

**AVANCES DE LA
INVESTIGACION ONCOLOGICA
ESPAÑOLA**

Madrid, abril 1992

Farmaindustria

Serie Científica
Madrid, 1993

31. ACTIVIDAD AROMATASICA Y ESTRADIOL EN EL CANCER MAMARIO HUMANO. RELACION CON LOS RECEPTORES DE ESTRADIOL Y DE FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDERMICO

P. BOLUFER¹, E. RICART¹, A. LLUCH², C. VAZQUEZ³, J. GARCIA-CONDE²,
P. ANTONIO¹, V. GUILLEM³.

¹Departamento de Biopatología Clínica. Hospital La Fé. Valencia. ²Departamento de Oncología Médica. Hospital Clínico Universitario. Facultad de Medicina. Universidad de Valencia. ³Instituto Valenciano de Oncología. Valencia.

Palabras clave:

Actividad aromatásica, estradiol tumoral, receptor de estradiol, receptor de factor de crecimiento epidérmico, cáncer de mama humano.

Título abreviado:

Actividad aromatásica y estradiol en el cáncer mamario humano.

Resumen

Con el propósito de clarificar el posible significado de la actividad aromatásica (AR) en el cáncer mamario se estudia su relación con el E₂ intratumoral, receptores de estradiol (RE) y de factor de crecimiento epidérmico (RFCE) así como con el TNM, histopatología e indiferenciación en 225 carcinomas mamario: 67 de premenopáusicas y 158 de postmenopáusicas. También se evalúa el poder inhibitorio de la

aminoglutetimida (AG) en un grupo de 22 cánceres mamarios AR+. En cada muestra se cuantifica la AR, RE, RFCE y E_2 intratumoral. La AR se cuantifica siguiendo el método de Thompson y Siiterii; el RFCE siguiendo el procedimiento de saturación de doble punto que emplea FCE- I^{125} como ligando; los RE con el procedimiento multipunto de Scatchard empleando estradiol- 3H como ligando y, el E_2 intratumoral con un procedimiento de RIA. Se encuentra AR en el 64% de los cánceres estudiados. Existe una fuerte asociación de la presencia de AR con el tamaño tumoral en pacientes postmenopáusicas ($P=0.001$) y de la cuantía de AR con el tamaño tumoral de las premenopáusicas ($P < 0.01$). En el grupo de postmenopáusicas la presencia tumores AR+ está significativamente más elevada en los tumores RE+ que en los RE- ($P < 0.001$). Los tumores RE+ tienen una concentración de E_2 significativamente más elevada que los tumores RE- ($P < 0.0001$), al igual como los tumores AR+ respecto a los AR- ($P < 0.001$), al igual como los tumores AR+ respecto de los AR- ($P < 0.0001$). El empleo de AG 12 μM in vitro produce una inhibición promedio del 48% en los 22 cánceres estudiados. Existe una correlación lineal múltiple de tipo logarítmico de los niveles de AR, RE y RFCE con el log de la concentración intratumoral de E_2 ($P < 0.0001$) con coeficientes de correlación parcial positivos para la AR y RE. Los resultados obtenidos sugieren la importancia de la AR tumoral para explicar la concentración tumoral de E_2 , reforzando el posible significado biológico de la AR tumoral.

Introducción

El tejido mamario normal (1, 2) y el de algunos cánceres mamarios (1, 3, 4, 5), gracias a su capacidad aromatizante, son capaces de transformar los andrógenos suprarrenales androstendiona (A) y testosterona (T) en estrógenos, los que a su vez promueven el desarrollo en los cánceres hormono-dependientes (1, 2).

Se ha encontrado actividad aromatásica (AR) en un 60-70% de los cánceres mamarios (1, 3, 4, 5), siendo mayor en el tejido tumoral que en la glándula mamaria normal (4) o en la grasa mamaria (6). Sin embargo, poco se sabe acerca del significado de la AR en los cánceres mamarios. En algún estudio se ha relacionado la presencia de AR con la respuesta a la terapéutica

a la aninoglutetimida (AG) (7), mientras que en otros estudios se ha relacionado con la presencia de receptores de estradiol (RE) (8). No obstante, la mayoría de las investigaciones efectuadas han sido incapaces de probar relación alguna de la AR con los RE, receptores de progesterona (PR) (1, 3, 4, 5, 9) o con el TNM tumoral (3, 5).

Tampoco se ha esclarecido completamente el origen del E_2 tumoral. Se ha sugerido que la sulfatasa mamaria pudiera tener un papel más relevante que la AR en la formación de E_1 a través de la conversión del sulfato de E_1 en E_1 (10), que, a su vez, se transformaría en E_2 por la acción de la enzima 17β -hidroxiesteroidehidrogenasa. Sin embargo, algunos estudios recientes llevados a cabo *in vivo* sostienen la importancia de la AR tumoral en la síntesis de estrógenos (7). Se ha encontrado una mayor concentración de E_2 en los cánceres mamarios que en el tejido mamario normal o en el plasma (4, 11); no obstante, sólo en un estudio se encuentra una relación del E_2 con la presencia de RE (4).

La introducción de los fármacos inhibidores de la aromatasas en el tratamiento del cáncer mamario hace más necesaria la clarificación del significado de la AR y E_2 intratumorales. Estas son las razones que motivan que en el presente estudio se cuantifique la AR y el E_2 en 225 cánceres de mama con el objeto de analizar las posibles relaciones de la AR con E_2 , RE, receptor para el factor de crecimiento epidérmico (RFCE), histopatología y TNM tumoral. También se analiza la capacidad inhibidora *in vitro* de diferentes inhibidores de la AR en preparados de placenta, así como la AG en un grupo de cánceres mamarios.

Material y métodos

Pacientes y muestras

Se estudia un total de 225 cánceres mamarios: 67 de mujeres premenopáusicas con mediana edad de 40 años, y 158 postmenopáusicas con mediana edad de 62 años.

Las muestras tumorales se almacenan en N_2 líquido hasta el momento de

la determinación. En cada una de ellas se determinan: AR, E, RE citosólicos (REc) y nucleares (REn), y RFCE. En 140 tumores se ha valorado el grado de indiferenciación histológica de acuerdo con el índice de Bloom-Richardson(12) (IBR) habiendo catalogado los tumores en tres grandes grupos: Grado I que incluye las puntuaciones 3-5; grado II, puntuaciones 6-7; grado III, para las puntuaciones 8-9.

