

**BASES MOLECULARES DEL CANCER,
APLICACIONES CLINICAS
Y DESARROLLO TECNOLOGICO**

Madrid, Septiembre 3-5, 1990

Farmaindustria

Serie Científica

Madrid, 1991

RECEPTOR Y FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDERMICO EN LOS CANCERES HUMANOS MAMARIO, ENDOMETRIAL Y PULMONAR

P. BOLUFER¹, A. LLUCH², F. MIRALLES¹, V. ALBEROLA²,
A. RODRIGUEZ¹, J. PADILLA¹, C. VAZQUEZ³, F. LLOPIS⁴

Hospital la Fé (Valencia)¹ Hospital Clínico Universitario (Valencia)²,
Instituto Valenciano de Oncología (Valencia)³, Hospital de Sagunto (Valencia)⁴

Resumen

El presente estudio trata de verificar la hipótesis paracrina del desarrollo tumoral promovido por la acción del factor crecimiento epidérmico (EGF) a través de su receptor (REGF) en los cánceres humanos, humanos mamario (CM), endometrial (CE) y pulmonar (CP). Para ello se determinan el EGF y el REGF en 72 CM y en 2 tumores mamarios benignos, 10 CE y en 34 CP acompañados del tejido peritumoral sano (PS). En los CM y CE se cuantifican además receptores de estradiol (RE). El EGF se determina en plasma, saliva y orina de 20 pacientes con CM antes y tras la intervención así como en 8 pacientes con CM en etapa metastásica. El EGF se determina siguiendo un método de RIA. El REGF se cuantifica según un procedimiento de saturación de doble punto que emplea mEGF-I¹²⁵ como ligado y mEGF como competidor frío. Los RE se cuantifican según el sistema multipunto de Scatchard empleando E₂-³H como ligado y dietilestilbestrol como competidor. En el CM se ha encontrado una relación inversa de la presencia del REGF con la del RE. La concentración de EGF es mayor en los tumores benignos de mama que en los CM. El REGF está significativamente más elevado en los CM REGF+/RE que en los REGF+/RE+. No se han encontrado variaciones significativas en los niveles de EGF en plasma, saliva y orina tras la exéresis tumoral ni diferencias con el grupo de referencia. Tampoco existen diferencias en los niveles de EGF del grupo de pacientes con enfermedad metastásica avanzada con el de referencia. Se ha encontrado

REGF en 8 de los 10 CE sin que se haya podido relacionar con los RE. El fenotipo REGF+/RE+ se presenta en mayor proporción siendo el que tiene mayores niveles de REGF. El REGF se ha encontrado en el 76% de los CP estando relacionado con el grado de diferenciación. El REGF tiene una mediana más elevada en el CP que en el PS. La concentración de EGF es más elevada en el PS sano que en el CP. Hay una correlación directa de los valores de EGF con las del REGF en el PS que se hace inversa en el CP. Estos resultados permiten concluir: 1) En el CM no parece que el EGF tenga un papel importante ya que está más elevado en los tumores benignos y sus niveles en los líquidos biológicos no varían ni tras la exéresis tumoral ni con la difusión del mismo; 2) En el CE, a diferencia de lo que sucede en el cáncer mamario, no existe relación entre el REGF y el RE; 3) En el CP el REGF está relacionado con el grado de diferenciación tumoral estando más elevado en los CP que en PS y 4) El EGF tampoco parece tener un papel importante en el PC ya que tiene niveles inferiores en éste en comparación con el PS.

Introducción

El factor de crecimiento epidérmico (EGF) y su receptor (REGF) se han implicado como posibles mediadores en la regulación autocrina o paracrina del desarrollo e invasión tumoral (1,2), habiéndose probado los efectos estimuladores del crecimiento tumoral en diversas líneas celulares de carcinomas humanos (3). El EGF y su análogo el Factor de Crecimiento Tumoral α (TGF α), aunque estructuralmente no idénticos, comparten el Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (REGF) (1). El EGF se ha encontrado en la orina humana (4-6) así como en saliva, plasma y leche (1). Algunos estudios indican que la excreción urinaria de EGF está elevada en mujeres con cáncer mamario (7) habiéndose encontrado asimismo excreciones elevadas de TGF α de alto peso molecular en los pacientes con cáncer (8-12).

