

Cultivo «in vitro» de células procedentes de tumores mamarios: posibilidades y problemas metodológicos a la luz de nuestra experiencia*

R. Gil,
C. López-Ginés,
A. Pellín

Departamento de Patología
(Director: Prof. A. Llombart-Bosch).
Facultad de Medicina. Universidad
de Valencia.

Correspondencia:

R. Gil.
Departamento de Patología.
Facultad de Medicina.
Avda. Blasco Ibáñez, 17.
46010 Valencia.

* Este trabajo ha sido efectuado con ayuda de la Consellería de Sanidad y Consumo de la Generalitat de Valencia para el Programa de Prevención de Minusvalías Psíquicas.

SUMMARY

Presently work is in progress to obtain an idoneous technique for primary culture of breast tumor cells because although this is the most frequent neoplasm in women, it shows great difficulties for the adaptation of the cells to growth «in vitro», as well as for cytogenetic studies. These inconvenients arrive from the compact structure of this type of tumor and the nutritive requirement of cells out of the organism. To solve these problems studies are focussed to obtaining 1) an adequate cellular disociation 2) an adequate culture substrate 3) an idoneous culture medium 4) a specific marker for these cultured tumoral cells.

In our experience with 25 processed samples, growth was observed in 20 cases. The morphology of the cells was predominantly epithelial with growth in colonies, variable nuclear size and large nucleoli.

Key words

Cultured cells, Breast tumors.

Palabras clave

Cultivos celulares, Tumores de mama.

INTRODUCCION

Las técnicas de cultivos celulares se han desarrollado desde principios de siglo¹ y han demostrado su utilidad en diversos campos de la medicina.^{2,3} Son muchos los tipos celulares que se han intentado adaptar a condiciones de vida «in vitro», pero no todos ellos responden de la misma manera, existiendo una gran heterogeneidad en cuanto al rendimiento en cultivo, curvas de crecimiento, duración, etc. También son numerosos los tumores que se han conseguido mantener en cultivo «in vitro», pero tampoco muestran una respuesta común, puesto que mientras unas células tumorales crecen y se dividen con extrema facilidad e incluso sufren pérdida de la inhibición por contacto,⁴ otras lo hacen difícilmente y ni siquiera logran un crecimiento inicial satisfactorio.⁵

Son varios los objetivos que se pretenden conseguir con los cultivos de células tumorales en general y de los tumores de mama en particular:

1. La obtención de un modelo experimental en condiciones ambientales perfectamente controladas que nos permita realizar diversos análisis biológicos.
2. Comprender mejor tanto los procesos moleculares de la carcinogénesis como las diferencias entre células normales, preneoplásicas y neoplásicas para que puedan ser implantados unos regímenes terapéuticos más adecuados y se pueda realizar una mejor prevención.
3. Identificar aquellos agentes que causan el cáncer de modo que su exposición pueda ser minimizada.

4. Identificar los factores heredados o adquiridos que influyen en el riesgo individual de desarrollar un cáncer para que pueda ser iniciada una intervención apropiada.

Con los cultivos se obtiene un método de estudio complementario al de la experimentación animal en el estudio de la carcinogénesis, ya que si bien en el organismo animal se analiza el complicado proceso de la carcinogénesis en las interacciones multisistémicas propias de un organismo intacto, el modelo de cultivo «in vitro» tiene la ventaja de utilizar tejidos y células humanos y puede servir de puente entre los conocimientos adquiridos con la experimentación animal y su extrapolación a la patología humana.

CONDICIONES DE CULTIVO

El cultivo de células tumorales mamarias se inició en 1937 por Cameron,⁶ pero no fue hasta 1978 cuando Lasfargues y Ozzello publicaron la obtención del primer cultivo a largo plazo.⁷

Son muchas las dificultades técnicas existentes para la obtención de los cultivos de tumores mamarios tanto primarios (los que se obtienen directamente del tejido tumoral) como de larga duración, también llamados líneas celulares establecidas (aquellos cultivos que provienen de subcultivos de un cultivo primario y que se han adaptado a la vida en cultivo, reproduciéndose continuamente).