El tipo histopatológica más abundante son los carcinomas ductales con un total de 188, 27 carcinomas son de tipo lobulillar, repartiéndose el resto de los tumores entre los tipos inflamatorio, medular y mucinoso.

El TNM y resultados cualitativos de los parámetros estudiados se recogen en la Tabla 1.

Tabla 1.
Características de los cánceres mamarios estudiados

PARAMETRO	PREMENO	POSTMENO	TOTAL
IBR I	14	31	45
II	18	51	69
III	6	20	26
T 1	13	16	29
2	34	77	111
3	11	21	32
4	9	44	53
N 0	29	55	84
+	38	103	141
M 0	62	147	209
1	5	11	16
AR-	32	48	80
AR+	35	110	145
RE-	49	80	129
RE+	18	78	96
RFCE-	49	118	167
RFCE+	18	40	58
TOTAL	67	158	225

Inhibidores de la aromatasa

Se ha ensayado la capacidad para inhibir la AR placentaria del CGS16949A (13), AG, 4-hidroxiandrostendiona y DHT. Tambien se ha evaluado la capacidad inhibitoria de la AG en 22 cánceres mamarios AR+.

Método para cuantificación de la AR

Se ha seguido el método de Thompson y Siiterii's (14) que consiste en la cuantificación radiométrica del $^3\text{H}_2\text{O}$ formada en el proceso de aromatización de la, $1\beta^3\text{H-A}$ en E_2 .

Se toman entre 250 a 300 mg de tejido que tras ultracongelarse en N_2 se pulveriza en el Mikro-Dismembrator (Braun). El tejido se resuspende a razón de 0.5 ml del tampón de ensayo (fosfato 0.066 M, nicotinamida 9.8 mM, Cl_2Mg 10.56mM, EDTA 1.12mM, N_3Na 15.38mM y Triton-x-100 1/1000, di-tiotreitol 0.125 mM, pH 7.3) por cada 200 mg de tejido, dejando en agitación durante 1 h a 4°C para procurar una buena resuspensión. Se separan dos alícuotas del homogenizado, una de 100 μl para la cuantificación de proteínas totales (PT), y otra de 400 μl para cuantificación de E_2 , almacenandose ambas a -20°C .

La determinación de la AR consiste en la incubación durante 1 h a 37°C de 200 μl del homogeneizado del tejido con 1 μCi de $1\beta^3\text{H-A}$, 0.69 μM de A no marcada y 0.64 nM de NADPH. El $^3\text{H}_2\text{O}$ formada se purifica adsorbiendo los esteroides con carbón dextrano, seguida de una cromatografía en columna mixta de carbón activo-sefadex. Una muestra se considera AR positiva (AR+) cuando la radioactividad del $^3\text{H}_2\text{O}$ supere al doble del conteaje del blanco de reactivos. Los resultados finales se expresan en $\text{fmol E}_2/\text{mg PT/h}$.

Cuantificación del E_2 tumoral

Se efectúa siguiendo un procedimiento de RIA (^{125}I -Estradiol direct Radioimmunoassay Kit, Baxter Dade AG) a partir de los extractos etéreos de 200 μl de homogenizado. Los resultados finales se expresan en $\text{pmol E}_2/\text{mg PT}$.

Ensayo de RFCE y RE

La cuantificación de RE y RFCE se efectúa sobre el mismo homogenizado. Se requiere un mínimo de 150 mg de tejido que se homogeniza en tampón HEPES-EDTA-ditiotreitól (HEPES 20 mM, EDTA 1.5 mM, ditiotreitól 0.125 mM, pH=7.4). Del homogenizado así obtenido se separan por centrifugación, el pellet nuclear para la determinación de RE (REn), las membranas para la cuantificación de RFCE y, el citosol para cuantificar RE (REc).

La cuantificación de los RFCE es un ensayo de saturación de dos puntos que emplea como ligando el FCE-I¹²⁵ y el FCE como competidor (15). En todos los ensayos se emplea una homogenizado de placenta como control positivo. Los resultados finales se expresan como fmol FCE-I¹²⁵ unido/mg de PT de membrana. Un tejido se considera RFCE positivo (RFCE+) cuando la concentración de RFCE supere los 0.5 fmol/ml homogenizado con un unido inespecífico inferior al 70%.

Los REc y REn se cuantifican siguiendo el método de Leake (16) que es un procedimiento multiplunto que emplea E₂-³H como ligando y dietilestibestrol como competidor. Los resultados finales se expresan fmol REn/mg PT para la fracción citosólica y en fmol REn/mg ADN para la nuclear. Un tumor se considera RE positivo (RE+) cuando se detectan RE tanto en la fracción citosólica como en la nuclear, considerandose negativo (RE-) en caso contrario.

Tratamiento estadístico

Las comparaciones múltiples se han corregido teniendo en cuenta el número de repeticiones del mismo estadístico, lo que arroja como límites de significación estadística valores de P de 0.01 para 6 comparaciones y de 0.005 para 12.

Se ha empleado el test no paramétrico de Kruskal-Wallis (KW) en el contraste de parámetros cuantitativos y, el X² para contraste de parámetros cualitativos.

Se ha empleado el análisis de regresión lineal múltiple para evaluar la importancia selectiva de las variables cuantitativas AR, RE y RFCE junto con el TNM tumoral para explicar las cifras de E_i intratumoral (17).

Resultados

Cinética de la AR

Los incrementos en la concentración de A desde 0.1 a 0.3 μM se traducen en un aumento exponencial en la velocidad de la AR placenaria que alcanza un plateau a partir de los 0.5 μM de A (Fig. 1A). La K_m obtenida a partir de la representación de la línea de Lineweaver-Burk es de 0.033 $\mu\text{M/L}$.