Aunque existen estudios sobre la eliminación urinaria del EGF y TGF en cáncer mamario (7,9,10), sin embargo, es escasa la documentación acerca del lugar de formación de tales factores no existiendo pruebas fehacientes que demuestren su producción por parte de las células tumorales. Solamen-

te se ha podido demostrar que los cultivos de células tumorales son capaces de secretar TGF al medio de cultivo (13-16). Tampoco existen trabajos que relacionen la presencia del REGF con el EGF en los cánceres humanos y/o tejidos normales. Todo ello ha motivado que en el presente estudio se trate de evaluar la importancia del EGF en los cánceres humanos mamario, endometrial y pulmonar y su relación con el REGF, tratando asimismo de esclarecer el significado del REGF en el cáncer humano y su relación con los RE en los endometrial y mamario.

Material y Métodos

Tejidos y órganos normales

Se ha cuantificado el EGF en placenta humana así como hígado, pulmón, corazón y riñón de ratones adultos C57BLB6 y en riñón de perro.

Tumores mamaros

Se ha determinado el EGF y el REGF en un total de 72 muestras de cánceres mamaros procedentes de pacientes con 53 años de edad mediana. El tipo histológico predominante es el carcinoma ductal infiltrante, con 55 casos, distribuyéndose el resto de los tumores entre los tipos mixto con 5 casos, lobulillar con 4, medular con 3, y existiendo 4 de otros tipos. También se recogen 2 tumores benignos, una mastopatía bicroquística y un fibroadenoma. Asimismo se incluyen dos adenopatías infiltradas por cáncer mamario.

Grupo de pacientes con cáncer mamario en fase metastásica

Está constituido por un total de 8 pacientes afectas de cáncer mamario que están en el estadio de enfermedad metastásica diseminada múltiple presentando uno o más focos metastásicos ganglionares, óseos y/o viscerales. De cada una de estas pacientes se recogen muestras de plasma, saliva y orina, para cuantificación del EGF en estos líquidos biológicos.

Efecto de la exéresis tumoral

Se ha estudiado en un grupo de 20 pacientes con cáncer mamario en las que se les ha determinado el EGF en plasma, saliva y orina, antes y tras la exéresis quirúrgica del tumor.

Cáncer genital femenino

Existen un total de 10 pacientes con carcinoma de endometrio con edades comprendidas entre 53 a 63 años y una paciente de 53 años afecta de carcinoma de ovario.

Cáncer pulmonar

El grupo está constituido por 34 carcinomas pulmonares procedentes de pacientes con una mediana de edad de 53 años. El tipo histológico predominante es el carcinoma epidermoide con 23 tumores al que sigue al adenocarcinoma bronquial con 8 casos, existiendo 3 tumores de otros tipos histológicos. En la mayoría de los casos la pieza tumoral se acompaña de una porción del tejido peritumoral sano.

Grupo de referencia

Existen dos grupos de referencia de edad similar a los de patología y exentos de patología tumoral u otro tipo de patología relevante.

Tanto en los tumores mamarios como en los genitales femeninos se determinan RE, REGF y EGF. En el cáncer de pulmón y tejido peritumoral sano sólo se determinan el EGF y su receptor.

Recogida de las muestras

El tejido tumoral recogido en el momento de la intervención se deposita en un frasco conteniendo tampón de transporte, que se conserva a 4°C, llevándose al laboratorio en plazo inferior a 20 minutos. Una vez en el laboratorio las muestras tumorales se almacenan en N₂ líquido hasta el momento de la determinación.

Las muestras de los líquidos biológicos, plasma, saliva y orina, una vez obtenidas, se almacenan congeladas a -20°C hasta el momento de la cuantificación del EGF.

Determinación del EGF y REGF

Reactivos

Se ha empleado el factor de crecimiento epidérmico de ratón, *mEGF receptor grade* (mouse EGF, Biomedical Technologies Inc) así como el humano

recombinante (EGFh) de la misma marca. Como trazadores se han empleado el mEGF-1¹²⁵ (Act. Esp. 164-178 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$, NE) y el EGFh-1¹²⁵ (Act. Esp. >6000 Ci/mmol. Amersham). Como segundo anticuerpo se emplea una antigammaglobulina de conejo (Milles-Yeda).