Las principales dificultades metodológicas son:

1. Lograr una adecuada disociación celular, ya que en su mayoría los tumores mamarios presentan una textura muy compacta que dificulta la actuación enzimática.
2. Hallar un sustrato apropiado para la adhesión y proliferación de las células epiteliales que al mismo tiempo impida la masiva proliferación de fibroblastos adyacentes.⁸
3. Conseguir un medio de cultivo idóneo que aporte los nutrientes necesarios para cubrir las necesidades específicas de estas células a sus nuevas y extrañas condiciones fuera del organismo vivo.
4. Encontrar un marcador específico de las células tumorales cultivadas.

DISOCIACION CELULAR

Una buena disociación del tejido tumoral es fundamental para la adhesión de las células al sustrato y el

éxito del cultivo. Las células se obtienen a partir de tumores sólidos de mama por disgregación con distintas enzimas. El más empleado es la colagenasa, utilizado sólo^{8,11} o mezclado con otras enzimas, como DNAasa,¹² hialuronidasa^{13,15} y pronasa.¹⁶ También son muy variados los tiempos de exposición a estas enzimas desde 24 horas,^{10,16} a 7 días.¹⁹

SUSTRATO PARA EL CULTIVO

En un esfuerzo por mejorar el rendimiento de los cultivos y lograr una menor presencia en ellos de células normales, tanto fibroblásticas como epiteliales, se han desarrollado diferentes técnicas consistentes en utilizar distintos sustratos de materiales más afines a la superficie celular,¹⁷ como, por ejemplo, geles de colágeno,¹⁸ agar^{19,20} o matriz extracelular.¹⁴

De estos tres sistemas el más utilizado es el cultivo «in vitro» en agar semisólido. Este sistema viene siendo utilizado en un intento de mejorar el rendimiento de los cultivos^{12,21,22} y realizar ensayos clonogénicos, ya que es selectivo para el crecimiento tumoral.²³ El cultivo en agar semisólido ha sido utilizado para evaluar los receptores hormonales del tumor mamario,²⁴ también para realizar estudios de quimio-sensibilidad «in vitro», ya que se mantiene en él una buena correlación entre la sensibilidad a ciertas drogas y las respuestas clínicas de los pacientes, y puede llegar incluso a ser válido en un estudio prospectivo para probar nuevos agentes químicos para el tratamiento del cáncer mamario humano.²⁴

Otros autores han utilizado un sustrato natural llamado matriz extracelular (ECM) formado por membranas de células previamente adheridas al plástico del frasco de cultivo (por ejemplo, células endoteliales de la córnea) y luego rotas con triton X que dejan una fina capa membranosa sobre la cual se depositan las células del tumor mamario.¹⁴

MEDIOS DE CULTIVO

Una tercera dificultad importante radica en encontrar el medio de cultivo adecuado. Los diferentes medios utilizados llegan a ser muy complejos. El medio de cultivo más utilizado actualmente es una mezcla al 50 % de MEM y F12 suplementado con suero bovino fetal en concentración final del 1-5 % al que se añaden factores que varían de unos autores a otros. Algunos de es-

tos medios son muy complejos con la incorporación de insulina, factor de crecimiento epidérmico, triyodotironina, hidrocortisona, toxina del cólera, fibronectina, fosfoetanolamina, ácido ascórbico, elementos traza, transferrina, estradiol y AMP cíclico.¹⁰ Estos autores incorporan también medios condicionados por líneas celulares establecidas de distintos orígenes, por ejemplo línea celular de intestino humano fetal Hs74 Int y línea celular epitelial de vejiga H5767 Bl o línea celular mioepitelial humana Hs578 Bst.²⁵ Existe una cierta tendencia al desarrollo de los llamados «medios libres de suero» que implican la eliminación del suero bovino fetal de los medios de cultivo, ya que ésta es la única fracción de los mismos químicamente no conocida y controlada. La eliminación del suero implica la incorporación de muy distintos componentes que tratan de suplir los efectos estimuladores del crecimiento existentes en el suero bovino fetal. Se han elaborado distintos medios que se utilizan sin suero tanto para cultivos primarios¹⁴ como para líneas establecidas.²⁵