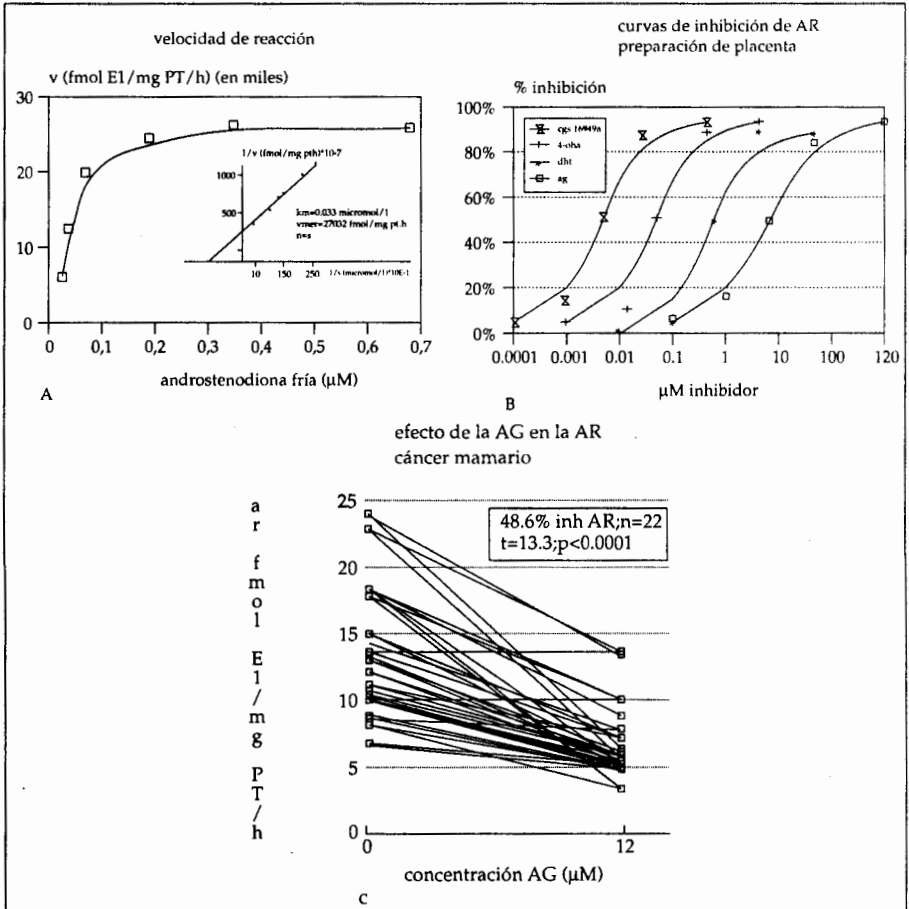


Fig. 1. Efecto de la concentración de androstendiona en la velocidad de reacción. (B) Capacidad inhibitoria de diferentes fármacos. (C) Efecto inhibitor de la aminoglutetimida (AG) en cánceres mamarios AR+.

Potencia de los inhibidores de la AR

El preparado CGS 16949A exhibe una máxima capacidad inhibitoria de la AR placentaria consiguiendo la inhibición del 50% a una concentración 0.01 μ M (Fig. 1B). La AG es el preparado con menor potencialidad inhibitoria alcanzandose la inhibición del 50% a la concentración de 12 μ M. El resto de los fármacos estudiados tienen una capacidad inhibitoria intermedia.

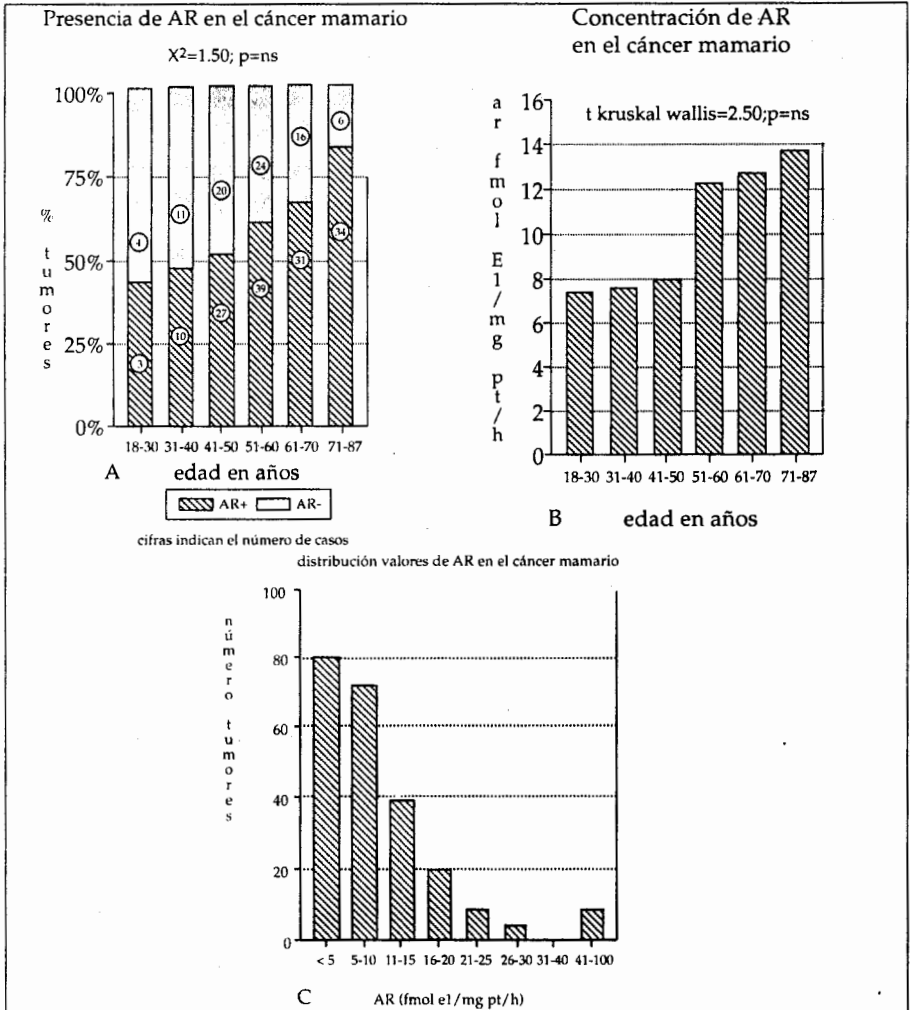


Figura. 2. Relación de la presencia de AR (A) y de la concentración de AR (B) con la edad de las pacientes afectas de cáncer mamario. (C) Distribución de los valores de AR.