Extracción del EGF tisular

Todo el proceso de homogenización se efectúa en baño de hielo. Se toma entre 150-300 mg del tejido homogenizándose en 2 ml. de acético 0.5% (p/v) empleando el homogenizador Ultra-Turrax. El homogenizado así obtenido se centrifuga a entre 500-1000 g x 5 minutos a 4°C, recogiendo el sobrenadante y eliminando los restos sólidos. Las muestras así preparadas se almacenan congeladas a -20°C hasta el momento del ensayo.

Procedimiento para la cuantificación del EGF

El extracto acético de EGF de los tejidos se neutraliza previamente al RIA llevándolo a pH 7.4 con ayuda de NaOH 0.5N. El plasma, saliva y orina se emplean diluidos en tampón de ensayo.

Fundamento del RIA empleado

Se emplea el anticuerpo obtenido inmunizado a conejos con mEGF (Receptor grade BTI). El EGFh-1¹²⁵ recombinante (Amersham) se emplea como ligando marcado, utilizando como patrón el EGFh recombinante (Biomedical Technologies Inc). En la separación de las fracciones unida de la libre se emplea un antigammaglobulina de conejo (Milles). Las curvas patrón constan de 7 puntos con rango entre 5 a 0.07 ng EGF/ml.

Para conseguir una mayor sensibilidad se adopta el *ensayo en dos tiempos* consistente en incubar 100 μl del antígeno frío de la curva patrón (EGFh recombinante) o de las muestras, con 100 μl del anticuerpo durante 12h a 4°C. Después se añade a cada tubo 100 μl de EGFh-1¹²⁵, dejando incubar otras 36 h a 4°C. La separación de las fracciones unida y libre se hace empleando el procedimiento del segundo anticuerpo.

Los resultados finales de las muestras tisulares se expresan en ng EGF/mg de *proteína soluble total* (PT) del extracto tisular, determinada por el procedimiento de Bradford (17). En el plasma y saliva los resultados se expresan en ng EGF/ml y en la orina con ng EGF/mg creatinina.

Cuantificación del REGF

Debido al escaso tamaño de las muestras tumorales, la cuantificación del REGF se efectúa siguiendo una técnica de saturación de doble punto, empleando mEGF-I¹²⁵ (Act. Esp. 164-178 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$, NE) como ligando y mEGF (Biomedical Technologies Ltd.) como competidor frío para evaluar el unido inespecífico (18).

Todos los pasos del proceso se llevan a cabo en baño de hielo a 4°C. Se toman entre 150 a 200 mg del tejido tumoral homogenizándose en 2 ml. de *tampón de ensayo* (1 mM HEPES, 5mM CINA pH-7.4 conteniendo 1 g BSA/1) empleando un homogenizador Ultra-Turrax. Las membranas se obtienen centrifugando a 25.000g x 30 minutos a 4°C resuspendiéndose después en el volumen original del *tampón de ensayo*.

La determinación seguida es un ensayo de saturación de dos puntos (18) efectuado en duplicados, que consta de dos tubos para evaluar el *unido total*, que contienen 100 μl de la preparación de membranas, 100 μl de EGF-I125 (40,000 comp \approx 200-300 fmol/ml) y 200 μl del *tampón de ensayo*, y dos tubos para evaluar el *unido inespecífico*, en los que se sustituyen los 200 μl del *tampón de ensayo* con ese mismo volumen de una solución que contienen 8333 fmles. de EGF frío. Los tubos se incuban 2 h a temperatura ambiente, centrifugándose después a 20,000g x 10 min. a 4°C. El unido específico se obtienen sustrayendo de las cpm medias del unido total de cpm medias del unido inespecífico. Los resultados finales se expresan en pg mEGF-I¹²⁵ unidos/mg de PT de membrana.

En cada ensayo se emplea como *control de positividad* un preparado de membranas placentarias dado su alto contenido en REGF.

Un tumor se considera REGF positivo (REGF+) cuando la concentración de REGF es superior a 3 pg REGF/ml de homogenizado y el unido inespecífico es inferior al 70% del unido total (18).

Cuantificación de RE

En los cánceres mamarios se efectúa un test de *escrutinio* para detectar la presencia de RE consistente en un ensayo de saturación de dos puntos similar al ya descrito para el REGF (19), empleando como ligando el estradiol-H³ y el dietilestilbestrol (DES) como competidor frío. Un tumor se considera receptor de estradiol negativo (RE) cuando el porcentaje del unido al ines-

pecífico respecto unido total es $> 30\%$. En el caso contrario se efectúa un Scatchard de 7 puntos en las fracciones citosólica (REc) y nuclear (REn) siguiendo el procedimiento de Leake (20,21).

