

Análisis de las distintas subpoblaciones linfocitarias y de la citotoxicidad en ganglios axilares de enfermos con cáncer de mama. Correlación con los cambios histológicos

**J.L. Hernández,
M.L. Sanz,
J.M. Lera,
M. Albiach,
G. Zornoza**

Palabras clave

Cáncer de mama, Inmunidad, Poblaciones linfocitarias, Ganglios

Desde hace unos años, nos ha preocupado de manera especial el análisis del estado inmunitario en los enfermos cancerosos.¹⁻⁶ Todos los estudios realizados habían sido llevados a cabo sobre muestras sanguíneas periféricas; pero consideramos que los resultados así obtenidos podían ser o no la expresión final de lo que acontece a nivel regional en la respuesta inmune del huésped frente al tumor.

En este estudio nos propusimos analizar el estado inmunitario regional de enfermas con cáncer de mama, y para ello elegimos, como más idóneos, los ganglios axilares, por ser el primer escalón en la lucha del huésped frente al tumor mamario.

Son conocidos, desde el punto de vista anatomopatológico, los cambios morfológicos que experimentan los ganglios linfáticos frente a los estímulos antigénicos. Por otra parte se ha admitido, aunque no de forma general, que determinadas situaciones histológicas de los ganglios axilares, en enfermas con cáncer de mama, se relacionan con un pronóstico distinto. De ahí que el objetivo de nuestro estudio fuese establecer el fenotipo inmunológico de los linfocitos procedentes de los ganglios axilares, según las distintas situaciones morfológicas de los mismos.

Trabajo subvencionado por la
Consejería de Sanidad del Gobierno
Foral de Navarra

MATERIAL

Se han extraído para el estudio un total de 157 adenopatías, procedentes de vaciamientos axilares en el transcurso de 27 mastectomías radicales modificadas, tipo Patey o Auchincloss, en enfermas portadoras de un carcinoma de mama, todos ellos con la característica común de ser de tipo ductal e infiltrante.

MÉTODOS

Inmediatamente después de la extracción quirúrgica de la grasa axilar, se procedió a la selección de los ganglios de mayor tamaño, que, seccionados por la mitad, se enviaron una parte en suero fisiológico al Laboratorio de Inmunología y la otra en formol al de Anatomía Patológica.

Laboratorio de Anatomía Patológica: Se determinó la existencia de las siguientes características: Hiperplasia de centros germinativos o folicular, hiperplasia cortical o de áreas T, histiocitosis sinusal y no reactividad, así como su posible afectación tumoral.

Laboratorio de Inmunología: Aislamiento de linfocitos según técnica de Boyun.⁷ Determinación de rosetas E según técnica de Jondal modificada.⁸ Determinación de rosetas EAC según técnica de Bianco y cols.⁹ Determinación de rosetas E activas según técnica de Wybran y Fudenberg.¹⁰ Determinación de poblaciones y subpoblaciones linfocitarias por inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos monoclonales OKT-3, OKIa-1, OKT-8, OKT-4 (Ortho).

El análisis estadístico de los datos se realizó mediante la determinación del análisis de la varianza simple.

RESULTADOS

Hallazgos anatomopatológicos

El análisis de los 157 ganglios mostró invasión tumoral en 57 (36,3 %), histiocitosis simple de los senos en 58 (36,9 %), hiperplasia de zonas T en 60 (38,2 %) e hiperplasia folicular en 14 (8,9 %). Hubo 20 ganglios que no presentaban signos de estimulación morfológica ni afectación tumoral y 31 presentaron más de uno de estos caracteres.

En 24 ganglios invadidos se halló signos de estimulación, 9 con histiocitosis sinusal e hiperplasia de zonas T y 6 con hiperplasia folicular (tabla I).

TABLA I

RESULTADOS ANATOMOPATOLÓGICOS

Estado ganglionar	Invadidos (57)	No invadidos (100)	Total
Histiocitosis sinusal	9	49	58
Hiperplasia zonas T	9	51	60
Hiperplasia folicular	6	8	14
No estimulación	36	20	56

31 ganglios presentaban distintos tipos de estimulación a la vez.

