. Proc Natl Acad Sci USA 79: 4074-4077, 1982.

Imai Y, Leung CKH, Friesen HG, Shiu RPC. Epidermal Growth Factor receptors and effects of EGF on growth of human breast cancer cells in long-term tissue culture. Cancer Res 42: 4394-4398, 1982.

Jabara AG, Toyne PH, Harcourt AG. Effects of time and duration of progesterone administration on mammary tumours induced by DMBA in Sprague-Dawley rats. Br J Cancer 27: 63-71, 1973.

Jabara AC. Effects of progesterone on 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene-induced mammary tumours in Sprague-Dawley rats. Br J Cancer 21: 418-428, 1967.

Jones B, Russo J. Influence of steroid hormones on the growth fractions of a human breast carcinoma. Am J Clin Pathol 88: 132-138, 1987.

Kim U, Depowoski MJ. Progression from hormone dependence to autonomy in mammary tumors as an in vivo manifestation of sequential clonal selection. *Cancer Res* 35: 2068, 1975.

King RJB, Lippman ME, Raynaud JP (eds) *Hormones and Cancer* 3, Raven Press, New York, 1988, pp 97-101.

Kiss R, Paridaens RJ, Leclercq G, Danguy AJ. Sensitivity of the hormone-dependent MXT mammary carcinoma to estradiol during tumoral growth. An autoradiographic study. *Europ J Cancer Clin Oncol* 22: 849-856, 1986b.

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* 77: 173-177, 1986a.

Knabbe C, Lippman ME, Wakefield LM, Flanders KC, Kasid A, Derynck R, Dickson RB. Evidence that Transforming Growth Factor β is a hormonally regulated negative growth factor in human breast cancer cells. *Cell* 8: 417-428, 1987.

Kordon E, Lanari C, Meiss R, Elizalde P, Charreau EH and Dosne Pasqualini C. Hormone dependence of a mouse mammary tumor line induced in vivo by MPA. *Breast Cancer Res & Treat* 17: 33-43, 1990.

Kordon E, Guerra F, Molinolo A, Elizalde P, Charreau EH, Pasqualini CD, Montecchia F, Pazos P, Dran G, Lanari C. Effect of sialoadenectomy on MPA-induced mammary carcinogenesis. Correlation between histology and EGF receptor content. *Int J Cancer* (en prensa).

Kordon E, Lanari C, Molinolo A, Elizalde P, Charreau EH, Pasqualini CD. Estrogen inhibition of MPA-induced mouse mammary tumor transplants. *Int J Cancer* 49: 900-905, 1991.

Kordon E, Molinolo A, Pasqualini CD, Charreau EH, Pazos P, Dran G, Lanari C. Progesterone induction of mammary carcinomas in BALB/c females mice. *Breast Cancer Res & Treat* 28: 29-39, 1993.

Korenman SG. The endocrinology of breast cancer. *Cancer* 46: 874-878, 1980.

Korenman SG, Dukes BA. Specific estrogen binding by the cytoplasm of human breast cancer cells. *J Clin Endocrinol Metab* 30: 639, 1970.

Koyama H, Sinha D, Dao TL. Effects of hormones and DMBA on rat mammary tissue grown in organ culture. *J Natl Cancer Inst* 48: 1671-1680, 1972.

Kurman RJ, Norris HJ. Endometrial Carcinoma. In: Kurman RJ (ed) *Blaustein's Pathology of the female genital tract*, 3rd edition, Springer-Verlag, New York, pp338-372, 1987

Kuttenn F, Mauvais-Jarvis P. Testosterone 5 α -reduction in the skin of normal subjects and of patients with abnormal sex development. *Acta Endocrinol* 79: 164-176, 1975.

Kyprianou N, English HF, Davidson N, Isaacs J. Programmed cell death during regression of the MCF-7 human breast cancer following estrogen ablation. *Cancer Res* 51: 162-166, 1991.

Labrie F, Ferland L, Lagacé L, Drouin J, Asselin J, Azadian-Boulanger G y Raynaud JP. High inhibitory activity of R5020, a pure progestin, at the hypothalamic-adenohypophyseal level on gonadotropin secretion. *Fertil Steril* 28: 1104-1122, 1977.