Los resultados se calculan a partir de la gráfica de Scatchard expresándose en fmol REc/mg de PT, para la fracción citoplasmática, y como fmol ERn/mg ADN, para la nuclear. El ADN se determina según el método de Katzelenbogen (22).

Un tumor se considera receptor de estradiol positivo (ER+) cuando es positivo simultáneamente en las fracciones citosólica (REc+) y nuclear (REN+), y negativo cuando lo es en alguna de sus fracciones celulares o porque haya resultado negativo en el procedimiento de escrutinio.

Resultados y Discusión

EGF y REGF en órganos y tejidos normales

EGF en órganos y tejidos normales

La cuantificación de EGF en diversos órganos (Fig.1) ha probado que el riñón macho es el que tiene la mayor concentración, seguida del riñón de la hembra. El riñón humano, con una concentración de 0.8 ngEGF/mg PT, tiene un nivel inferior al de la ratona. Le sigue en concentración el pulmón de ratón y el humano. También han podido detectar cantidades valorables de EGF en hígado y corazón de ratón. La alta concentración de EGF renal demuestra que el riñón es un órgano productor de EGF (23,24). Por otro lado, la presencia del EGF en el corazón de ratón no debe sorprender si se tiene en cuenta que se ha probado que el EGF actúa sobre el cronotropismo de la fibra cardiaca (25).

REGF en órganos y tejidos normales

Los resultados obtenidos prueban que la placenta es el tejido más rico en REGF y que el hígado de ratón macho tiene una concentración de REGF muy superior al de la hembra (Fig. 2), tal como se ha constatado en otros estudios (26,27).

