

BLOQUEO DEL RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO SEMEJANTE A LA INSULINA TIPO I UTILIZANDO OLIGODEOXINUCLEOTIDOS ANTISENTIDO EN CANCER DE MAMA EXPERIMENTAL*

MARIANA SALATINO, ROXANA SCHILLACI, CECILIA J. PROIETTI, ROMINA CARNEVALE, EDUARDO H. CHARREAU, PATRICIA V. ELIZALDE

Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME-CONICET), Buenos Aires, Argentina.

Resumen Evaluamos el efecto del bloqueo de la expresión del receptor del factor de crecimiento semejante a la insulina tipo I (IGF-IR) sobre el crecimiento *in vivo* de cáncer de mama empleando una estrategia "antisentido". Utilizamos el adenocarcinoma mamario murino progéstágeno-dependiente C4HD. La administración intratumoral o sistémica de oligodeoxinucleótidos antisentido fosforilados al ARNm del IGF-IR (AS[S]ODN) inhibió el crecimiento tumoral. El efecto antitumoral fue específico debido a su dosis-dependencia y a la falta de efecto en ratones tratados con el S[S]ODN "sentido". Los tumores obtenidos de ratones tratados con AS[S]ODN mostraron: disminución en la expresión de IGF-IR y en la fosforilación del sustrato del receptor de insulina-1, inhibición de la activación de PI-3K/Akt, p42/p44MAPK y ErbB-2, mientras que la expresión y activación del receptor de progesterona no se afectó. Es la primera demostración que el crecimiento de cáncer de mama puede ser inhibido por la administración *in vivo* de AS[S]ODN al IGF-IR.

Palabras clave: estrategias antisentido, IGF-IR, cáncer de mama

Abstract *Type I insulin-like growth factor receptor antisense strategies in experimental breast cancer.*

We addressed the effect of targeting type I insulin-like growth factor receptor (IGF-IR), with antisense strategies in *in vivo* growth of breast cancer cells. We used C4HD tumors from an experimental model of hormonal carcinogenesis in which medroxyprogesterone acetate induced mammary adenocarcinomas in Balb/c mice. Intratumor or systemic administration of phosphorothiolated antisense oligodeoxynucleotides (AS[S]ODN) to IGF-IR mRNA resulted in a significant inhibition of C4HD tumor growth. The antitumor effect was specific since inhibition of tumor growth was dose-dependent and no effect was observed in mice treated with sense S[S]ODN. Tumors from AS[S]ODN-treated mice showed a decrease in IGF-IR expression and in insulin receptor substrate-1 tyrosine phosphorylation. Activation of PI-3K/Akt, p42/p44 MAPK and ErbB-2 was abolished in tumors treated with AS[S]ODN. Progesterone receptor expression or activity remained invariable. This is the first demonstration that breast cancer growth can be inhibited by direct *in vivo* administration of IGF-IR AS[S]ODN.

Key words: antisense strategies, IGF-IR, breast cancer

El receptor del factor de crecimiento semejante a insulina (IGF-IR) juega un rol central en la regulación del crecimiento celular. Al activarse por unión al IGF-I, tiene función mitogénica en varios tipos celulares y protege a las células de una variedad de señales apoptóticas. También induce diferenciación en ciertos tipos de células y tiene un rol crucial en el establecimiento y mantenimien-

to del fenotipo transformado¹. Un gran número de evidencias indican que el IGF-IR es fundamental en el desarrollo del cáncer de mama y que está involucrado en un complejo *cross-talk* con las hormonas esteroideas, las cuales regulan el crecimiento del tumor mamario².