MARCADORES CELULARES

Otra dificultad importante para la utilización de los cultivos primarios de células tumorales de mama viene siendo el identificar las poblaciones celulares que se hallan presentes en el cultivo y determinar las que son de naturaleza tumoral. Es difícil distinguir entre las células del carcinoma y las células normales presentes en el cultivo, tales como son las células mioepiteliales y células endoteliales de los vasos.¹⁰ Para resolver este problema que limita mucho las aplicaciones de los cultivos primarios de mama se ha intentado en primer lugar identificar por varios criterios las células epiteliales. Estas células muestran morfología organoide, marcadores ultraestructurales,¹³ queratina,²⁶ fibronectina asociada a la célula²⁶ y antígenos epiteliales mamarios.⁸ No obstante, persiste el problema todavía no resuelto de encontrar un marcador tumoral específico para células tumorales mamarias humanas creciendo «in vitro», ya que los anteriormente citados aparecen tanto en las células epiteliales tumorales como en las normales del tejido adyacente al tumor. El disponer de un marcador tumoral específico sería fundamental para poder establecer el porcentaje de células tumorales en el cultivo; en principio se pensó que todas las células epiteliales obtenidas a partir de un carcinoma mamario eran células tumorales.²⁷ Sin embargo, existe la posibilidad de una contaminación por células epiteliales de

tejido normal mamario que para algunos autores alcanzaría alrededor de un 10 % como mínimo.¹⁴

LÍNEAS CELULARES ESTABLECIDAS

Las líneas celulares de tumor de mama son necesarias en la investigación del cáncer mamario, pero se han podido establecer muy pocas. En este campo se han obtenido mejores resultados con células procedentes de efusiones metastásicas, ya que tienen la ventaja de aportar gran número de células tumorales viables con muy pocos fibroblastos normales.²⁸ En la tabla I se indican las líneas celulares catalogadas por la ATCC y se especifica el tejido de obtención de la línea, indicando cuáles proceden de tejido mamario normal, tejido fibroquístico, carcinoma primario o efusiones pleurales. Las líneas celulares establecidas han podido ser bien caracterizadas citogenéticamente, siendo en su mayoría aneuploides.^{29, 30}

CULTIVOS PRIMARIOS

A pesar de ser cada vez más numerosas las publicaciones en el campo de los cultivos primarios de tumores sólidos mamarios no se ha conseguido el rendimiento óptimo tanto a nivel del número de células obtenidas (que normalmente es pobre y con viabilidad baja), como del mantenimiento del cultivo. El número de mitosis simultáneas en el cultivo suele ser bajo y muchas veces insuficiente para realizar un buen estudio citogenético, ya que las mitosis obtenidas no son generalmente de buena calidad para permitir realizar técnicas de bandedo. En este sentido, y debido a estas dificultades, hay un marcado contraste entre los datos obtenidos por los análisis citogenéticos y los resultantes del estudio del contenido en ADN por técnicas de fotometría de flujo.³¹ Esta disconformidad puede ser debida al bajo número de mitosis generalmente obtenido y que además presentan una gran heterogeneidad tanto con respecto al número de cromosomas como al número de marcadores; mientras que la citometría de flujo permite el estudio de un gran número de células que puede resultar mucho más representativo, si bien no aporta el conocimiento cualitativo de las anomalías cromosómicas que se han podido producir en el tumor.