Lacassagne A. Aparition de cancers de la mammelle chez le souris male, soumise a des injections de folliculine. *Compt Rend Acad Sci*

(Paris) 1913, pp 630-632, 1932; citado por Gross L; Mouse mammary carcinoma en Oncogenic viruses, 2nd Edition. Pergamon Press, London, pp238-280, 1970.

Lanari C, Kordon E, Molinolo AA, Pasqualini CD, Charreau EH. Mammary adenocarcinomas induced by medroxyprogesterone acetate: hormone dependence and EGF receptors of BALB/c in vivo sublines. Int J Cancer 43: 845-850, 1989.

Lanari C, Molinolo AA, Dosne Pasqualini C. Induction of mammary adenocarcinomas by medroxyprogesterone acetate in BALB/c female mice. Cancer Lett 33: 215, 1986b.

Lanari C, Molinolo AA, Dosne Pasqualini C. Inhibitory effect of medroxyprogesterone acetate on foreign body tumorigenesis in mice. JNCI 77: 157-164, 1986a.

Lathrop AEC, Loeb L: Further investigations on the origins of tumors in mice III. On the part played by internal secretions in the spontaneous development of tumors. J Cancer Res 1: 1, 1916. Citado por Welsch CW y Nagasawa H. Prolactin and murine mammary tumorigenesis: a review. Cancer Res 37: 951, 1977.

Limon J, Dal Cin P, Sandberg AA. Application of long-term collagenase disaggregation for the cytogenetic analysis of human solid tumors. Cancer Genet Cytogenet 23: 305-313, 1986.

Lin FK, Banerjee MR, Crump LR. Cell cycle-related hormone carcinogen interaction during chemical carcinogen induction of nodule-like mammary lesions in organ culture. Cancer Res 36: 1607, 1976.

Lippman ME, Huff K, Bolan G: Progesterone and glucocorticoid interactions with receptor in breast cancer cells in long term tissue culture. Ann NY Acad Sci 286: 101, 1977.

Lippman ME, Dickson RB, Bates S, Knabbe C, Huff K, Swain S, McManaway M, Bronzert D, Kassid A, Gelmann EP. Autocrine and paracrine growth regulation of human breast cancer. *Breast Cancer Res & Treat* 7: 59-70, 1986.

Lippman ME, Osborne CK y Young N. In vitro model systems for the study of hormone-dependent human breast cancer. *N Engl J Med* 296: 154-159, 1977.

Lippman ME, Bolan G, Huff K. The effects of estrogen and antiestrogen on hormone responsive human breast cancer in long-term tissue culture. *Cancer Res* 36: 4595-4601, 1976.

Loeb L, Kirtz MM. The effect of transplant of anterior lobes of the hypophysis on the growth of the mammary gland and on the development of mammary gland carcinoma in various strains of mice. *Am J Cancer* 36: 56, 1939.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol. Chem.* 193: 265-275, 1951.

Luthy I, Begin D, Labrie F. Mediation by the androgen receptor of the stimulatory and androgenic actions of 17 β -Estradiol on the growth of androgen-sensitive Shionogi mammary carcinoma cells in culture. *Endocrinology* 123: 1418-1424, 1988.

Lyons MJ, Moore DH. Purification of the mouse mammary tumor virus. *Nature* 194: 1141, 1962.

MacLusky NJ, Lieberburg I, Krey LC, Mc Ewen BS. Progesterone receptors in the brain and pituitary of a primate, the bonnet monkey. *Endocrinology* 106: 185-191, 1980.

MacLusky NJ, Mc Ewen BS. Oestrogen modulates progesterin receptor concentrations in some rat brain regions but not in others. Nature 274: 276-278, 1978.

Manni A y Wright C. Effects of Tamoxifen and α -difluoromethyl-ornithine on clones of nitrosomethylurea-induced rat mammary tumor cells grown in soft agar cultures. Cancer Res 43: 1084-1086, 1983.

Manni A, Badger B, Wright C, Demers LM, Bartholomew M. Polyamines and autocrine control of NMU-induced rat mammary tumor growth in vitro by progesterone. Cancer Res 48: 3058-3061, 1988.

Manni A, Badger B, Wright C, Rafeeq Ahmed S, Demers LM. Effects of progestins on growth of experimental breast cancer in culture: interactions with estradiol and prolactin and involvement of the polyamine pathway. Cancer Res 47: 3066-3071, 1987.