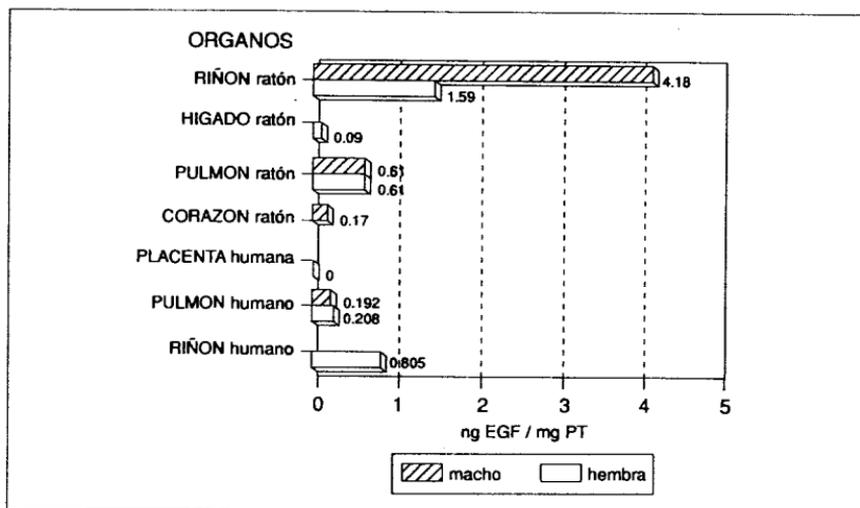


Figura 1

EGF en órganos y tejidos normales

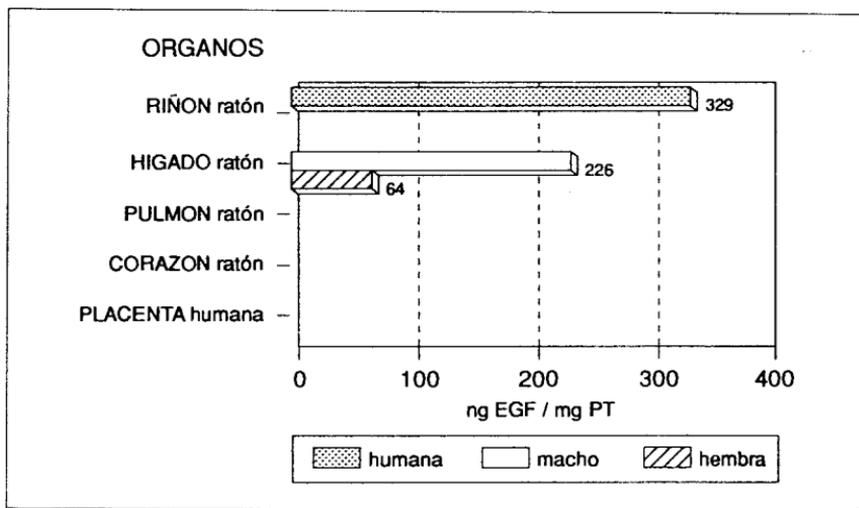


Figura 2

REGF en órganos y tejidos normales

tendría un papel causal en la transformación cancerosa sino que su disminución en el cáncer sería una consecuencia de la misma malignización (28,29).