AR en el cáncer mamario humano

Los valores de AR tienen una distribución logarítmica con rango de valores para los tumores AR+ desde 5 a más de 41 fmol E₁/mg PT/h (Fig. 2C).

145 de los 225 cánceres estudiados (64%) son AR+. El grupo de las mujeres postmenopausicas tienden a tener mayor proporción de cánceres AR+ y mayor concentración de AR, no obstante estas tendencias carecen de significado estadístico (Fig. 3).

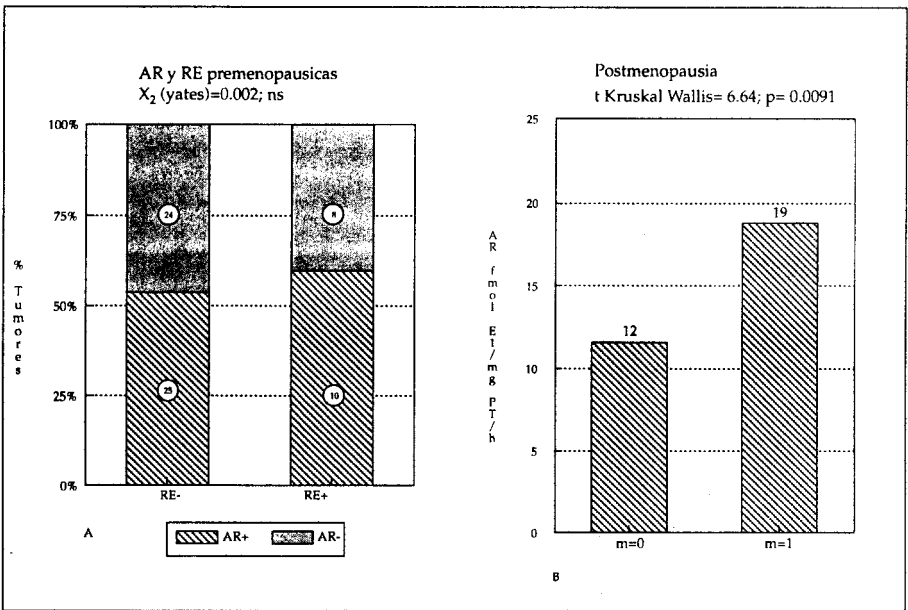


Figura 3. Relación de la presencia (A) o concentración de AR (B) con el estado menstrual de las pacientes afectas de cáncer mamario.

Se observa una tendencia al incremento en la presencia de cánceres AR+ paralelo con la edad, observándose un 50% de tumores AR+ en el grupo de edad de 18-30 años y que supera el 75% en el grupo de pacientes más añosas (Fig. 2A). Sin embargo, el comportamiento cuantitativo de la AR es diferente, mientras las mujeres premenopausicas tienen un nivel de AR sobre los 8 fmoles E./mg PT/h esta AR se incrementa hasta 12 en el grupo de postmenopausicas (Fig. 2B).

No se ha relacionado de la presencia de AR con los tipos histopatológicos (Fig. 4). No obstante, se observa que todos los carcinomas inflamatorios y mucinosos tienen actividad aromatásica, siendo también los carcinomas inflamatorios los tumores con mayor concentración de AR. Tampoco existe asociación significativa de la AR con el IBR, aunque se observe una tendencia a la mayor abundancia de cánceres AR+ en tumores con grado III.

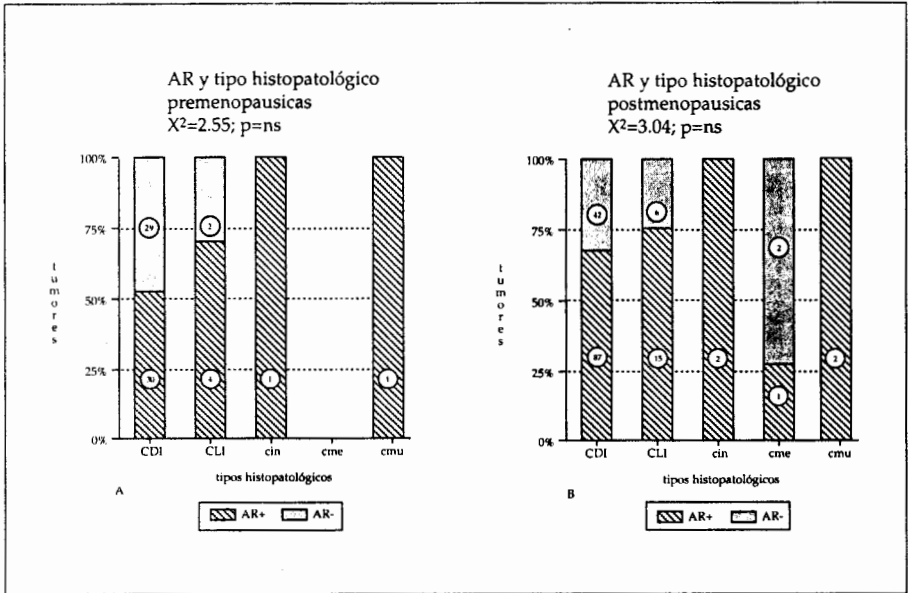


Figura 4. Presencia de AR y tipos histopatológicos de los cánceres mamarios de las pacientes premenopausicas (A) o postmenopausicas (B). CDI: Ductal Infiltrante; CLI: Lobulillar infiltrante; CIN: Inflamatorio; CME: Medular CMU: Mucinoso.