A pesar de todas estas dificultades se sigue trabajando en la obtención de técnicas de cultivo primario más adecuadas, ya que el carcinoma de mama sigue

TABLA I

LISTADO DE LAS LINEAS CELULARES ESTABLECIDAS A PARTIR DEL TEJIDO MAMARIO NORMAL Y TUMORAL

Denominación	N.º ATCC	Procedencia	Tratamiento	Morfología	Tumorigénico
BT-483	ATCC HTB 121	Carcinoma ductal infiltrante	Sin especificar	Epiteliales Pleomórfica	Si
BT-549	ATCC HTB 122	Carcinoma ductal infiltrante	Sin especificar	Epitelial y cel. gigantes multinucleadas	—
DH-4475	ATCC HTB 123	Tumor mamario	Quimioterapia	Suspensión	Si
Hs 578 T	ATCC HTB 126	Carcinoma ductal	Radioterapia	Epitelial	Si
MDA-MB-330	ATCC HTB 127	Efusión pleural de carcinoma de mama infiltrante	Radioterapia	Epitelial	No
MDA-MB-415	ATCC HTB 128	Efusión pleural de adenocarcinoma invasivo de mama	Radioterapia	Epitelial	No
MDA-MB-4355	ATCC HTB 129	Efusión pleural de adenocarcinoma ductal de mama	No	Fusiforme	No
MDA-MB-436	ATCC HTB 130	Efusión pleural de adenocarcinoma de mama	Radioterapia Quimioterapia	Pleomórfico con células multinucleadas	No
MDA-MB-453	ATCC HTB 131	Efusión pleural de carcinoma de mama	Radioterapia Quimioterapia	Epitelial	No
MDA-MB-468	ATCC HTB 132	Efusión pleural de adenocarcinoma de mama	Radioterapia Quimioterapia	Epitelial	Si
T-47 D	ATCC HTB 133	Efusión pleural de adenocarcinoma ductal infiltrante de mama	Sin especificar	Epitelial	?
HBL-100	ATCC HTB 124	Secreción láctea	No	Epitelial	No
Hs 578 Bst	ATCC HTB 125	Tejido mamario normal	Radioterapia	Fibroblástica	No

sin estar bien caracterizado citogenéticamente por las dificultades antes mencionadas y a que debido a la compacta textura del tejido la obtención del cariotipo por prueba directa a partir del tumor es también muy difícil.³² Los cultivos primarios tienen la ventaja sobre las líneas establecidas de presentar características estables y similares al tejido original (cariotipo, enzimas, etc.), ya que en las líneas establecidas se produce una inestabilidad debido, entre otras causas, a la heterogeneidad de la población inicial, lo que hace que tras los primeros subcultivos aparezca una constitución cromosómica aneuploide, como ya habíamos comentado. En este sentido se está trabajando también en la obtención de cultivos primarios de tejidos mamaros humanos normales, que servirían de control para los tumorales.¹⁴ Se han obtenido algunas líneas celulares procedentes de este tipo de tejidos, así como de tejido mamario fibroquístico.¹¹

NUESTRA EXPERIENCIA

Con vistas a adecuar la técnica de cultivo de tumor mamario, en nuestro laboratorio se han procesado hasta el momento un total de 25 muestras de tumor mamario procedentes de material de biopsias extemporáneas.

Al iniciar la experiencia nuestro interés radicaba sobre todo en adaptar una técnica de cultivo que permitiera obtener un crecimiento celular suficiente para realizar estudios citogenéticos, para lo cual se necesita obtener un número suficiente de mitosis, y, lo que es más importante, que la calidad de las mitosis permita realizar técnicas de bandeo para posterior identificación de las anomalías cromosómicas que existen en el tumor.

De nuestra experiencia personal, obtenemos las siguientes conclusiones:

CULTIVO «IN VITRO» DE CELULAS PROCEDENTES DE TUMORES MAMARIOS...