Hallazgos inmunológicos

a) Grupo control

Se ha utilizado como grupo ganglionar «control» aquellos que no tenían signos de infiltración tumoral ni estimulación morfológica. En este sentido, hay que hacer referencia a la gran dificultad que existe para establecer un grupo ganglionar «normal», que no se evidencien como respuesta a un determinado estímulo. Frente a este problema, hemos optado, para la realización de este estudio, por considerar como grupo control los 20 ganglios comentados que no presentaban afectación tumoral ni signos morfológicos de estimulación.

En la figura 1 se esquematizan las distintas subpoblaciones linfocitarias en dos grupos diferentes de estudio, por una parte en muestras sanguíneas de 60 sujetos normales y por otra en el grupo control ganglionar. Evidentemente estas muestras no pueden ser comparables; de ahí que no se haya empleado ningún método estadístico

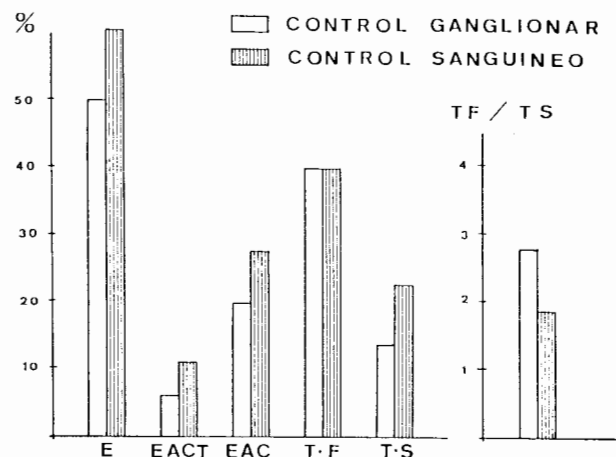


Fig. 1. Niveles medios de las distintas subpoblaciones linfocitarias e índice de linfocitos T-facilitadores/T-supresores en muestras ganglionares y sanguíneas.

para marcar las diferencias; pero sí pueden servir para orientar sobre la composición de las distintas subpoblaciones linfocitarias en los ganglios linfáticos. En éstos aparece el menor índice de todas las subpoblaciones linfocitarias, excepto de la T-supresora y T-facilitadora, con un mayor índice T-facilitador/T-supresor.

b) *Invasión ganglionar*

El segundo aspecto que había que valorar es si existen distintos patrones linfocitarios dependiendo de la invasión o no del ganglio por el tumor. Así, en la figura 2 se comprueba un aumento del índice T-facilitador/T-supresor en los ganglios sin invasión tumoral, provocado por el incremento de la subpoblación T-facilitadora.

Cabe preguntarse si el hecho de que haya estimulación morfológica en un ganglio invadido tiene traducción en la cuantificación, por parte del laboratorio de Inmunología, de las distintas subpoblaciones linfocitarias. Para responder a esta cuestión, se esquematiza en la figura 3 dos grupos de estudio, ganglios con y sin estimulación morfológica. En este análisis destaca un mayor porcentaje de rosetas E, linfocitos T-facilitadores y del índice T facilitador/T supresor en aquellos ganglios que están invadidos pero presentan estimulación morfológica (fig. 3).

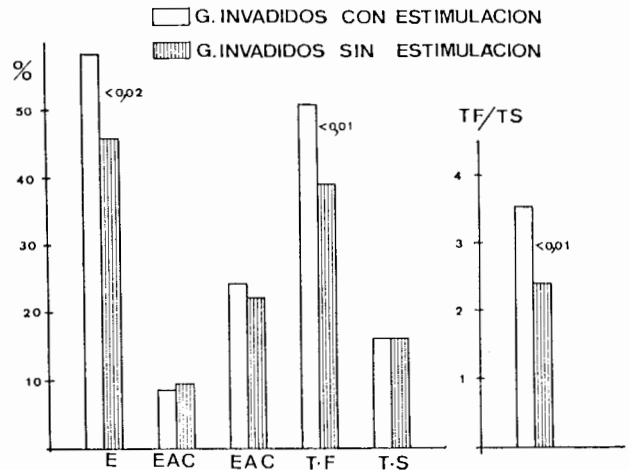


Fig. 3. Niveles medios de las distintas subpoblaciones linfocitarias e índice de linfocitos T-facilitadores/T-supresores en ganglios con invasión por cáncer de mama según tuviesen o no signos de estimulación morfológica.