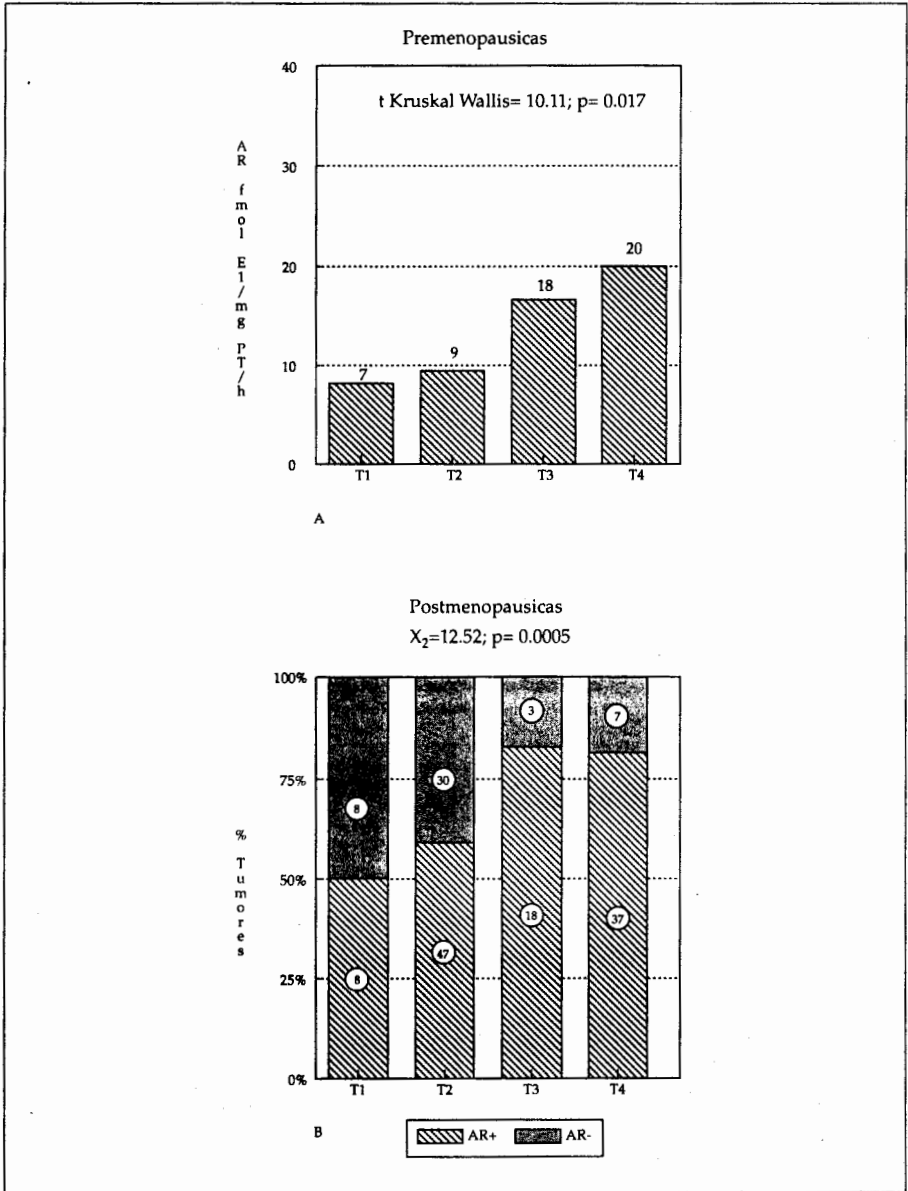


Figura. 5. Relación de la concentración de AR (A) con el tamaño tumoral en las pacientes premenopausicas y (B) relación de la presencia de AR con el tamaño tumoral en las pacientes postmenopausicas.

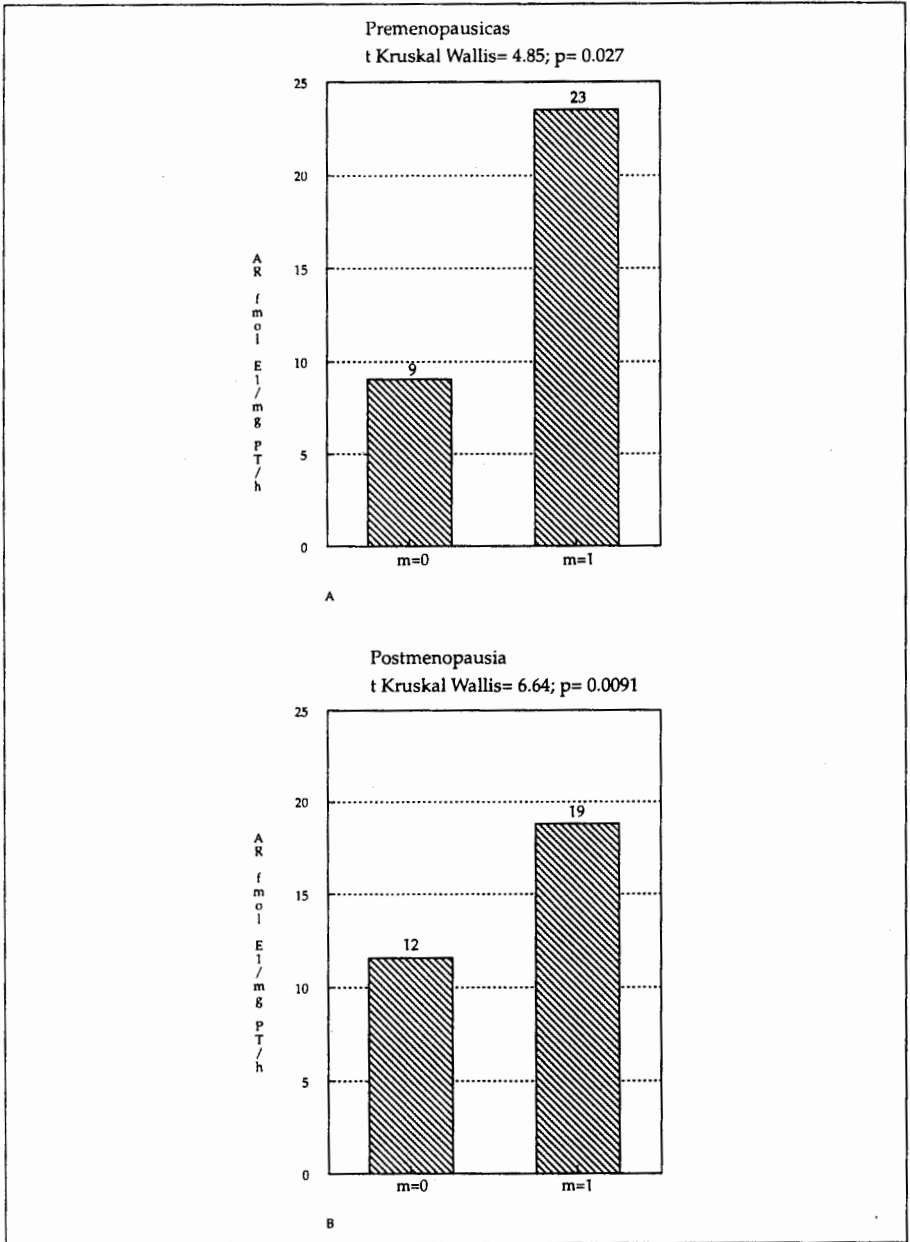


Figura 6. Concentración de AR y metástasis a distancia en los grupos de premenopausicas (A) y postmenopausicas (B).