En nuestro laboratorio hemos demostrado que el IGF-IR juega un rol central en la proliferación del tumor C4HD perteneciente al modelo experimental de carcinogénesis hormonal en el cual el progéstágeno sintético acetato de medroxiprogesterona (MPA) induce adenocarcinomas de mama en ratones hembras BALB/c^{3,4}. El tumor C4HD es de origen ductal, requiere administración de MPA para proliferar tanto *in vivo* como *in vitro* y expresa altos niveles de receptores de estrógenos y progesterona (RP)⁵, niveles normales de IGF-IR y sintetiza IGF-I⁴. Demostramos que el bloqueo de la expresión de IGF-IR utilizando oligodeoxinucleótidos antisentido (ASODN) al ARNm del

* Este trabajo mereció el Premio Esteban Montuori para oncología durante la reunión anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC) en Mar del Plata, noviembre 2003.

IGF-IR inhibió la proliferación inducida por MPA de cultivos primarios del tumor C4HD^{3,6}, indicando que el *loop* autocrino IGF-I/IGF-IR participa en la proliferación inducida por MPA. Por otro lado, nuestros estudios de expresión y función de los receptores tirosina quinasa tipo I: RTKs (EGF-R/ErbB-1, ErbB-2, ErbB-3 y ErbB-4) y su ligando, heregulina (HRG), demostraron la existencia de un *cross-talk* bi-direccional entre las vías de señalización de progestágenos y HRG/ErbBs que controlan la proliferación de células C4HD^{3,6}. Demostramos también la existencia de una interacción entre las vías de IGF-IR y HRG/ErbBs, particularmente una interacción jerárquica entre IGF-IR y ErbB-2 mediante la cual el IGF-IR dirige la fosforilación del ErbB-2³. En este contexto, nuestros hallazgos identifican consistentemente al IGF-IR como una pieza central en la proliferación de células C4HD dirigida por tres vías diferentes: el RP, HRG/ErbBs y el propio *loop* autocrino IGF-I/IGF-IR. Según estos antecedentes el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto del bloqueo de la expresión del IGF-IR sobre el crecimiento *in vivo* del tumor mamario murino C4HD utilizando ASODN fosfotiolados al ARNm del IGF-IR (AS[S]ODN). Para ello, se inocularon subcutáneamente ratones hembras BALB/c con un fragmento de tumor C4HD, y con un *pellet* de MPA en el flanco opuesto. Cuando los tumores alcanzaron un volumen medio de 15 mm³ se inició el tratamiento con los [S]ODNs empleando dos estrategias distintas. Primero, evaluamos el efecto de la inyección directa intratumoral de 100 µg/día/ratón del AS[S]ODN o del [S]ODN sentido (S[S]ODN) durante 14 días. Como control adicional un grupo de ratones fue inyectado con 100 µl del vehículo (PBS). Al día 15 el tratamiento intratumoral con el AS[S]ODN inhibió un 62.3% y un 66.3% el crecimiento tumoral con respecto a los controles (S[S]ODN y PBS respectivamente, (Figura 1A). Segundo, evaluamos el efecto de la administración sistémica del AS[S]ODN, ya que esta vía de administración está siendo actualmente utilizada en ensayos clínicos⁷. Los ratones fueron inyectados en el seno venoso retroorbital con 1 mg/día/ratón del AS[S]ODN, del S[S]ODN o 100 µl del vehículo (PBS) durante 14 días. Al día 15 el tratamiento sistémico con el AS[S]ODN inhibió un 62.0% y un 66.0% el crecimiento tumoral con respecto a los controles (S[S]ODN y PBS respectivamente, (Figura 1B). El tratamiento endovenoso con dosis más bajas del AS[S]ODN (0.25-0.5 mg/día/ratón) resultó en una inhibición, si bien significativa, menor a la obtenida con la dosis de 1 mg diario con lo cual se comprobó la dosis-dependencia del efecto inhibitorio (datos no mostrados). Las diferencias en el crecimiento tumoral entre los ratones tratados con AS[S]ODN y los grupos controles fueron aún significativas a lo largo de la semana postratamiento en todos los protocolos realizados (Figura 1A y B, día 15-21). La inhibición incompleta, aunque muy significativa, del crecimiento tumoral obtenida en los