c) *Histiocitosis sinusal*

Se analiza de forma global, independiente de la invasión tumoral, los ganglios con histiocitosis simple de los senos en comparación con el grupo control. Se encuentra un au-

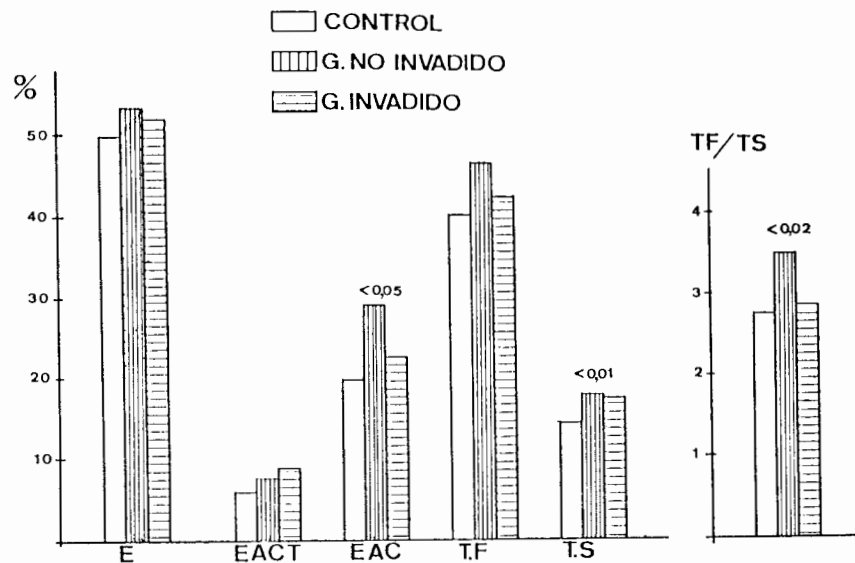


Fig. 2. Niveles medios de las distintas subpoblaciones linfocitarias e índice de linfocitos T-facilitadores/T-supresores en muestras ganglionares según tuviesen o no invasión tumoral.

mento de todas las subpoblaciones linfocitarias, especialmente de linfocitos T-facilitadores y del índice T-facilitador/T-supresor (fig. 4).

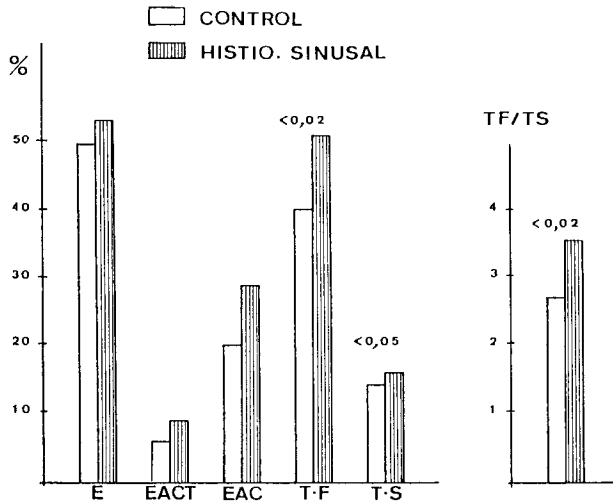


Fig. 4. Niveles medios de las distintas subpoblaciones linfocitarias e índice de linfocitos T-facilitadores/T-supresores en ganglios con histiocitosis sinusal.

d) Hiperplasia cortical o de áreas T

En comparación con el grupo control, y como sucede en el caso anterior, existe un incremento de todas las subpoblaciones, en especial de la fracción T-facilitadora y del índice T-facilitador/T-supresor (fig. 5).