Marchant J. Chemical induction of breast tumors in mice of the C57BL strain. The influence of pseudopregnancy, pregnancy and lactation on induction by methylcholanthrene. Brit J Cancer 15: 568, 1961.

Marchant J. The influence of pseudopregnancy on breast tumor induction by methylcholanthrene in IF or F1 hybrid (C57BL x IF) mice. Brit J Cancer 17: 495, 1963.

Massa R, Martini L. Interference with the 5α -reductase system. A new approach for developing antiandrogens. Gynecol Invest 2: 253-270, 1971.

Masters JRW, Drife JO and Scarisbreck JJ. Cyclic variation of DNA synthesis in human breast epithelium. J Natl Cancer Inst 58: 1263-1265, 1977.

Matsusawa A, Yamamoto T. Response of a pregnancy-dependent mouse mammary tumor to hormones. J Natl Cancer Inst 55: 447-451, 1975.

Mattsson W. Current status of high dose progestin treatment in advanced breast cancer. Breast Cancer Res & Treat 3: 231-235, 1983.

Mauvais-Jarvis P, Kuttann F, Baudot N. Inhibition of testosterone conversion to dihydrotestosterone in man treated percutaneously by progesterone. J Clin Endocr Metab 38: 142-147, 1974.

Mauvais-Jarvis P, Sitruk-Ware R, Sterkers N. Luteal phase insufficiency: A common pathophysiological factor for development of benign and malignant breast disease. In: Commentaries on research in breast cancer. R.D. Bulbrook (ed), pp 25-55, Alan Liss New York, 1979.

McGrath CM. Augmentation of the response of normal mammary epithelial cells to estradiol by mammary stroma. Cancer Res 43: 1355-1360, 1983.

Medina D, Warner MR. Mammary tumorigenesis in carcinogen-treated mice IV. Induction of mammary ductal hyperplasias. JNCI 57: 331, 1977.

Medina D. Preneoplastic lesions in murine mammary cancer. Cancer Res 36: 2589, 1976.

Medina D. Preneoplastic lesions in mouse mammary tumorigenesis. Methods in Cancer Res 7: 3, 1973.

Meyer JS. Cell proliferation in normal human breast ducts, fibroadenomas and other ductal hyperplasias measured by nuclear labeling with tritiated thymidine. Human Pathol 8: 67-81, 1977.

Michalides R, van Ooyen A, Nusse R. Mouse mammary tumor virus expression and mammary tumor development. In: Vogt PK y Koprowski (eds) Mouse mammary tumor virus, Current topics in Microbiology and Immunology , Vol 106, Springer-Verlag Berlin Heidelberg pp: 57-78, 1983.

Michna H, Schneider MR, Nishino Y, El Eterby MF. Antitumor activity of the antiprogestins ZK 98229 and RU 38486 in hormone dependent rat and mouse mammary tumors: Mechanistic studies. Breast Cancer Res & Treat 14: 275-288, 1989.

Michna H, Schneider MR, Nishino Y, El Eterby MF, McGuire L. Progesterone antagonists block the growth of experimental mammary tumors in G₀/G₁. Breast Cancer Res & Treat 17: 155-156, 1990.

Miller EC, Miller JA. Mechanisms of chemical carcinogenesis: Nature of proximate carcinogens and interactions of macro-molecules. Pharm Rev 18: 805, 1966.

Miller WR, Scott WN, Morris R, Fraser HM y Sharpe RM. Nature 29: 313: 231, 1985.

Molinolo AA, Lanari C, Charreau EH, Sanjuan N and Dosne Pasqualini C. Mouse mammary tumors induced by medroxyprogesterone acetate: immunohistochemistry and hormonal receptors. J Natl Cancer Inst 79: 1341-1350, 1987.

Moon HD, Simpson ME, Li CH, Evacs HM. Neoplasms in rats treated with pituitary growth hormone. Absence of neoplasms in hypophysectomized rats. Cancer Res 11: 535, 1951.

Moore RA. Benign hypertrophy and carcinoma of prostate. Surgery 16: 152-167, 1944.

Muhlbock O, Boot LM. Induction of mammary tumorigenesis in mice without the mammary tumor agent by isografts of hypophysis. *Cancer Res* 19: 402, 1959.