El REGF tiene una mediana de 95 pg REGF/mg de proteína en los cánceres mamarios REGF+/RE-, significativamente más elevada que la observada en los cánceres REGF+/RE+ (Fig.4).

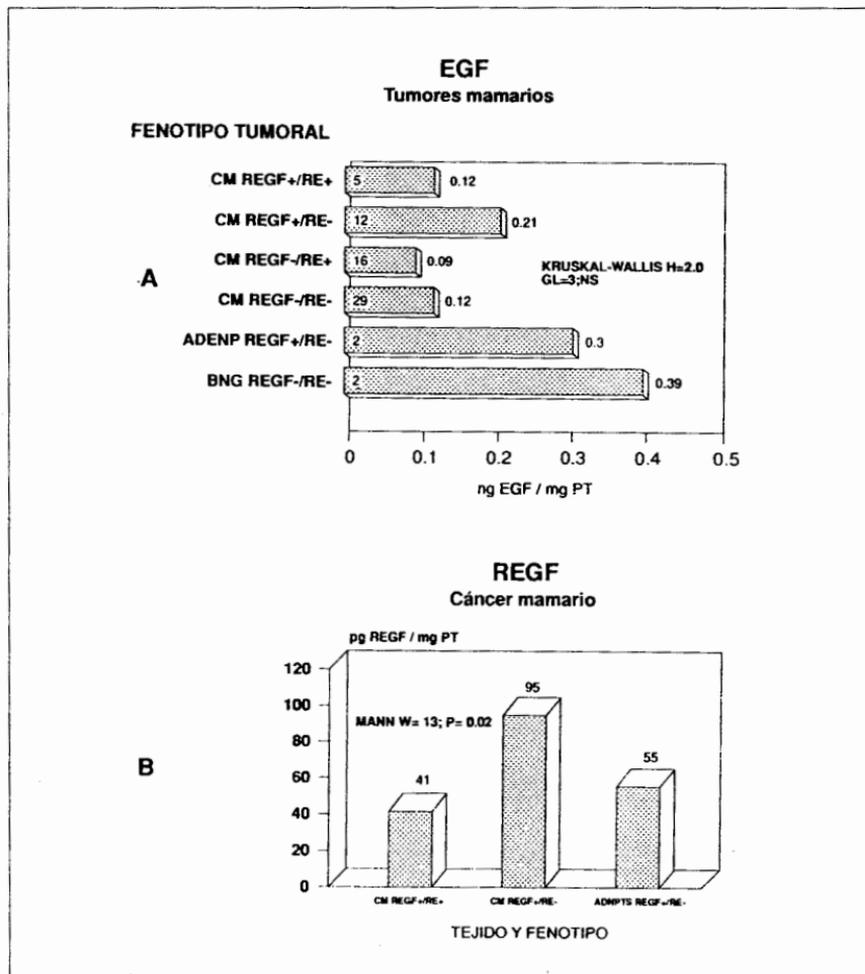
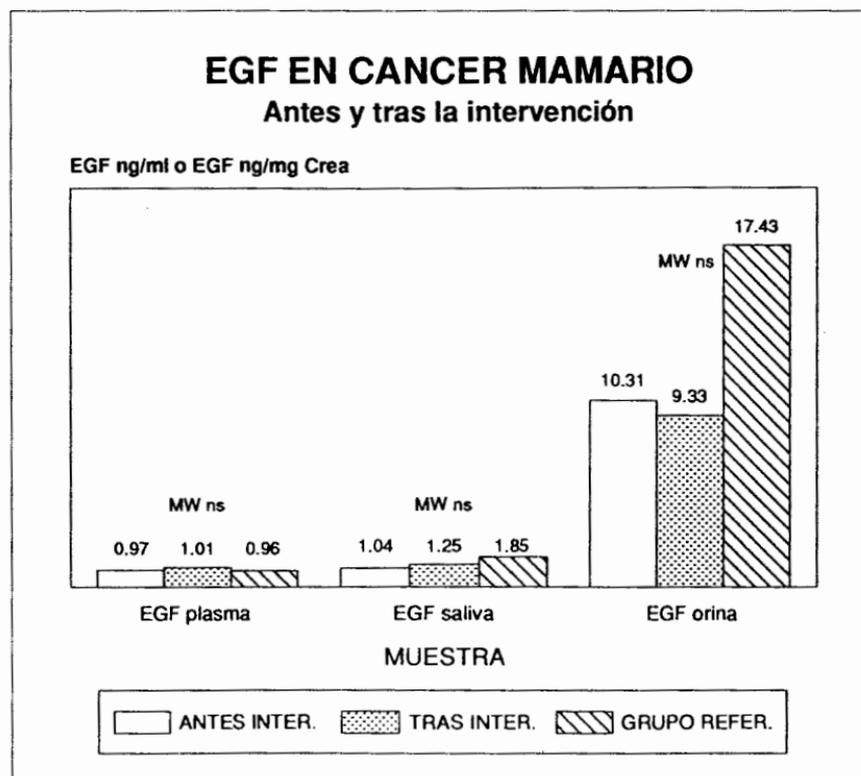