e) Hiperplasia folicular

También en comparación con el grupo control, los ganglios con hiperplasia folicular presentan un incremento de rosetas EAC, T-facilitadores y T-supresores, pero el índice T-facilitador/T-supresor permanece en valores similares al grupo control (fig. 6).

f) Valoración conjunta

En la figura 7 se representa el valor medio del índice T-facilitador/T-supresor en los distintos grupos de estudio comentados. Con trazado lineal se remarca el valor medio obtenido en el grupo de control ganglionar. Únicamente se

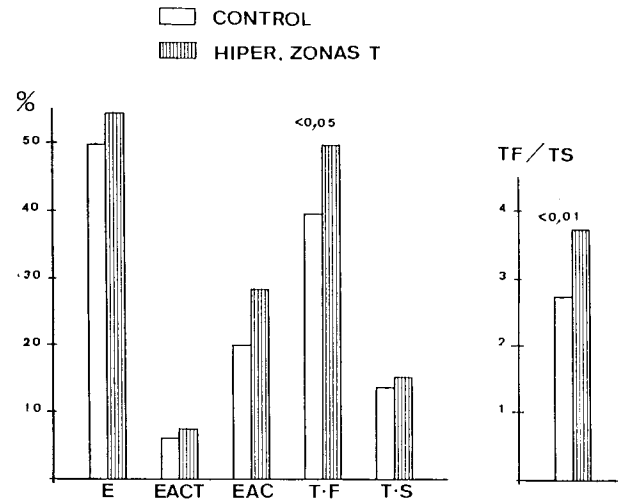


Fig. 5. Niveles medios de las distintas subpoblaciones linfocitarias e índice de linfocitos T-facilitadores/T-supresores en ganglios con hiperplasia de zonas T.

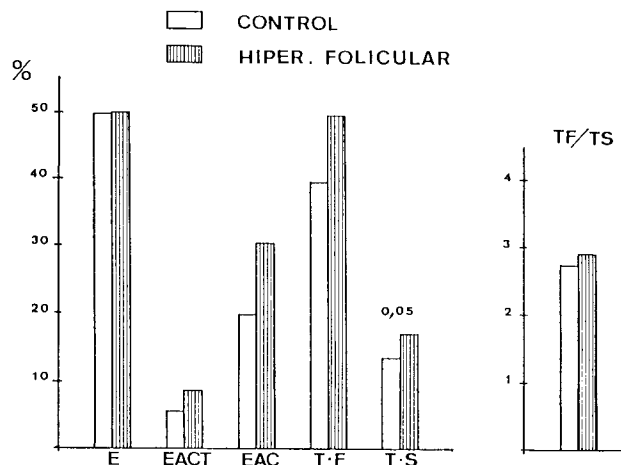


Fig. 6. Niveles medios de las distintas subpoblaciones linfocitarias e índice de linfocitos T-facilitadores/T-supresores en ganglios con hiperplasia folicular.

encuentran por debajo de éste aquellos ganglios invadidos por el tumor y sin estimulación morfológica, y los ganglios con hiperplasia folicular estuvieran o no invadidos por el tumor. Sin embargo, los mayores valores se obtienen en ganglios no invadidos y en los invadidos con estimulación, así como con histiocitosis de los senos e hiperplasia de zonas T.

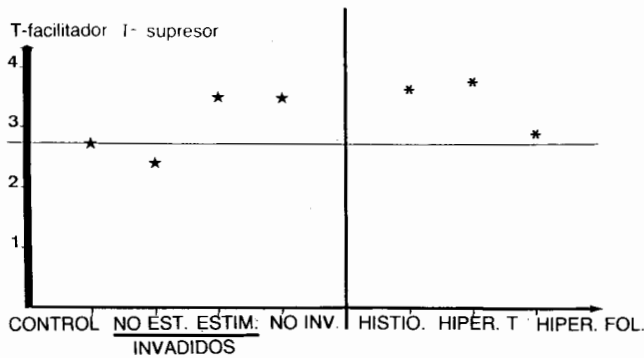


Fig. 7. Índices de linfocitos T-facilitadores/T-supresores en ganglios con y sin invasión tumoral, histiocitosis sinusal, hiperplasia de zonas T e hiperplasia folicular.