Mukaida H, Hirabayashi N, Hirai T, Iwata T, Saeki S, Toge T. Significance of freshly cultured fibroblasts from different tissues in promoting cancer cell growth. *Int J Cancer* 48: 423-427, 1991.

Murphy LC, Dotzlaw H, Johnson Wong MS, Miller T, Murphy LJ. Mechanisms involved in the evolution of progestin resistance in human breast cancer cells. *Cancer Res* 51: 2051-2057, 1991.

Nagasawa H, Aoki M, Sakagami N, Ishida M: Medroxyprogesterone acetate enhances spontaneous mammary tumorigenesis and uterine adenomyosis in mice. *Breast Cancer Res Treat* 12: 59-66, 1988.

Nandi S. Endocrine control of mammary gland development and function in the C₃H/He Crgl mouse. *J Natl Cancer Inst* 21: 1039-1063, 1958.

Nandi S, McGrath C. Mammary neoplasias in mice. *Adv Cancer Res* 17: 353, 1973.

Nardulli A, Greene GJ, O'Malley BW, Katzenellenbogen BS. Regulation of progesterone receptor mRNA and protein levels in MCF-7 cells by estradiol: analysis of estrogen effects on progesterone synthesis and degradation. *Endocrinology* 122: 935-944, 1988.

Noble RL. Hormonal control of growth and progression in tumors of Nb rats and theory of action. *Cancer Res* 37: 82, 1977.

Olea Serrano N, Devleeschower N, Leclercq G, Heuson JC. Assay for estrogen and progesterone receptors of breast cancer cell lines in monolayer culture. *Eur J Cancer Clin Oncol* 21: 965-973, 1985.

Pandis N, Heim S, Bardi G, Limon J, Mandahl N y Mitelman F. Improved technique for short-term culture and cytogenetic analysis of human breast cancer. *Genes Chromosomes & Cancer* 5:14-20, 1992.

Pasqualini CD. Factores endócrinos en la tumorigénesis. *Medicina*, (Bs. Aires) 5: 371, 1949.

Paul J. Cell and Tissue Culture. John Paul (ed), 5th Edition, Churchill Livingstone, Edinburgh London and New York, 1975.

Pazos P, Lanari C, Meiss R, Charreau EH, Dosne Pasqualini C. Mammary carcinogenesis induced by N-methyl-N-nitrosourea (MNU) and medroxyprogesterone acetate (MPA) in BALB/c mice. *Breast Cancer Res & Treat* 20:133-138, 1991.

Pearson OH, Llerena O, Llerena L, Molina A and Butler T. *Trans Assoc Am Physicians*, 82: 481-484, 1963.

Pellegrini A, Massida B, Mascia V, Ionta MT. Medroxyprogesterone acetate and tamoxifen: two different drugs in alternate or sequential modality treatment. In: Campio L, Robustelli Della Cuna G y Taylor RW (eds), *Role of Medroxyprogesterone in Endocrine-Related Tumors*, Vol 2. Raven Press, New York, pp 45-67, 1983.

Peres R, Betsholtz C, Westermarck B, Heldin C-H. Frequent expression of growth factors for mesenchymal cells in human mammary carcinoma cell lines. *Cancer Res* 47: 3425-3429, 1987.

Perez-Palacios G, Chavez B, Escobar N, Vilchis F, Larrea F, Lince M y Perez AE. Mechanism of action of contraceptive synthetic progestins. *J Steroid Biochem* 15: 125-130, 1981.

Petersen OW, Hoyer PE and van Deurs B. Frequency and distribution of estrogen-receptor positive cells in normal, nonlactating human breast tissue. *Cancer Res* 47:5748-5751, 1987.

Peyrat JP, Bonneterre J. Type-I IGF receptor in human breast diseases. *Breast Cancer Res & Treat* 22: 59-67, 1992.

Philibert D. 1084 RU38486: An original multifaceted antihormone in vivo. In: Agarwal MK (ed) *Adrenal Steroid Antagonism*. de Gruyter, Berlin and NY, 1984, pp77-101.

Picard O, Rolland Y, Poupon MF. Fibroblast-dependent tumorigenicity of cells in Nude mice: Implications for implantation of metastases. *Cancer Res* 46: 3290-3294, 1986.

Picard D, Salser SJ y Yamamoto KR. A moveable and regulable inactivation function of the glucocorticoid receptor. *Cell* 54: 1073-1080, 1988.