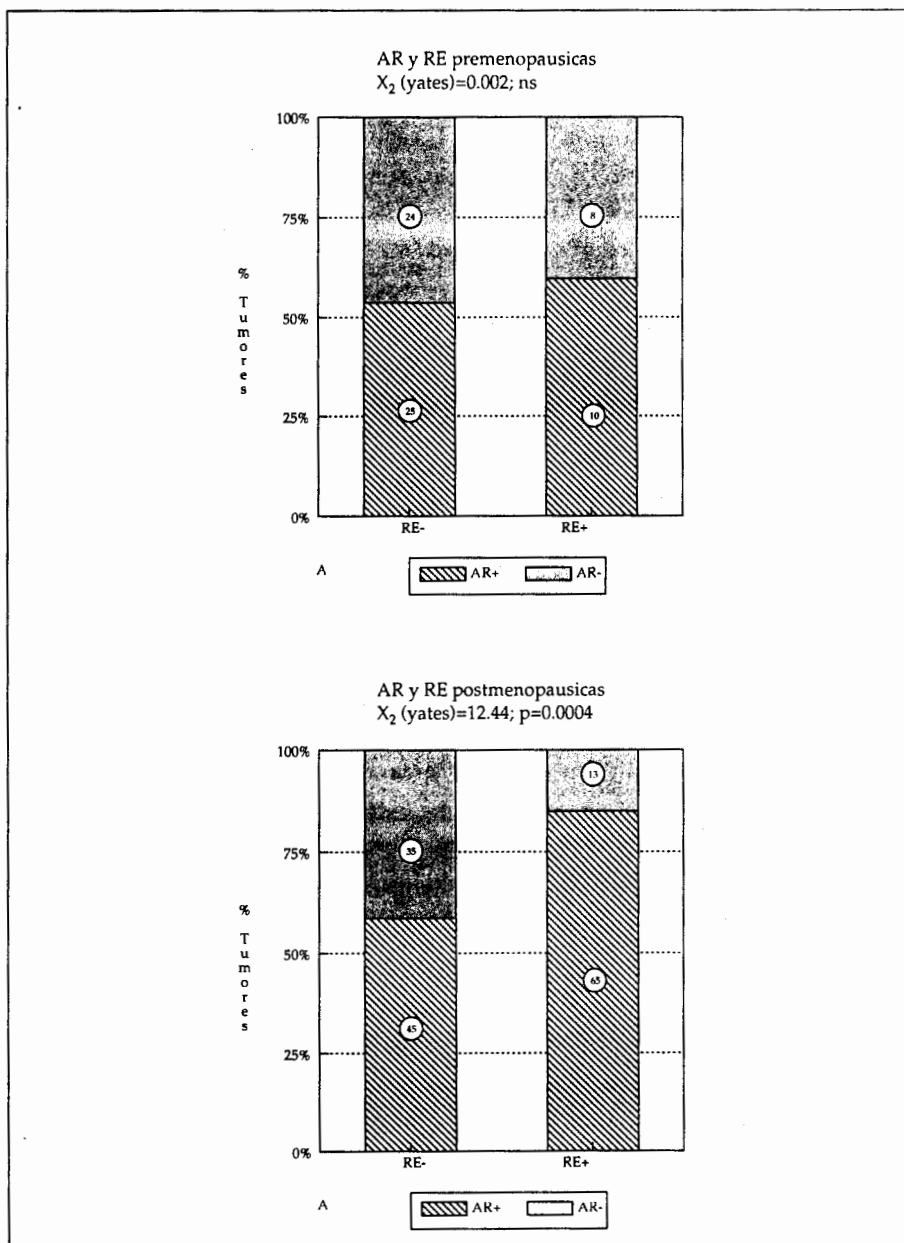
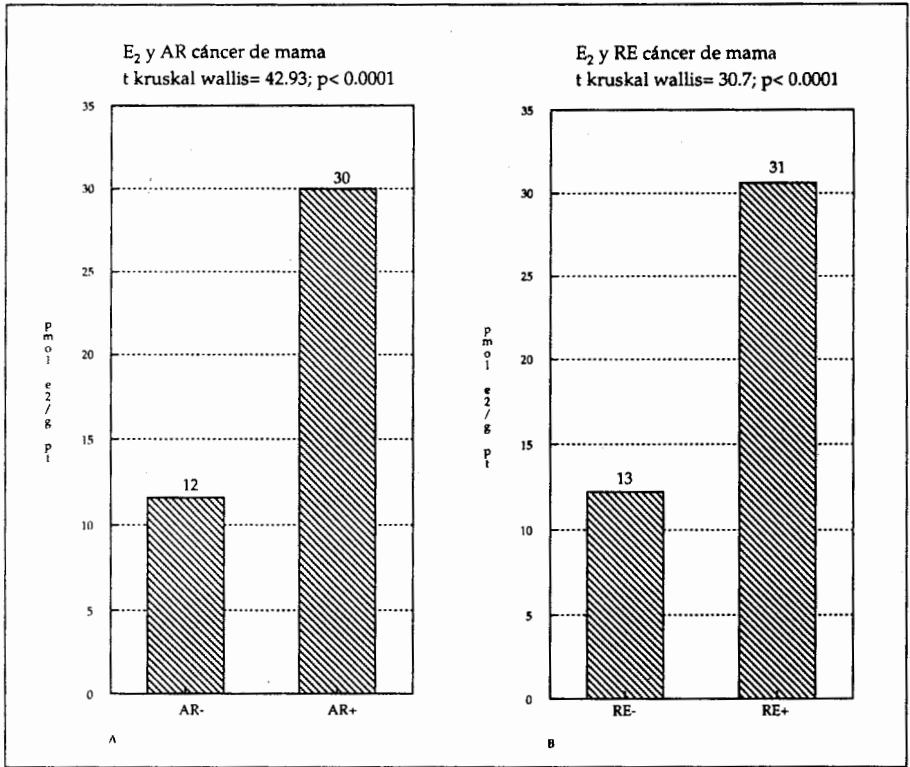


Figura. 7.