1. Es necesario prevenir una contaminación inicial por microorganismos. Para ello la toma de muestras se realizó en medio de cultivo conteniendo penicilina, estreptomycin y gentamicina y después de trocear la pieza se efectuaron varios lavados con solución salina con antibióticos.
2. Respecto a la duración del tratamiento enzimático se han probado distintos tiempos de incubación con colagenasa tipo II a concentración de 2 gr disueltos en 100 ml de medio de cultivo completo y trazas de DNasa. En nuestra experiencia la incubación adecuada es de 2 a 5 horas, dependiendo de la textura del tumor. Con tiempos de actuación más prolongados se consiguieron un mayor número de células aisladas, pero con una viabilidad menor, lo que va en detrimento del rendimiento posterior del cultivo. También se han obtenido mejores resultados utilizando para la incubación medio con SBF y L-glutamina que con la utilización de medio libre de suero.
3. Tras probar distintos medios de cultivo se ha optado por utilizar el medio MEM-F12 (1:1), que ha dado mejores resultados que los medios MEM, RPMI y F12. Este medio ha sido suplementado con el SBF a concentración del 5 %, ya que en menor cantidad las células se quedan estabilizadas sin multiplicarse y cantidades superiores parecen inhibir el crecimiento celular. Este medio se ha suplementado con determinadas sustancias, tales como factor de crecimiento epidérmico y endotelial, insulina, transferrina, selenito sódico, medio condicionado por líneas celulares de mama, etc. La incorporación de estos factores en nuestro caso no ha supuesto ninguna mejora en el rendimiento del cultivo.
4. La elección del momento de sacrificio del cultivo depende de la observación directa del mismo para conocer el momento de mayor índice mitótico. En nuestra experiencia el sacrificio se ha realizado entre las 24 horas y los 21 días, obteniéndose el mayor número de mitosis en los cultivos sacrificados entre los 3 y 6 días de la siembra. También se han conseguido mejores resultados al sacrificar los cultivos primarios antes de realizarse los subcultivos, ya que estas células soportan mal el tratamiento con tripsina y los fibroblastos pueden llegar a invadir el cultivo.

Del total de las 25 muestras procesadas, en 20 hubo crecimiento de células tumorales. La morfología de estas células ha sido muy heterogénea, predominando las



Fig. 1. Cultivo procedente de tumor de mama, a los 3 días de la siembra. Las células presentan forma epitelial con núcleos de tamaño variable (20x).

de apariencia epitelial (fig. 1), con crecimiento en placas o colonias (fig. 2) que van aumentando en número de células, si bien éstas no llegan a confluir en monocapa. En algunos cultivos, sin embargo, las células tenían formas redondeadas o alargadas con citoplasmas muy densos, que también crecían en forma de placa o colonia.

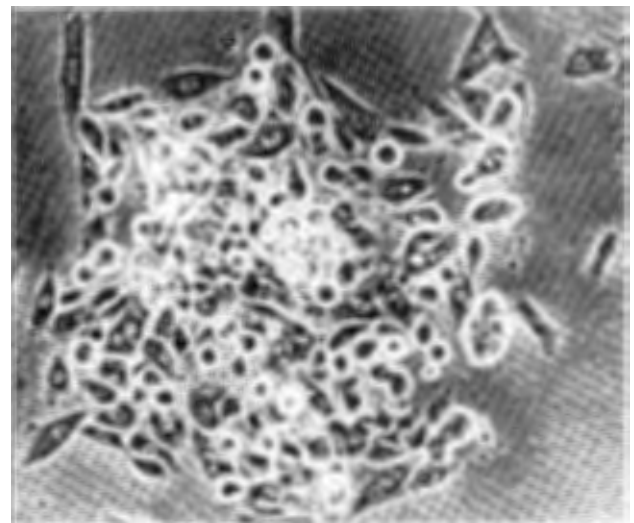


Fig. 2. Cultivo de células procedente de tumor de mama a los 5 días de la siembra, mostrando crecimiento en colonia. Algunas células presentan varios núcleos (20x).

Común a todos los cultivos fue la presencia de nucleolos prominentes y de células bi o multinucleadas, así como la gran variación en el tamaño de los núcleos.