DISCUSION

Desde que Halsted desarrollase la mastectomía radical para el carcinoma de mama, se ha observado que determinadas reacciones proliferativas en los ganglios axilares de mujeres con cáncer de mama estaban asociadas con una supervivencia más prolongada.¹¹ Otros estudios¹² han confirmado sus hallazgos.¹² No obstante, ha existido confusión descriptiva sobre los distintos tipos de reacción ganglionar, hasta que en 1973 un memorándum de la Organización Mundial de la Salud recogió las características morfológicas de los ganglios linfáticos a propuestas de Cottier y cols.,¹³ aceptándose hoy en día la clasificación establecida por Tsakraklides y cols.,¹⁴ que se basa en la descripción de cuatro patrones morfológicos: predominio linfocítico, predominio de centros germinativos, depleción linfocítica y ganglios sin estimular. Numerosos estudios han relacionado la supervivencia de los enfermos con cáncer y las distintas formas de reacción de los ganglios linfáticos de drenaje.¹⁵⁻²¹

Respecto al cáncer de mama, hay que destacar los trabajos de Tsakraklides y cols.,^{19,22} en los que se analiza a 277 enfermas, encontrándose una correlación entre patrón histológico y supervivencia, al demostrar que el predominio linfocítico era más común en las enfermas con supervivencia prolongada, en contraposición con la depleción linfocítica, que se asociaba con una menor supervivencia. La hiperplasia de centros germinativos y las situaciones de no estimulación tenían un pronóstico intermedio.

Por otra parte, un infiltrado inflamatorio alrededor del tumor y la histiocitosis sinusal en los ganglios axilares de enfermas con cáncer de mama se ha correlacionado con una mejoría en el pronóstico.^{12,23-27}

Resumiendo estos estudios, Brynes y cols.²⁸ señalan que los pronósticos más favorables se asocian con un patrón de predominio linfocítico (hiperplasia paracortical con o sin histiocitosis sinusal). Se ha demostrado experimentalmente que este patrón está en relación con la inmunidad mediada por células.^{29,30}

De nuestros resultados cabe señalar en primer lugar las diferencias encontradas entre las muestras sanguíneas y ganglionares. En este sentido, destacan algunos estudios en los que se comprueba la diferente composición entre los ganglios y la sangre periférica,^{9,19,31,32} interpretándose este hallazgo como una mayor estimulación locorregional, provocada por la proximidad del tumor.^{33,34}

En segundo lugar, merece especial atención las diferencias halladas en los ganglios invadidos por el tumor con y sin estimulación inmunomorfológica, ya que aquellos ganglios invadidos con estimulación presentaban un patrón inmunológico similar a los ganglios sin invasión tumoral. Respecto a este hallazgo, no hemos encontrado ninguna referencia en la bibliografía consultada.

Desde el punto de vista clínico, parece muy interesante definir esta situación, ya que un ganglio invadido pero con estimulación puede representar un estado activo de respuesta del huésped frente al tumor, en contraposición de los invadidos sin estimulación, que pueden significar una pérdida de inmunocompetencia del huésped frente al tumor.

Por último, cabe comentar que las mejores situaciones desde el punto de vista inmunológico, definidas por el índice linfocitos T-facilitador/T-supresor, aparecen en ganglios no invadidos y en aquellos con hiperplasia de zonas T e histiocitosis sinusal, mientras que las peores se dan en los ganglios invadidos sin estimulación inmunomorfológica y en los que presentaban un patrón de hiperplasia de centros germinativos o hiperplasia folicular. Estos hallazgos se corroboran con los estudios comentados anteriormente, respecto a la supervivencia de las enfermas con cáncer de mama según los distintos cambios inmunomorfológicos de los ganglios regionales.