tratamientos *in vivo*, intratumoral o sistémico, con el AS[S]ODN al IGF-IR nos permitió contar con muestras de tumor. Por lo tanto, nuestro modelo proporcionó una herramienta única para estudiar las vías de señalización afectadas por el bloqueo de la expresión de IGF-IR. Para establecer que el efecto antitumoral *in vivo* se debió a un efecto antisentido específico, se evaluó la expresión del IGF-IR en extractos proteicos de tumores extraídos de ratones tratados con el AS[S]ODN y de ratones controles (S[S]ODN o PBS) en el día 15. Los resultados presentados a continuación corresponden al tratamiento sistémico con 1 mg/día/ratón de [S]ODN y fueron similares a los obtenidos con el tratamiento sistémico a menor dosis o con el intratumoral. Los análisis de *Western blotting* (WB) demostraron una significativa disminución (65-90%) en la expresión de las cadenas α y β del IGF-IR en tumores de ratones tratados con el AS[S]ODN con respecto a los controles (Figura 2A). Un paso crucial en la vía activada por IGF-IR es la fosforilación del sustrato del receptor de insulina (IRS-1) y la activación de la vía de fosfatidilinositol 3-quinasa (PI-3K)/Akt^{8,9}. Por lo tanto se inmunoprecipitó el IRS-1 y se evaluó su estado de fosforilación. Los tumores de ratones tratados con el AS[S]ODN mostraron una disminución significativa en el grado de fosforilación en tirosina de IRS-1 con respecto a los tumores de los grupos controles (Figura 2B). Para evaluar el estado de activación de PI-3K/Akt realizamos ensayos de WB utilizando anticuerpos anti-fosfo-Akt treonina 308 y anti-fosfo-Akt serina 473 como marcadores de activación. Se detectó una significativa disminución en la fosforilación de ambos residuos en tumores de ratones tratados con AS[S]ODN con respecto a los tumores de los grupos controles (Figura 2C). Para verificar si se mantiene *in vivo* la interacción jerárquica entre el IGF-IR y el ErbB-2 descrita *in vitro* por nuestro laboratorio³, estudiamos en los tumores obtenidos el estado de activación ErbB-2 y de ErbB-3, receptor con el cual heterodimeriza preferencialmente el ErbB-2 en nuestro modelo¹⁰. Para ello se inmunoprecipitó al ErbB-2 y al ErbB-3 y se evaluó su grado de fosforilación como marcador de activación. Como habíamos informado anteriormente en tumores C4HD que crecieron en ratones tratados con MPA^{3,6}, detectamos una fuerte fosforilación tanto de ErbB-2 como de ErbB-3 en los grupos controles, mientras que en tumores de ratones tratados con el AS[S]ODN el grado de fosforilación de dichos receptores disminuyó significativamente (Figura 2D). Los niveles de expresión de ErbB-2 y ErbB-3 no se vieron afectados por el tratamiento *in vivo* con el AS[S]ODN (Figura 2D, panel inferior). Más aun, el tratamiento de los tumores con el AS[S]ODN disminuyó la formación del heterodímero funcional ErbB-2/ErbB-3 medida por ensayos de coimmunoprecipitación (Figura 2E). Luego ensayamos el efecto del AS[S]ODN al IGF-IR sobre el estado de activación de la vía de las MAPK/Erks por varias

razones. Primero, porque es sabido que el IGF-IR activa dicha vía⁹. Segundo, porque en nuestro modelo el estímulo proliferativo es el MPA actuando a través del RP y porque múltiples evidencias, incluyendo las propias¹⁰, sugieren que las MAPK inducen fosforilación del RP modulando su función¹¹. Finalmente porque en cáncer de mama suelen detectarse niveles elevados de actividad de MAPK los cuales han sido asociados con la pérdida de respuesta hormonal y el desarrollo de metástasis¹². Como se puede observar todos los tumores expresaron niveles similares de p42/p44 MAPKs (Figura 2F, panel inferior), mientras que el nivel de activación de las mismas, medido con anticuerpos específicos para la forma