APLICACIONES Y PERSPECTIVAS

Las aplicaciones de los cultivos primarios de tumores de mama son, como anteriormente hemos expuesto, muy variadas. Actualmente están siendo encaminados principalmente a la obtención del cariotipo para estudios citogenéticos, por las dificultades antes expuestas de realizar estos estudios por prueba directa debido a la gran complejidad de la técnica; otra importante vía de estudio con estos cultivos es la de realizar estudios metabólicos principalmente encaminados al conocimiento del mecanismo hormonal de estas células tumorales. También se aplican para estudios de biología molecular orientados a la localización de oncogenes o de genes alterados. Y por último es de destacar su utilización para realizar ensayos terapéuticos tanto de las drogas actualmente utilizadas en el tratamiento del cáncer mamario como con un carácter prospectivo de drogas nuevas que puedan mostrar un efecto citotóxico menor. Estos datos serían de una gran importancia clí-

nica, ya que al tratarse de células humanas podrían extrapolarse al uso clínico.

RESUMEN

Actualmente se está trabajando para conseguir una técnica idónea para el cultivo primario de células procedentes de tumores mamarios, ya que aun siendo ésta la más frecuente de las neoplasias en mujeres, presenta grandes dificultades para la adaptación de sus células al crecimiento «in vitro», así como para el procesamiento de las mismas con vistas a realizar estudios citogenéticos. Estos inconvenientes se derivan de la textura generalmente compacta del tumor y de las necesidades nutritivas de estas células fuera del organismo. Para subsanar estos problemas se está trabajando para: 1) lograr una adecuada disociación celular; 2) hallar un sustrato de cultivo adecuado; 3) conseguir un medio de cultivo idóneo; 4) encontrar un marcador específico de células tumorales cultivadas.

En nuestra experiencia en un total de 25 muestras procesadas se ha obtenido crecimiento de células tumorales en 20 de ellas. La morfología de las células fue predominantemente epitelial con crecimiento en placas y con tamaños nucleares variables.

REFERENCIAS

- Carrel A. On the permanent life of tissues outside the organism. *J Exp Med* 1912; 15: 515-528.
- Gabrielson EW, Harris CC. Use of cultured human tissues and cells in carcinogenesis research. *Cancer Res Clin Oncol* 1985; 110: 1-10.
- Harris CC. Human tissues and cells in carcinogenesis research. *Cancer Res* 1987; 47: 1-10.
- Abercrombie M. Contact inhibition in tissue culture. *In Vitro* 1970; 6: 128-142.
- Wolman SR, Smith MS, Stampfer M, Hackett AJ. Growth of diploid cells from breast cancers. *Cancer Genet Cytogenet* 1985; 16: 49-61.
- Cameron G, Chambers R. Neoplasm studies. III Organization of cells of human tumors in tissue culture. *Am J Cancer* 1937; 30: 115-129.
- Lasfargues EY, Ozzello L. Cultivation of human breast carcinomas. *JNCI* 1958; 21: 1131-1147.
- Easty GC, Easty DM, Monaghan P, Ormerod MG, Neville AM. Preparation and identification of human breast epithelial cells in culture. *Int J Cancer* 1980; 26: 577-584.
- Limon J, Dal Cin P, Sandberg AA. Application of long-term collagenase disaggregation for the cytogenetic analysis of human solid tumor. *Cancer Genet Cytogenet* 1986; 23: 305-313.
- Petersen OW, Van Deurs B. Preservation of defined phenotypic traits in short-term cultured human breast carcinoma derived epithelial cells. *Cancer Res* 1987; 47: 856-866.
- Briand P, Petersen OW, Van Deurs B. A new diploid non-tumorigenic human breast epithelial cell line isolated and propagated in chemically defined medium. *In Vitro* 1987; 23: 181-188.
- Besch GJ, Tanner MA, Howard SP, Wolberg WH, Gould MN. Systematic optimization of the clonal growth of human primary breast carcinoma cells. *Cancer Res* 1986; 46: 2306-2313.
- Stampfer MR, Hallows RC, Hackett AJ. Growth of normal human mammary cells in culture. *In Vitro* 1980; 26: 415-425.
- Biran S, Vlodavsky I, Fuks Z, Lijovetzky G, Horowitz T. Growth of human mammary carcinoma cells from biopsy specimens in serum-free medium on extracellular matrix. *Int J Cancer* 1986; 38: 345-354.
- Emerman JT, Fiedler EE, Tolcher AW, Rebbeck PM. Effects of defined medium, fetal bovine serum and human serum on growth and chemosensitivities of human breast cancer cells in primary culture: inference for «in vitro» assays. *In Vitro* 1987; 23: 134-140.
- Enami J, Enami S, Koga M. Growth of normal and neoplastic mouse mammary epithelial cells in primary culture: stimulation by conditioned medium from mouse mammary fibroblasts. *Gann* 1983; 74: 845-853.
- Hiratsuka M, Senoo T, Kimoto T, Namba M. An improved short-term culture method for human mammary epithelial cells. *Gann* 1982; 73: 124-128.
- Neville MC. Mammary cultures on floatin gels: A model system for mammary function. *NIPS* 1987; 2: 107-111.
- Salmon SE, Hamburger AW et al. Quantification of diffe-