Pike MC, Henderson BE, Krailo MD, Duke A, Roy S. Breast cancer in young women and use of oral contraceptives: Possible modifying effect of formulation and age at use. *Lancet* 2: 926, 1983.

Pitot HC. *Fundamentals of Oncology*, 1978, Marcel Dekker Inc, New York and Basel.

Pollak MN. Tamoxifen reduces serum insulin-like growth factor I (IGF-I). *Breast Cancer Res & Treat* 22: 91-100, 1992.

Poulin R, Baker D, Poirier D, Labrie F. Androgen and glucocorticoid receptor-mediated inhibition of cell proliferation by MPA in ZR-75-1 human breast cancer cells. *Breast Cancer Res & Treat* 13: 161-172, 1989.

Prahdala S, Carroad E, Cukierski M, Hendrickx AG. Embriotoxicity of medroxyprogesterone acetate (MPA) and maternal serum MPA concentration in *Cynomolgus* monkey (*Macaca fascicularis*). *Teratology* 32: 421, 1985.

Press MF, Xu S, Wang J, Greene GL. Subcellular distribution of estrogen receptor and progesterone receptor with and without specific ligand. *Am J Pathol* 135: 857-864, 1989

Rao BR, Wiest NS, Allen WM. Progesterone receptor in rabbit uterus, I: Characterization and Estradiol augmentation. *Endocrinology* 92: 1229-1224, 1973.

Richards JE, Edery M, Osborn RC, Larson LN, Nandi S. Effect of hormones and EGF on the growth of the hormone-responsive 13762NF rat mammary tumor in collagen gel culture. *J Natl Cancer Inst* 76: 669-682, 1986.

Robinson SP, Jordan VC. Reversal of the antitumor effects of tamoxifen by progesterone in the DMBA-induced rat mammary carcinoma model. *Cancer Res* 47: 5386-5390, 1987.

Robustelli della Cuna G, Pellegrini A, Ganzina F: Chemotherapy and hormonal treatment of advanced breast cancer. 2nd Ed, Farmitalia Carlo Erba, Milan, 1982.

Robustelli Della Cuna G, Preti P. Advanced breast cancer: hormone-dependency and mechanisms of action of medroxyprogesterone acetate. In: Robustelli Della Cuna G, Tepmongkol P, Somboonchareon (eds) The role of high dose medroxyprogesterone acetate in the management of endocrine-related tumors. Bangkok, 1986.

Rochefort H, Coezy E, Joly E, Westley B y Vignon F. Hormonal control of breast cancer in cell culture. In: Hormones and Cancer Vol.14, Iacobelli S (ed), Raven Press, New York, 1980.

Rousseau GG et al. *J Mol Biol* 79: 539, 1973.

Rozengurt E, Sinnett-Smith J, Taylor-Papadimitriou J. Production of PDGF-like growth factor by breast cancer cell lines. *Int J Cancer* 36: 247-252, 1985.

Rudland PS, Bennett DC y Warburton MJ. Growth and differentiation of cultured rat mammary epithelial cells. In: *Hormones and Cancer Vol.14*, Iacobelli S (ed), Raven Press, New York, 1980.

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* 59: 210-216, 1989.

Ryan MC, Orr DJA, Horgan K. Fibroblast stimulation of breast cancer cell growth in a serum-free system. *Br J Cancer* 67: 1268-1273, 1993.

Scatchard G. The attractions of proteins for small molecules and ions. *Ann NY Acad Sci* 51:660, 1949.

Schlom J, Michalides R, Kufe D, Hehelmann R, Spiegelman S, Bentvelzen P, Hageman P. A comparative study of biologic and molecular basis of murine mammary carcinoma: a model for human breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 51: 541, 1973.

Schmit JP, Quivy JI, Rousseau GG. The androgen receptor binding site: A conformational study of steroids in relation with their affinity. *J Steroid Biochem* 13: 1387-1394, 1980.

Schneider MR, Michna H, Nishino Y, El Eterby MF. Antitumor activity of the antiprogestins ZK 98229 and RU 38486 in the hormone dependent MXT mammary tumor model of the mouse, and DMBA- and NMU-induced mammary tumor model of the rat. *Eur J Cancer Clin Oncol* 25: 691-701, 1989.