Durante el examen histológico rutinario de los ganglios axilares extirpados mediante la cirugía por cáncer de mama, Hunter y cols.³⁵ refirieron que la hiperplasia de centros germinativos estaba frecuentemente localizada muy cerca o dentro de los ganglios linfáticos con metástasis por el tumor. Por otra parte, tumores pequeños y localizados suelen estar asociados con histiocitosis sinusal en los ganglios axilares. Si hay metástasis se localizan frecuentemente cerca de los linfáticos aferentes y de centros germinativos hiperplásicos y alejados de las zonas con histiocitosis sinusal. Estos patrones inmunomorfológicos pue-

den explicarse por la hipótesis de que las células tumorales viables estimulan la histiocitosis sinusal como una manifestación morfológica de inmunidad mediada por células, la cual previene la producción de metástasis. Sin embargo, en tumores grandes, cuando parte del tumor está necrótico, detritus celulares llegan a los ganglios linfáticos y estimulan la hiperplasia de centros germinativos, los cuales responden con la producción de anticuerpos. En ambas situaciones la respuesta inmune es frente a los antígenos asociados a tumores; pero los detritus del tumor parecen tener diferentes antígenos que la célula tumoral viable. En el patrón de hiperplasia de centros germinativos las células B son las más importantes, y pueden estar asociadas con la producción de factores bloqueantes.^{36,37}

Nuestros resultados pueden explicarse bajo esta hipótesis con los mejores índices de linfocitos T-facilitador/T-supresor en ganglios con hiperplasia de áreas T e histiocitosis y con menores índices en patrones de predominio de centros germinativos.

Distintos estudios han demostrado la inmunocompetencia de los linfocitos hallados en muestras ganglionares.^{33, 38-40} Parece obvio que los ganglios regionales sin afectación metastásica contienen células capaces de responder a la estimulación provocada por el tumor. En base a este razonamiento cabe preguntarse, ¿están indicados los vaciamientos ganglionares axilares en enfermas con cáncer de mama? Esta pregunta se repite en multitud de artículos, y en el momento actual su contestación permanece en el aire. Por una parte, está demostrado que los ganglios regionales de un tumor son una barrera para el crecimiento de éste. Alexander y Hall⁴¹ demostraron que la preservación de ganglios regionales en animales con sarcoma prevenía la formación de metástasis pulmonares. Por otro lado, hay ganglios que han perdido la inmunocompetencia y que no son útiles para frenar el crecimiento tumoral. En

este sentido, hay que hacer especial hincapié en la distinta composición de los ganglios invadidos con y sin estimulación, ya que unos pueden ser activos en la defensa del huésped y otros no.

Sin embargo, es imprescindible, para la correcta tabulación de las enfermas con cáncer de mama, conocer la situación de los ganglios axilares.

Creemos que una postura correcta puede ser reducir la exéresis ganglionar a un número que permita un estadiaje correcto, además de un estudio funcional, quedando el resto como potencial barrera inmunológica frente al crecimiento tumoral.

RESUMEN

Se analizan 157 ganglios procedentes del vaciamiento axilar en enfermas con cáncer de mama. Una parte del ganglio es enviada al laboratorio de anatomía patológica, donde se informa de la existencia de invasión tumoral, histiocitosis sinusal, hiperplasia de zonas T e hiperplasia folicular. La otra parte del ganglio es procesada por el laboratorio de Inmunología, cuantificándose las distintas subpoblaciones linfocitarias.

Se analizan éstas dependiendo de las características morfológicas de los ganglios. De los resultados obtenidos, cabe destacar que los menores índices de linfocitos T-facilitadores/T-supresores aparecen en los ganglios invadidos por el tumor y sin estimulación desde el punto de vista morfológico, así como en aquellos ganglios con hiperplasia folicular estén o no invadidos por tumor.

Se comentan los resultados obtenidos en relación con el pronóstico clínico según la existencia o no de estimulación ganglionar desde el punto de vista morfológico.