fosforilada, disminuyó significativamente en los tumores tratados con el AS[S]ODN respecto a los controles (Figura 2F). Recientes hallazgos han demostrado la presencia de una interacción bidireccional entre las vías de factores de crecimiento y hormonas esteroideas^{3, 6, 10}. Sin embargo, pocas evidencias han sido publicadas con respecto a la interacción del RP y el IGF-IR¹³. Por lo tanto, investigamos si el bloqueo de expresión del IGF-IR podía afectar la expresión y/o la activación del RP. Se detectaron niveles similares de expresión de RP en tumores de ratones tratados con el AS[S]ODN con respecto a los grupos controles (Figura 2G, panel superior). En cuanto a su activación, recientes evidencias indican que

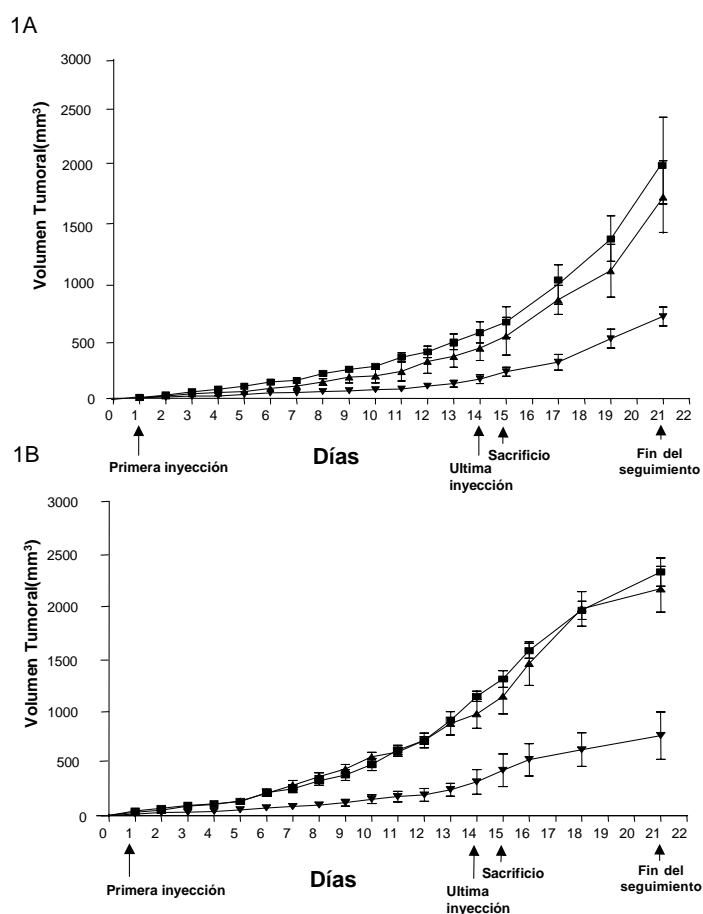


Fig. 1.- Efecto de la administración intratumoral o sistémica de AS[S]ODNs al IGF-IR sobre el crecimiento *in vivo* del adenocarcinoma mamario C4HD. Se inocularon subcutáneamente ratones hembras BALB/c con un fragmento de tumor C4HD, y con un *pellet* de MPA en el flanco opuesto. Cuando los tumores alcanzaron un volumen medio de 15 mm³ se comenzó el tratamiento. **A)** Administración intratumoral. Los ratones fueron inyectados directamente en el tumor con 100 µg/día/ratón de AS[S]ODN (▼) (n=10), 100 µg/día/ratón de S[S]ODN (▲) (n=10), o 100 µl de PBS (■) (n=10) durante 14 días. **B)** Administración sistémica. Los ratones fueron inyectados en el seno venoso retroorbital con 1mg/día/ratón de AS[S]ODN (▼) (n=10), 1 mg/día/ratón de S[S]ODN (▲) (n=10) o PBS (■) (n=10) durante 14 días. El largo (L) y ancho (A) del tumor se midió diariamente (en mm) y se calculó el volumen tumoral mediante la siguiente fórmula $(L \times A^2)/2$. Al día 15 la mitad de los animales fueron sacrificados y se extirparon los tumores. Cada punto representa la media del volumen \pm ES de 10 tumores independientes durante los primeros 15 días y de 5 tumores durante los días 16-21.