Presencia de AR y RE en los grupos de premenopausicas (A) y postmenopausicas (B).

**Figura 8.**

Relación de la concentración de estradiol (E₂) con la presencia de AR (A) o de RE (B) en los cánceres mamarios.

No se ha observado relación de la presencia de AR con el T en el grupo de premenopausicas ($X^2=1.8$; NS), sin embargo se observa un incremento estadísticamente significativo de la concentración de AR con el T (Fig. 5A). En el grupo de postmenopausicas se observa un aumento significativo en la proporción de los cánceres AR+ con el grado del T (Fig. 5B), aunque no ha podido probarse esta relación con la cuantía de AR (KW=3.22; NS).

La presencia de AR no tiene relación con la afectación ganglionar ni con las metástasis a distancia. Sin embargo, los tumores con metástasis a distancia tienen medianas de AR significativamente superiores a los que no las tienen (Fig. 6).

Un 83% de los tumores RE+ del grupo de postmenopausicas son AR+, proporción significativamente superior al 56% de AR+ encontrada en los cánceres RE- (Fig. 7B). Sin embargo, no ha podido encontrarse esta relación en el grupo de la premenopausicas (Fig. 7A). Tampoco se ha encontrado relación cuantitativa de la AR con la presencia de RE ni con los RFCE.

Empleando la AG *in vitro* a una concentración 12 μM se produce una inhibición significativa en la AR del orden del 49% en la mayoría de los tumores (Fig. 1C).

El E_2 intratumoral se ha estudiado sin tener en cuenta la función ovárica de las pacientes dado que su concentración no experimenta variaciones significativas con el cese de la función ovárica (KW=1.28; NS).

No se ha encontrado relación del E_2 con el TNM del tumor. Sin embargo, se observa una asociación directa significativa del contenido en E_2 tumoral con la presencia de RE (Fig. 8B) y de AR (Fig. 8A). Los tumores RE+ o AR+ tienen valores de AR tres veces superiores a las de los tumores negativos para estos parámetros.

Se ha encontrado una correlación significativa del log de E_2 con las variables cuantitativas AR, RE, RFCE y TNM tumoral ($R=0.56$; $F=15.7$; $p<0.0001$, Tabla 2). Sin embargo, el TNM tumoral no parece tener relevancia alguna para explicar el contenido en E_2 , tal como se desprende de que la exclusión de estas variables no ocasione disminución significativa en el coeficiente de correlación ($F_{3,218}$ para eliminación de las variables = 0.04079; NS). Si se separan las pacientes según el estado de su función ovárica se observa que las postmenopáusicas tienen un coeficiente de correlación más fuerte que las premenopáusicas, sin embargo estos patrones de comportamiento carecen de significado estadístico ($F_{1,217}$ análisis de regresión en grupos = 2.104; NS).

Tabla 2.

Estudio de la correlación lineal múltiple del Log de E₂ con los parámetros cualitativos y cuantitativos

Variables	Premeno+Postmeno		Premeno	Postmeno
	Coef (P)	Coef (P)	Coef (P)	Coef (P)
CONSTANTE	0.942 (0.0000)	0.945 (0.0000)	1.056 (0.0000)	0.831 (0.0000)
LOG (AR+1)	0.360 (0.0000)	0.358 (0.0000)	0.283 (0.0000)	0.423 (0.0000)
LOG (RE+1)	0.077 (0.0002)	0.077 (0.0002)	0.098 (0.0663)	0.069 (0.0016)
LOG (RFCE+1)	-0.089 (0.0131)	-0.089 (0.0109)	0.015 (0.8470)	-0.133 (0.0005)
T	-0.020 (0.7471)	—	—	—
N	0.071 (0.5645)	—	—	—
M	-0.001 (0.9964)	—	—	—
R (F;P)	0.56 (18.4;.000)	0.56 (36.6;.000)	0.36 (4.3;.008)	0.66 (40.4;.000)
AR, RE y RFCE son parámetros cuantitativos en tanto que el TNM son variables cualitativas.				

Discusión

De los inhibidores ensayados en la preparación de placenta el CGS 16949A tienen una potencia inhibitoria unas 1000 veces superior a la AG. Este aspecto junto a sus escasos efectos secundarios hacen que este fármaco pueda convertirse en uno de los de elección una vez que hayan finalizado los estudios clínicos (13).

En el presente estudio se ha encontrado un 64% de cánceres AR+, porcentaje muy similar al hallado en otros estudios (1, 5, 18). La tendencia a la mayor proporción de tumores AR+ y mayor cuantía de AR encontrada en las postmenopausicas soporta la idea de aquellos estudios que indican que la AR se incrementa tras la menopausia (19, 20). Sin embargo, en otros estudios llevados a cabo en cáncer mamario no se han obtenido estas mismas conclusiones (1, 4, 9, 18), probablemente debido al escaso número de tumores.

El hecho de que todos los carcinomas inflamatorios fuesen AR+ con una elevada concentración de AR relaciona a la AR con el mal pronóstico característico de este tipo histopatológico.

En el estudio presente se encuentra una asociación positiva fuerte entre la AR tumoral con el T. Sin embargo, esta asociación no puede demostrarse en el grupo de premenopausicas a pesar de que en este grupo se encuentra una relación cuantitativa de entre la AR tumoral y el T. No obstante, la falta de relación del E_2 con el T dificulta la comprensión del mecanismo de acción de la AR. Ello podría interpretarse considerando que la AR fuera más la consecuencia que la causa del comportamiento más agresivo y que estuviera inducida por la mayor secreción de $TGF\alpha$, tal como se ha visto sucede en células de la granulosa ovárica de cerdos (21).

El hallazgo de mayor concentración de AR en los tumores con metástasis a distancia pudiera explicar la buena respuesta a la AG observada en pacientes con metástasis óseas (22).

La buena respuesta obtenida con la AG *in vitro* en la mayoría de los tumores con un porcentaje medio de inhibición del 48% cuestiona la existencia de tumores resistentes al citado tratamiento, pudiendo ser suficiente la presencia de AR para que se pueda suponer una buena respuesta a este tratamiento.