Figura 4
EGF (A) y REGF (B) en tumores mamarios

Efecto de la exéresis tumoral sobre los niveles de EGF en los líquidos biológicos

Las concentraciones de EGF en plasma, saliva y orina de enfermas con cáncer mamario no se modifican por la exéresis tumoral ni llegan a diferir de los valores de su grupo de referencia (Fig.5). Otros estudios llevados a cabo con diversos tumores humanos (3) son plenamente coincidentes con estos hallazgos.

**Figura 5**

Efectos de la exéresis tumoral sobre los niveles de EGF en los líquidos biológicos

EGF en pacientes con cáncer mamario en la etapa de enfermedad metastásica diseminada

Tampoco se ha podido probar que las pacientes con enfermedad metastásica tuviesen niveles de EGF significativamente diferentes a los del grupo de referencia en ninguno de los líquidos biológicos aquí estudiados (Fig.6).

Los hallazgos anteriores son acordes con algunos estudios en los que tampoco se encuentra relación de la eliminación urinaria de EGF con el riesgo de padecer cáncer mamario (7). Sin embargo, existen numerosos trabajos que señalan que estas pacientes excretan factores de crecimiento polipeptídico del tipo del EGF y TGF α de elevado peso molecular (9-12).

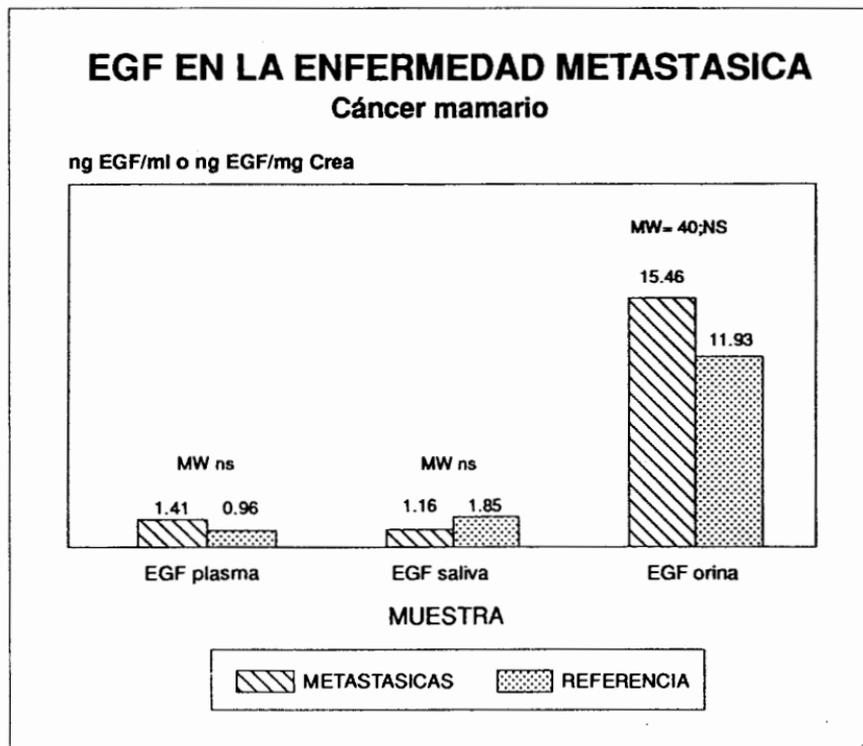


Figura 6

EGF en líquidos biológicos de pacientes con cáncer mamario en etapa metastásica. Comparación con el grupo de referencia.

EGF y REGF en el cáncer genital femenino

EGF y REGF en el cáncer de endometrio

Se ha detectado REGF en 8 de los 10 cánceres de endometrio (80%) y en 5 de los 6 cánceres RE+ (Fig. 3). En el de endometrio a diferencia de lo que sucede en el cáncer mamario, tanto la incidencia global de tumores REGF+ es considerablemente mayor como lo es el fenotipo REGF+/RE+ que representa en el 50% de los casos, significativamente superior ($X^2=12.2$; $P<0.01$) al 8% del cáncer mamario (Fig. 3). Proporciones similares se han encontrado en otro estudio empleando métodos inmunohistoquímicos (31). En el presente trabajo, al igual que en el estudio citado, *tampoco se encuentra relación entre la presencia de los RE y los REGF.*

El limitado número de tumores sólo permite hacer una descripción de los valores de EGF en el cáncer endometrial que oscilan en un rango entre 0.17 ng EGF/mg PT (Fig. 7) correspondiente a los fenotipos REGF+/RE- y REGF-/RE+ a un máximo valor de 0.7 ng EGF/mg PT encontrado en un tumor REGF-/RE-.

Las mayores concentraciones de REGF (Fig. 7) se observan en el grupo de adenocarcinomas de endometrio REGF+/RE+, con mediana de 86 pg REGF/mg PT, claramente superior a los 40 pg REGF/mg del grupo de REGF+/RE-. Estos resultados son opuestos a los descritos en el cáncer mamario, en el que la mediana de REGF del fenotipo REGF+/RE- es más elevada que la del fenotipo REGF+/RE+ (Fig.4).

EGF y REGF en el cáncer pulmonar

La presencia de REGF se ha encontrado en 26 cánceres, 76% del total, siendo 8 de ellos, 24% del total, REGF- (Fig. 8). En el grupo de cánceres REGF+, tan solo el 23% (6 de los 26 tumores) tienen características histológicas de indiferenciación, proporción significativamente inferior ($X^2=7.19$) al 75% encontrado en el grupo de los cánceres REGF-. Otros estudios efectuados en tejido canceroso pulmonar empleando técnicas inmunohistoquímicas (32,33) coinciden en señalar que la presencia de REGF se asocia con un mayor grado de diferenciación. En el carcinoma microcítico tampoco se han encontrado REGF (32,33), habiéndose comprobado que estos tumores no forman el mRNA que codifica el REGF (34).