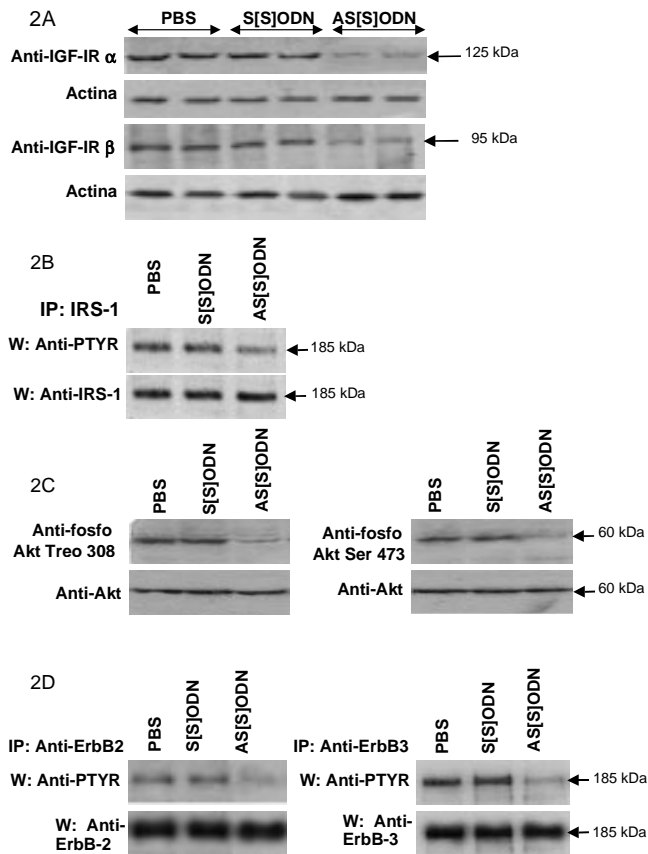


Fig. 2.– Mecanismos moleculares involucrados en el efecto antitumoral del AS[Si]ODN al IGF-IR. Al día 15 la mitad de los animales de los grupos tratados en forma sistémica con AS[Si]ODN, si[Si]ODN o PBS (ver leyenda de la Figura 1) fueron sacrificados y se obtuvieron extractos proteicos de los tumores C4HD extirpados los cuales se analizaron por *Western blotting* (WB). **A)** Efecto del tratamiento con AS[Si]ODNs sobre la expresión de IGF-IR. Se realizó una electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) con 100 μ g del extracto proteico y luego un inmunoblot con anticuerpos anti-cadena α del IGF-IR y anti-cadena β del IGF-IR. Se muestran dos tumores representativos de cada tratamiento. En los paneles inferiores se muestra la expresión de actina como control de carga para cada *Western blot*. **B)** Efecto del tratamiento con AS[Si]ODNs sobre la fosforilación de IRS-1. Se inmunoprecipitó IRS-1 a partir de 500 μ g de extracto proteico. El inmunocomplejo fue sometido a un SDS-PAGE y analizado por WB con un anticuerpo anti-fosfo TYR (panel superior). Idénticas alícuotas de cada inmunoprecipitado fueron sometidas a un análisis por *immunoblot* con un anticuerpo anti-IRS-1 para verificar que la misma cantidad de IRS-1 fue inmunoprecipitada (panel inferior). Se muestra un tumor representativo de cada tratamiento. **C)** Efecto del tratamiento con AS[Si]ODNs sobre la fosforilación de Akt. Se realizó un SDS-PAGE con 100 μ g del extracto proteico y luego un *immunoblot* con anticuerpos anti-fosfo-Akt treonina 308 (panel superior izquierdo) y anti-fosfo-Akt serina 473 (panel superior derecho). Las membranas fueron luego hibridizadas con un anticuerpo anti-Akt total (paneles inferiores). Se muestra un tumor representativo de cada tratamiento. **D)** Efecto del tratamiento con AS[Si]ODNs sobre la activación de ErbB-2 y ErbB-3. Se inmunoprecipitaron ErbB-2 (panel izquierdo) y ErbB-3 (panel derecho) a partir de 500 μ g de extracto proteico. Los inmunocomplejos fueron sometidos a un SDS-PAGE y analizados por WB con un anticuerpo anti-fosfo TYR (paneles superiores). Las membranas fueron luego hibridizadas con anticuerpos anti-ErbB-2 (panel inferior izquierdo) o anti-ErbB-3 (panel inferior derecho). Se muestra un tumor representativo de cada tratamiento.