REFERENCIAS

1. Crisci CD, Zornoza G, Sanz ML, Hernández JL, Subirá ML, Voltas J, Oehling A. The effect of surgery and postoperative radiotherapy on lymphocyte subpopulations in breast cancer. One year follow up study. *Allergol et Immunopathol* 1979; 7: 365.
2. Hernández JL, Sanz ML, Crisci CD, Voltas J, Subirá ML, Zornoza G, Oehling A. Lymphocyte subpopulations in colo-rectal cancer-preoperative evaluation. *Allergol et Immunopathol* 1978; 6: 339.
3. Sanz ML, Crisci CD, Hernández JL, Subirá ML, Voltas J, Zornoza G, Oehling A. Lymphocyte subpopulations in gastric cancer. Preoperative evaluation. *Allergol et Immunopathol* 1978; 6: 415.
4. Zornoza G, Crisci CD, Hernández JL, Sanz ML, Subirá ML, Voltas J, Oehling A. Lymphocyte subpopulations in breast cancer and fibrocystic disease of the breast. Preoperative evaluation. *Senologia* 1980; 5: 137-142.
5. Zornoza G, Hernández JL, Goena I, De Oca J, Sanz ML. Behavior of serum immunoglobulins in fibrocystic disease (FCD) and breast cancer (BC). Evaluation according to the stage and the treatment applied. *Senologia* 1981; 6: 33-38.
6. Zornoza G, Hernández JL, Sanz ML, Fernández J, Goena I, Lera JM. Estudio de las células B e inmunoglobulinas séricas en enfermas con patología mamaria. *Rev Esp Oncología* 1981; 28: 17-27.
7. Boyum A. Isolation of lymphocytes from human blood. *Scand J Lab Clin Invest (Suppl)* 1968; 97: 9.
8. Jondal M, Holm G, Wigzell N. Surface markers in human T