Schultz KD, Zippel HH, Ruck A, Holzel F. Selection and practicability of different hormonal treatment methods in endometrial cancer. In: Bresciani et al (eds) Progress in Cancer Research and Therapy, Vol 35: Hormones and Cancer 3, Raven Press, New York, pp 445-455, 1988.

Shintaku IP and Said J. Detection of hormone receptors with monoclonal antibodies in routinely processed formalin-fixed paraffin sections of breast carcinomas. Am J Clin Pathol 87: 161-167, 1987.

Siiteri PK, Nisker JA, Hammond GL. Hormonal basis of risk factors for breast and endometrial cancer. In: Iacobelli S. et al (eds.), Hormones and Cancer. Raven Press, New York, 1980, pp 499-505.

Silberstein GB y Daniel CW. Elvax 40P implants sustained local release of bioactive molecules influencing mammary ductal development. Dev Biol 93: 272-278, 1982b.

Simon WE, Albrecht 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 73: 313-321, 1984.

Sirbasku DA, Kirkland WL. Control of cell growth IV. Growth properties of a new cell line established from an estrogen-dependent kidney tumor of the syrian hamster. Endocrinology 98: 1260, 1976.

Sitruk-Ware R, Sterkers N, Mauvais-Jarvis P. Benign breast disease I: Hormonal investigation. Obstet Gynecol 53: 457-460, 1979.

Sluyser M, Van Nie R. Estrogen receptor content and hormone-response growth of mouse mammary tumors. Cancer Res 34: 3253, 1974.

Smith H. The biology of human mammary epithelium in culture: The path viral transformation to human cancer. Perspectives on Cellular Regulation: From Bacteria to Cancer, pp. 225-234, 1991.

Sonnenschein C and Soto AM. Cell proliferation in metazoans: Negative control mechanisms. In: M. Lippman and R. Dickson (eds), Regulatory mechanisms in breast cancer, Kluwer Academic Publishers, Boston, 1991.

Soto AM and Sonnenschein C. Regulation of cell proliferation: The negative control perspective. Ann NY Acad Sci 628: 412-418, 1991.

Soto AM, Sonnenschein C. Cell proliferation of estrogen-sensitive cells: The case for negative control. Endocrine Rev 8:44-52, 1987.

Soto AM, Murai JT, Siiteri PK, Sonnenschein C. Control of cell proliferation: Evidence for negative control on estrogen-sensitive T-47D human breast cancer cells. Cancer Res 46: 2271-2275, 1986.

Sumida C, Pasqualini JR. Antiestrogens antagonize the stimulatory effect of Epidermal Growth Factor on the induction of progesterone receptor in fetal uterine cells in culture. Endocrinology 124: 591-597, 1989.

Sun M. Panel says Depo-Provera not proved safe. Science 226: 950-951, 1984.

Sutherland RL, Hall RE, Pang GYN, Musgrove EA, Clarke CL. Effects of medroxyprogesterone acetate on proliferation and cell cycle kinetics of human mammary carcinoma cells. *Cancer Res* 48: 5084-5091, 1988.

Sutherland D. Hormones and Cancer. In: *The Basic Science of Oncology*, Tannock IF y Hill RP (eds.), Pergamon Press, Toronto, pp 204-222, 1987.

Taylor C, Blanchard B, Zava DA. A simple method to determine whole cell uptake of radiolabeled estrogen and progesterone and their subcellular localization in breast cancer cell lines in monolayer cultures. *J Steroid Biochem* 20: 1083-1088, 1984.

Taylor-Papadimitriou J, Lane EB. Keratin expression in the mammary gland. En Neville MC, Daniel CW (eds). *The mammary gland*, New York, Plenum Press, 1987, pp 181-215.

Tonelli QJ, Sorof S. Epidermal Growth Factor requirement for development of cultures mammary gland. *Nature* 285: 250-252, 1980.

Topper YJ, Freeman CS. Multiple hormone interactions in the development biology of the mammary gland. *Physiol Rev* 60: 1049-1106, 1980.

Traish AM and Wotiz HH. Monoclonal and polyclonal antibodies to human progesterone receptor peptide-(533-547) recognize a specific site in unactivated (8S) and activated (4S) progesterone receptor and distinguish between intact and proteolyzed receptors. *Endocrinology* 127: 1167- 1175, 1990.