la fosforilación del RP en el residuo serina 294 (Ser294) se correlaciona con su actividad transcripcional¹¹. Por lo tanto, el siguiente paso fue evaluar el estado de fosforilación del RP en Ser294 para determinar si el bloqueo

de la expresión del IGF-IR estaba afectando la activación del RP. La fosforilación del RP determinada con un anticuerpo específico para la forma fosforilada del Ser294 no fue afectada por el tratamiento de los tumores con el

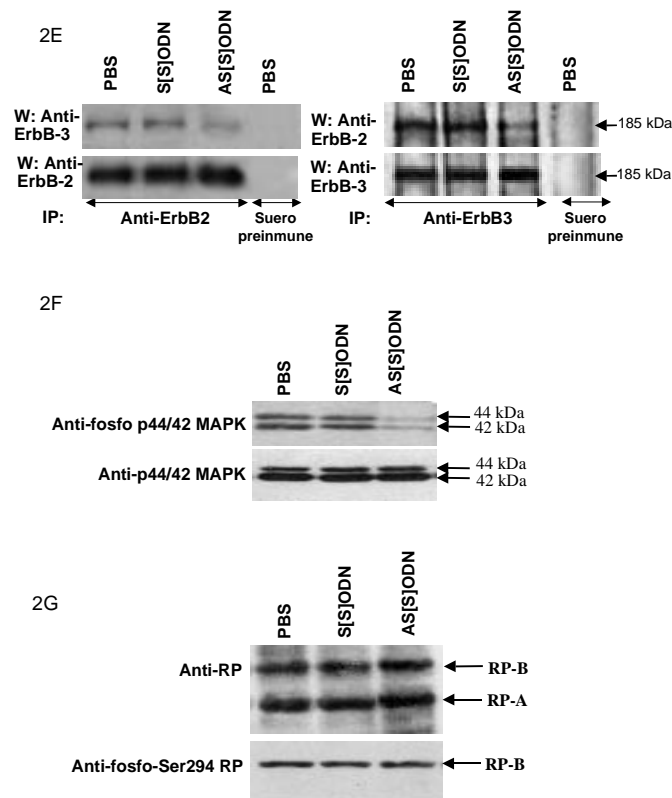


Fig. 2.– E) Efecto del tratamiento con AS[S]ODNs sobre la heterodimerización de ErbB-2 y ErbB-3. Se inmunoprecipitaron ErbB-2 (panel izquierdo) y ErbB-3 (panel derecho) a partir de 500 μ g de extracto proteico. Los inmunocomplejos fueron sometidos a SDS-PAGE y analizados por WB con un anticuerpo anti-ErbB-3 (panel superior izquierdo) y anti-ErbB-2 (panel superior derecho). Las membranas fueron luego hibridizadas con anticuerpos anti-ErbB-2 (panel inferior izquierdo) o anti-ErbB-3 (panel inferior derecho). Como controles 500 μ g de extractos proteicos de tumores creciendo en ratones tratados con PBS fueron inmunoprecipitados con suero de ratón preinmune. Se muestra un tumor representativo de cada tratamiento. **F)** Efecto del tratamiento con AS[S]ODNs sobre la activación de MAPK. Se realizó un SDS-PAGE con 100 μ g del extracto proteico y luego un inmunoblot con un anticuerpo anti-fosfo-p42/p44 MAPK (panel superior). Las membranas fueron luego hibridizadas con un anticuerpo anti-p42/p44 MAPK total (panel inferior). Se muestra un tumor representativo de cada tratamiento. **G)** Efecto del tratamiento con AS[S]ODNs sobre la expresión de RP y la fosforilación del residuo Ser294. Se realizó un SDS-PAGE con 100 μ g del extracto proteico y luego un inmunoblot con un anticuerpo anti-fosfo-Ser294 RP (panel inferior). Las membranas fueron luego hibridizadas con un anticuerpo anti-PR (panel superior). Se muestra un tumor representativo de cada tratamiento. En todos los casos se muestra un experimento representativo de tres realizados. W: Western blot, IP: Inmunoprecipitación.

AS[S]ODN, siendo ésta igual de intensa que en los controles (Figura 2G, panel inferior). Estos resultados indican que el bloqueo de la expresión del IGF-IR no interfiere con la vía del RP en los tumores C4HD. Esto resulta particularmente interesante ya que indica que el tumor tratado con AS[S]ODN exhibe altos niveles de fosforilación de RP en Ser294 a pesar de que las MAPK están menos activas que en los controles. Dado que el bloqueo de la expresión del IGF-IR procede en presencia de MPA, estos resultados sugieren que la fosforilación