- and B lymphocytes. I. A large population of lymphocytes forming non-immune rosettes with sheep red blood cells. *J Exp Med* 1972; 136: 207.
9. Bianco C, Patrick R, Nussenzweig V. A population of lymphocytes bearing a membrane receptor for antigen-antibody complement complexes. I. Separating and characterization. *J Exp Med* 1970; 132: 702-720.
 10. Wybran J, Fundenberg HH. Tymus derived rosette-forming cells in various human disease states cancer, lymphoma, bacterial and viral infections and other diseases. *J Clin Invest* 1973; 52: 1.026.
 11. Halsted W. A clinical and histological study of certain adenocarcinomata of the breast. *J Am Surg Assoc* 1898; 15: 114-181.
 12. Black MM, Kerpe S, Speer FD. Lymph node structure in patients with carcinoma of the breast. *Am J Pathol* 1953; 29: 505-521.
 13. Cottier H, Turk J, Sobin L. A proposal for a standardized system of reporting human lymph node morphology in relation to immunologic function. *J Clin Pathol* 1973; 26: 317-331.
 14. Tsakraklides V, Anastassiades OT, Kersey JH. Prognostic significance of regional lymph node histology in uterine cervical cancer. *Cancer* 1973; 31: 860-868.
 15. Black MM, Opler SR, Speer FD. Microscopic structure of gastric carcinomas and their regional lymph nodes in relation to survival. *Surg Gynecol Obstet* 1954; 98: 725-734.
 16. Kaufmann M, Wirth K, Scheurer JC et al. Immunomorphological lymph node changes in patients with operable bronchogenic squamous cell carcinoma. *Cancer* 1977; 39: 2.372-2.377.
 17. Kodama Y, Soejima K, Inokuchi K. Reactive hyperplasia of paracortex and germinal centers of the regional lymph nodes in gastric carcinoma cases as a favorable prognostic indicator. *Jpn J Surg* 1976; 6: 9-18.
 18. Patt DJ, Brynes RK, Vardiman JM et al. Mesocolic lymph node histology is an important prognostic indicator with patients with carcinoma of the sigmoid colon: An immunomorphologic study. *Cancer Res* 1976; 36: 3.665-3.671.
 19. Tsakraklides E, Tsakraklides V, Ashikari H, Rosen PP, Siegal FP, Robbins GP, Good RA. In vitro studies of axillary lymph node cells in patients with breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1975; 54: 549-556.
 20. Van Nagell JR, Donaldson ES, Parker JC et al. Prognostic significance of pelvic lymph node morphology in carcinoma of the uterine cervix. *Cancer* 1977; 39: 2.624-2.632.
 21. Weidner F. Comparative histological studies of regional lymph node of 201 melanomas patients. *Arch Dermatol Res* 1979; 266: 161-175.
 22. Tsakraklides V, Olson P, Kersey JM, Good RA. Prognostic significance of the regional lymph node histology in cancer of the breast. *Cancer* 1974; 34: 1.259-1.267.
 23. Anastassiades OT, Pryce DM. Immunological significance of the morphological changes in lymph nodes draining breast cancer. *Br J Cancer* 1966; 20: 239.
 24. Black MM, Speer FD, Opler SR. Structural representations of tumor-host relationship in mammary carcinoma. Biological and prognostic significance. *Am J Clin Pathol* 1956; 26: 250.
 25. Black MM. Human breast cancer. A model for cancer immunology. *Isr J Med Sci* 1973; 9: 284.
 26. Hamlin IME. Possible host resistance in carcinoma of the breast. A histological study. *Br J Cancer* 1968; 22: 383.
 27. Silverberg SG, Chitale AR, Hind AD, Frazier AB, Levitt SH. Sinus histiocytosis and mammary carcinoma study of 363 radical mastectomies and an historical review. *Cancer* 1970; 20: 1.177.
 28. Brynes RK, Hunter RL, Vellios R. Immunomorphologic changes in regional lymph nodes associated with cancer. *Arch Pathol Lab Med* 1983; 107: 217-221.
 29. Check IJ, Cobb M, Hunter RL. The relationship between cytotoxicity and prognostically significant histologic changes in lymph nodes from patients with cancer of the breast. *Am J Pathol* 1980; 98: 325-338.
 30. Phil E, Nairn RC, Nind AR et al. Correlation of regional lymph node in vitro antitumor immunoreactivity histology with colorectal carcinoma. *Cancer Res* 1976; 36: 3.665-3.671.
 31. Dukor P, Bianco C, Nussenzweig V. Tissue localization of lymphocytes bearing a membrane receptor for antigen-antibody complement complexes: *Proc Natl Acad Sci USA* 1970; 67: 991-997.
 32. Shevach EM, Jaffe ES, Green I. Receptors form complement and immunoglobulin on human and animal lymphoid cells. *Transplant Rev* 1973; 16: 3-28.
 33. Deodhar SD, Crile G, Esselstyn CB Jr. Study of the tumor cell-lymphocyte interaction in patients with breast cancer. *Cancer* 1972; 29: 132-135.
 34. Vanky F, Stjernsward J, Nilsson et al. Differences in the tumor-associated reactivity of blood lymphocytes and tumor-draining lymph node cells in sarcoma patients. *J Natl Cancer Inst* 1973; 51: 17-24.
 35. Hunter RL, Ferguson DJ, Coppleson LW. Survival with mammary cancer related to the interaction of germinal center hyperplasia and sinus histiocytosis in axillary and internal mammary lymph nodes. *Cancer* 1975; 36: 528-539.
 36. Hellstrom I, Evans CA, Hellstrom KE. Cellular immunity and its serum-mediated inhibition in shape-virus-induced vabbit papillomas. *Int J Cancer* 1969; 4: 601.
 37. Lera JM. Inmunocomplejos circulantes en el cáncer de mama: significado pronóstico en relación con otros factores. Tesis Doctoral. Universidad de Navarra. Junio 1986.
 38. Fisher B, Saffer EA, Fisher ER. Studies concerning the regional lymph nodes in cancer. III. Response of regional lymph nodes cells from breast and colon cancer patients to PHA stimulation. *Cancer* 1972; 30: 1.202-1.215.
 39. Fisher ER, Saffer E, Fisher B. Studies concerning the regional lymph nodes in cancer. VI. Correlation of lymphocyte transformation of regional node cells and some histopathologic discriminants. *Cancer* 1973; 32: 104-111.
 40. Kojima V, Fujita Y, Sakita M, Nishioja B, Majima S. Immunomorphologic study of regional lymph nodes in cancer: Response of regional lymph node cells from gastric and colorectal cancer to PHA stimulation. *Jpn J Surg* 1980; 10: 212-220.
 41. Alexander P, Hall J. The role of immunoblasts in host resistance and immunotherapy of primary sarcomata. *Adv Cancer Res* 1970; 13: 37.