Sólo en un estudio anterior (8) se ha confirmado la asociación de la AR con la presencia de RE en mujeres postmenopausicas, aunque en la mayoría de los estudios no se encuentra este hallazgo (1, 3, 4, 5, 7, 9). Esto pudiera atribuirse a la escasez de los tumores incluidos, junto con el posible efecto del estado menstrual que de no tenerse en cuenta puede dificultar la interpretación de los resultados.

La relación del E_2 intratumoral con los RE ya se ha encontrado un estudio precedente (4), no obstante en el presente observa una asociación más estrecha con la AR. Esta asociación fundamenta la sospecha de que la AR deba tener un papel importante en la síntesis intratumoral de E_2 , tal como lo han sugerido algunos estudios experimentales *in vivo* (11). Los mayores niveles de E_2 intratumoral en los tumores AR+ o RE+ pueden deberse a la consecuencia de una mayor síntesis intratumoral de E_2 o a la mayor capacidad tumoral para retener el E_2 , respectivamente.

La fuerte asociación positiva de la AR con el T, su relación con las metástasis a distancia y la fuerte relación del E_2 intratumoral con la AR, RE y RF-CE, especialmente en postmenopausicas, sugiere que la AR tumoral deba tener una relevancia biológica o traducir la presencia de otros factores relacionados con el mal pronóstico.

Bibliografía

1. MALLET N.T., SANTNER S.J., FEIL P.D., et al: Biological significance of aromatase activity in human breast tumors. *J. Clin Endocrin Metab* 57: 1125-1128, 1983.
2. ROSELLI C.H.E., ELLINWOOD W.E., RESKO J.A.: Regulation of brain aromatase activity in rats. *Endocrinology* 11: 192-199, 1983.
3. BEZWODA W.R., MANSOOR N., DUNSEY R. et al: Aromatization of androstendione by human breast cancer tissue: Correlation with receptor activity and possible biologic significance. *Oncology* 44: 30-33, 1987.
4. VERMEULEN A., DESLYPERE J.P., PARIDADES R., et al: Aromatase, 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase and intratissular sex hormone concentrations in cancerous and normal glandular breast tissue in postmenopausal women. *Eur. J. Clin. Oncol.* 22: 515-525, 1986.
5. LIPTON A., SANTNER S.J., SANTEN R.J., et al: Aromatase activity in primary and metastatic human breast cancer. *Cancer* 59: 779-782, 1987.
6. O'NEILL J.A., ELTON R., MILLER W.R.: Aromatase activity in adipose tissue from breast quadrants: A link with tumour site. *Br Med J.* 296: 741-743, 1988.
7. BEZWODA W.R., MANSOOR N., DANSEY R.: Correlation of breast tumour aromatase activity and response to aromatase inhibition with aminogluthetamide. *Oncology* 44: 345-349, 1987.
8. MILLER W.R., HAWKINS, R.A., FORREST A.P.M.: Significance of aromatase activity in human breast cancer. *Cancer Res* 42 (Suppl): 3365-3368, 1982.
9. LIPTON A., SANTEN R.J., SANTNER S.J., et al: Correlation of aromatase activity with histological differentiation of breast cancer. A morphometric analysis. *Breast Cancer Res Treat* 12: 31-35, 1988.
10. SANTEN R.J.: Aromatase inhibitors for treatment of breast cancer: Current concepts and new perspectives. *Breast Cancer Res Treat* 7 (Suppl): 23-36, 1986.
11. LONNING P.E., DOWSETT M., POWLES T.J.: Postmenopausal estrogen synthesis and metabolism: Alterations caused by aromatase inhibitors used for the treatment of breast cancer. *J. Steroid Biochem* 35: 355-366, 1990.
12. BLOOM H.J.G., RICARDSON W.W. Histologic grading and prognosis in breast cancer. *Br J. Cancer* 11: 359-377, 1957.
13. DEMERS L.M., MELBY J.C., WILSON T.E., LIPTON A., HARVEY H.A., SANTEN R.J. The effects of CGS 16949A, an aromatase inhibitor on adrenal mineralcorticoid biosynthesis. *J. Endocrinol* 70: 1162-1166, 1990.
14. THOMPSON D.B. SIITERI P.K.: Utilization of oxygen and reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate by human placental microsomes during aromatization of androstendione. *J. Biol Chem* 249: 5364-5367, 1974.
15. BOLUFER P., MIRALLES F., RODRIGUEZ A. et al: Epidermal growth factor receptor in human breast cancer: Correlation with cytosolic and nuclear ER receptors and with biological and histological characteristics. *Eur J. Cancer* 26: 283-290, 1990.

16. LEAKE R.E., LAING L., SMITH D.C.: The role of estradiol-nuclear receptor measurement in the management of human breast cancer, in: King R.J.B. (ed): Steroid receptor in human breast cancer tumors: Methodological and clinical aspects. Cardiff, Alpha Omega Press, 1978, pp. 75-86.
17. ARMITAGE P. Multiple regression and multivariate analysis, in: Armitage P (ed): Statistical methods in medical research. Oxford, London, Blackwell Scientific Publications, 1977, pp. 302-348.
18. MILLER W.R., FORREST A.D.M.: Oestradiol synthesis from C19 steroids by human breast cancers. *Br J. Cancer* 33: 116-118, 1976.
19. BRODIE A.M.H., DOWSETT M., COOMBES R.C.H.: Aromatase inhibitors as new endocrine therapy for breast cancer, in: Osborne C.K. (ed): Endocrine Therapies Breast Cancer. Boston, Kluwer Academic Publishers, 1988, pp. 51-65.
20. LUEPRASITSAKUL P., LONGCOPE C.: Aromatase activity of human adipose tissue stromal cells: Effects of thyroid hormones and progestogens. *P. Soc. Exp. Bio. Med.* 194: 337-341, 1990.
21. GANGRADE B.K., DAVIS J.S., MAY J.V. A novel mechanism for induction of aromatase in ovarian cells in vitro: Role of transforming growth factor α -induced protein tyrosine kinase. *Endocrinology*, 129: 2790-2792, 1991.
22. BHATNAGAR A.S., NADJAFI C.H., STEINER R.: Aromatase inhibitors in cancer treatment, in Stall Sa (ed): Endocrine Management of Cancer. 2-Contemporary Therapy, Basel, Krager, 1988, pp. 30-42.