del RP en Ser294 inducida por MPA ocurriría, en este caso, por una vía independiente de las MAPKs.

En el presente trabajo demostramos por primera vez que el crecimiento *in vivo* de un tumor mamario murino puede ser inhibido bloqueando la expresión de IGF-IR utilizando un AS[S]ODN administrado en forma intratumoral o sistémica. Un hallazgo particularmente interesante consistió en demostrar *in vivo* lo demostrado previamente *in vitro*: la existencia de una interacción jerárquica entre IGF-IR y el ErbB-2 mediante la cual el IGF-IR

dirige la activación del ErbB-2³. Estos resultados, en los que se demuestra que el bloqueo *in vivo* del IGF-IR en el cáncer de mama resulta en la inactivación del ErbB-2, tienen implicancias terapéuticas, ya que utilizando al IGF-IR como blanco en el cáncer de mama se podría también inhibir la actividad de ErbB-2, aun en células que sobreexpresan ErbB-2 como las C4HD. Más aún, pudimos diseccionar una red de interacciones entre las vías de señalización de IGF-IR, los RTKs tipo I y el RP que fueron afectadas diferencialmente por el bloqueo de la función del IGF-IR. Por lo tanto, nuestro modelo nos proporcionó una herramienta única para explorar las bases moleculares de la contribución del IGF-IR al desarrollo del cáncer de mama.

El hecho de haber logrado una significativa aunque incompleta inhibición del crecimiento tumoral bloqueando la expresión del IGF-IR suma apoyo a las numerosas evidencias indicando que se debe apuntar a más de un blanco terapéutico para lograr el bloqueo completo de las múltiples vías de señalización utilizadas por el cáncer de mama para proliferar. Nuestro hallazgo de que la función del RP no fue afectada por el bloqueo del IGF-IR, remarca la importancia de que un mejor entendimiento de la red de vías involucradas en el desarrollo del cáncer de mama sea necesariamente desarrollado para el diseño de nuevas estrategias terapéuticas.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido realizado con el subsidio otorgado por Lilly Centre for Women's Health, Eli Lilly and Company y por el Centro Argentino Brasileiro de Biotecnología (CABBIO), ambos otorgados a P.V. Elizalde, y con el subsidio BID 802/OC-AR PICT 0503402 de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Técnica Argentina. Quisiéramos agradecer también a N. Lope por su asistencia en el trabajo con animales y a C. Lanari por proveer el modelo experimental de carcinogénesis hormonal inducida por MPA. También quisiéramos agradecer a Laboratorios Gador por proveer el acetato de medroxiprogesterona.