- rential sensitivity of human tumor stem cells in anticancer agents. *N Engl J Med* 1978; 298: 1321-1327.
20. Von Hoff DD, Casper J et al. Association between human tumor colony-forming assay results and response of an individual patient's tumor to chemotherapy. *Am J Med* 1981; 70: 1027-1032.
 21. Manni A, Wright C et al. Promotion by prolactin of the growth of human breast neoplasm cultured «in vitro» in the soft agar clonogenic assay. *Cancer Res* 1986; 46: 1669-1672.
 22. Hug V, Rashid R, Johnston D, Hortobagyi G. Clonogenic growth and hormone sensitivity of benign and malignant breast tissues. *Br J Cancer* 1987; 56: 619-621.
 23. Von Hoff DD, Casper J et al. Direct cloning of human neuroblastoma cells in soft agar cultures. *Cancer Res* 1980; 40: 3591-3597.
 24. Sandbach J, Von Hoff DD et al. Direct cloning of human breast cancer in soft agar culture. *Cancer* 1982; 50: 1315-1321.
 25. Barnes D, Sato G. Growth of a human mammary tumor cell line in serum-free medium. *Nature (Lond)* 1979; 281: 389-399.
 26. Taylor-Papadimitriou J, Lane EB, Chang SE. Cell lineages and interaction in neoplastic expression in the human breast. In: MA Rich, JC Hager and P Furmanski (eds.), *Understanding Breast Cancer. Clinical and Laboratory Concepts*, págs. 215-246. New York: Marcel Dekker, Inc., 1983.
 27. Kirkland WL, Yang NS, Jorgensen T, Longley C, Furmanski P. Growth of normal and malignant human mammary epithelial cells in culture. *JNCI* 1979; 63: 29-41.
 28. Engel LW, Young NA. Human breast carcinoma cells in continuous culture: A review. *Cancer Res* 1978; 38: 4327-4339.
 29. American type Culture Collection. *Catalogue of cell lines and hybridomas*. Tigh Edition 1985.
 30. Namoto C, Suemasu K et al. Establishment and characterization of a cell line (Br-NHF-1) derived from human mammary carcinoma. *GANN* 1981; 72: 783-789.
 31. Olszewski W, Darzynkiewick Z, Rosen PP, Schwartz MK, Melamed MR. Flow cytometry of breast carcinoma. I. Relation of DNA ploidy level to histology and estrogen receptor. *Cancer* 1981; 48: 980-984.
 32. López-Ginés C, Gil R, Gregori-Romero M. Citogenética de los carcinomas de mama. Problemática y perspectivas. *Revista de la Asociación Española de Senología y Patología Mamaria*.