Tseng L, Gurbide E. Induction of human endometrial estradiol dehydrogenase by progestins. *Endocrinology* 97: 825, 1975.

van Roozendaal CEP, van Ooijen B, Claassen C, Eggermont AMM, Henzen-Logmans SC, Foekens JA. Stromal influences on breast cancer cell growth. *Br J Cancer* 65: 77-81, 1992.

Van Nie R, Thung PJ. Responsiveness of mouse mammary tumors to pregnancy. *Eur J Cancer* 1: 41, 1965.

van der Berg HW, Martin J, Lynch M. High progesterone receptor concentration in a variant of the ZR-75-1 human breast cancer cell line adapted to growth in oestrogen free conditions. *Br J Cancer* 61: 504-507, 1990.

Vegeto E, Cocciolo MG, Raspaglies F, Piffanelli A, Fontanelli R, Maggi A. Regulation of progesterone receptor gene expression. *Cancer Res* 50: 5291-5295, 1990.

Vegeto E, Allan GF, Schrader WT, Tsai M_J, McDonnell DP y O'Malley BW. The mechanism of RU486 antagonism is dependent on the conformation of the carboxy-terminal tail of the human progesterone receptor. *Cell* 69: 703-713, 1992.

Vignon F, Bardon S, Chalbos D, Rochefort H. Antiestrogenic effect of R5020, a syntetic progestin, in human breast cancer cells in culture. *J Clin Endocrinol Metab* 56: 1124-1130, 1983.

Vorherr H, Messer RHB: Breast cancer: Potentially predisposing and protecting factors. *Am J Obst Gynecol* 130: 335, 1978.

Walker MJ, Ronan SG, Han MC, Beattie CW, Das Gupta TK. Interrelationship between histopatological characteristics of melanoma an estrogen receptor status. *Cancer* 68: 184, 1991.

Wambach G, Higgins J. Antimineralocorticoids actions of progesterone in the rat: Correlation of the effect of electrolyte excretion and interactions with renal mineralocorticoid receptors. *Endocrinology* 102: 1686-1693, 1978.

Watson CS, Medina D, Clark JH. Characterization and estrogen stimulation of cytoplasmic progesterone receptor in the ovarian dependent MXT-3590 mammary tumor line. *Cancer Res* 39: 4098, 1979.

Watson CH, Medina D, Clark JH. Estrogen receptor characterization in a transplantable mouse mammary tumor. *Cancer Res* 3437: 3344-3348, 1977.

Welsch CW. Rodent models to examine in vivo hormonal regulation of mammary gland tumorigenesis. In: Medina D, Kidwell W, Heppner G, Anderson E (eds), *Cellular and Molecular Biology of Mammary Cancer*. Plenum Press, New York, pp 163-179, 1987.

Welsch CW, Louks G, Fox D, Brooks C. Enhancement by prolactin of carcinogen induced mammary carcinogenesis in the male rat. *Brit J Cancer* 32: 427, 1975.

Welsch CW, Clemens JA, Meites J. Effects of multiple pituitary homografts or progesterone in 7,12-dimethylthracene-induced mammary tumors in rats. *J Natl Cancer Inst* 41: 465, 1968.

Welsch CW, Nagasawa H. Prolactin and murine mammary tumorigenesis: a review. *Cancer Res* 37: 951, 1977.

Welsch CW. Growth inhibition of rat mammary carcinoma induced by Cis-Platinum diammino-dichloride-II. *JNCI* 47: 1071, 1971.

Wiest WG. Conversion of progesterone to 4-pregnen-20 α -ol-3-one by rat ovarian tissue in vitro. *J Biol Chem* 234: 3115-3121, 1959.

Wilding G, Chen M y Gelmann EP. LHRH agonists and human breast cancer cells. Nature 329: 770,1987.

Yanai R, Nagasawa H. Inhibition of mammary tumorigenesis by ergot alkaloids and promotion of mammary tumorigenesis by pituitary isografts in adreno-ovariectomized mice. J Natl Cancer Inst 48: 715, 1972.

Yang J, Guzman R, Richards J y Nandi S. Primary culture of mouse mammary tumor epithelial cells embedded in collagen gels. In vitro 16: 502-506, 1980c.

Yang J, Richards J, Imagawa W y Nandi S. Sustained growth in primary culture of normal mammary epithelial cells embedded in collagen gels. Proc Natl Acad Sci USA 77:2088-2092, 1980a.