Bibliografía

1. Werner H, Le Roith D. New concepts in regulation and function of the insulin-like growth factors: implications for understanding normal growth and neoplasia. *Cell Mol Life Sci* 2000; 57: 932-42.
2. Surmacz E, Guvakova MA, Nolan MK, Nicosia RF, Sciacca L. Type I insulin-like growth factor receptor function in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1998; 47: 255-67.
3. Balana ME, Labriola L, Salatino M, et al. Activation of ErbB-2 via a hierarchical interaction between ErbB-2 and type I insulin-like growth factor receptor in mammary tumor cells. *Oncogene* 2001; 20: 34-47.
4. Elizalde PV, Lanari C, Molinolo AA, et al. Involvement of insulin-like growth factors-I and -II and their receptors in medroxyprogesterone acetate-induced growth of mouse mammary adenocarcinomas. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1998; 67: 305-17.
5. Lanari C, Kordon E, Molinolo A, Pasqualini CD, Charreau EH. Mammary adenocarcinomas induced by medroxyprogesterone acetate: hormone dependence and EGF receptors of BALB/c *in vivo* sublines. *Int J Cancer* 1989; 43: 845-50.
6. Balana ME, Lupu R, Labriola L, Charreau EH, Elizalde PV. Interactions between progestins and heregulin (HRG) signaling pathways: HRG acts as mediator of progestins proliferative effects in mouse mammary adenocarcinomas. *Oncogene* 1999; 18: 6370-9.
7. Tamm I, Dorken B, Hartmann G. Antisense therapy in oncology: new hope for an old idea? *Lancet* 2001; 358: 489-97.
8. Backer JM, Myers MG Jr, Sun XJ, et al. Association of IRS-1 with the insulin receptor and the phosphatidylinositol 3'-kinase. Formation of binary and ternary signaling complexes in intact cells. *J Biol Chem* 1993; 268: 8204-12.
9. Scrimgeour AG, Blakesley VA, Stannard BS, LeRoith D. Mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase pathways are not sufficient for insulin-like growth factor I-induced mitogenesis and tumorigenesis. *Endo-crinology* 1997; 138: 2552-8.
10. Labriola L, Salatino M, Proietti CJ, et al. Heregulin induces transcriptional activation of the progesterone receptor by a mechanism that requires functional ErbB-2 and mitogen-activated protein kinase activation in breast cancer cells. *Mol Cell Biol* 2003; 23: 1095-111.
11. Shen T, Horwitz KB, Lange CA. Transcriptional hyperactivity of human progesterone receptors is coupled to their ligand-dependent down-regulation by mitogen-activated protein kinase-dependent phosphorylation of serine 294. *Mol Cell Biol* 2001; 21:6122-31.
12. Adeyinka A, Nui Y, Cherlet T, Snell L, Watson PH, Murphy LC. Activated mitogen-activated protein kinase expression during human breast tumorigenesis and breast cancer progression. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 1747-53.
13. Katzenellenbogen BS, Norman MJ. Multihormonal regulation of the progesterone receptor in MCF-7 human breast cancer cells: interrelationships among insulin/insulin-like growth factor-I, serum, and estrogen. *Endocrinology* 1990; 126: 891-8.

Pensar es un riesgo, pero corriendo riesgos las ideas circulan.

Germán Arciniegas (1900-1999)

Bolívar y la revolución, 1984