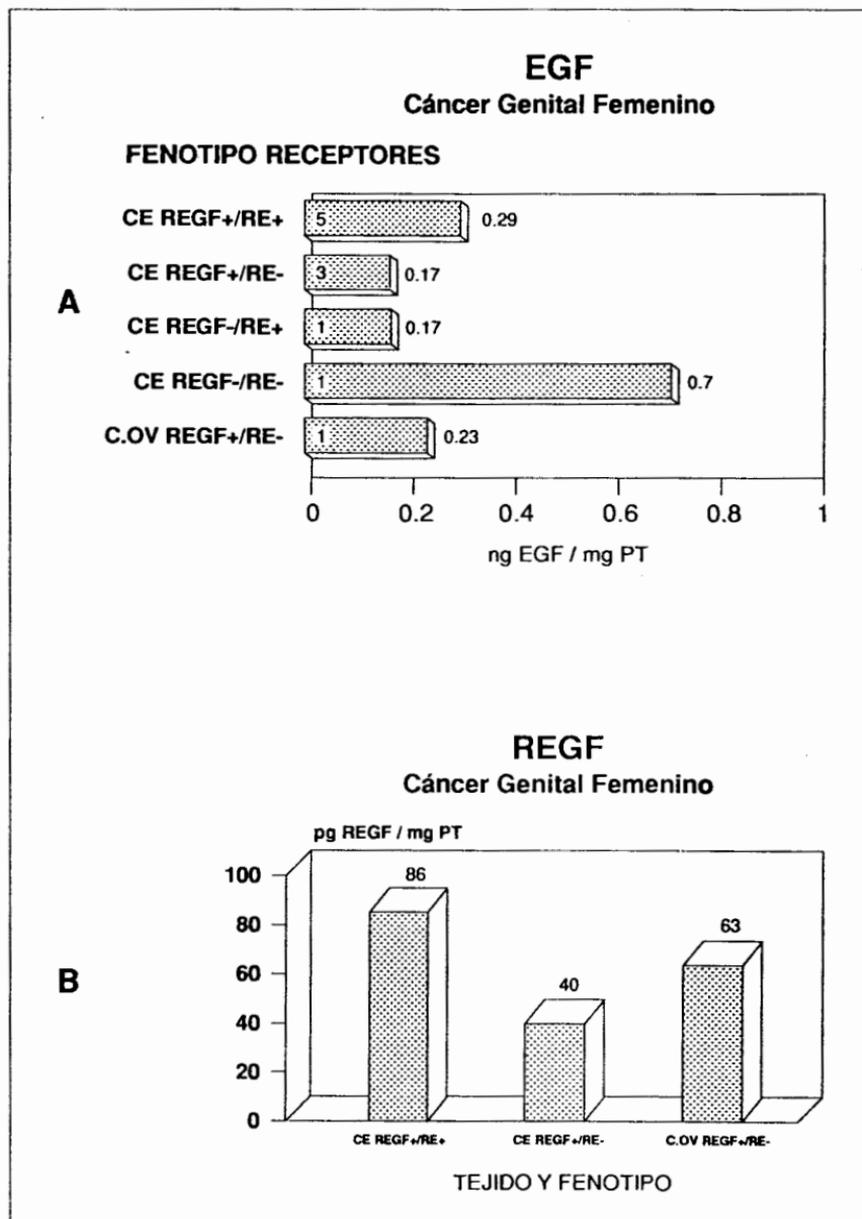


Figura 7
EGF (A) y REGF (B) en cáncer genital femenino

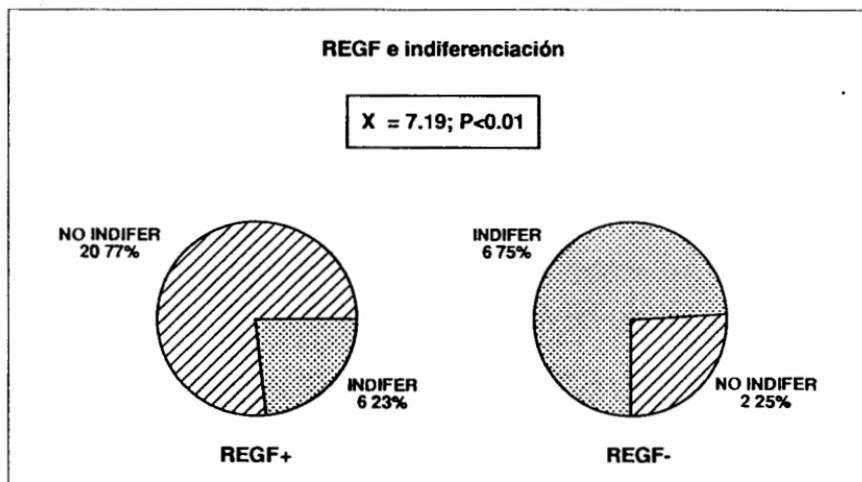


Figura 8
REGF y grado de indiferenciación histológica en cáncer de pulmón

Se han encontrado niveles de EGF detectables en todas las muestras pulmonares (Fig.9), tanto de cáncer de pulmón como en pulmón sano. Los pulmones sanos REGF+ tienen una mediana de 0.216 ng EGF/mg PT, claramente superior a la de los cánceres pulmonares REGF+ aunque esta diferencia no llega a los límites de la significación estadística (MW=436; $P=0.97$). Los resultados expuestos revelan que el pulmón sano tiene concentraciones superiores de EGF que disminuyen con la transformación cancerosa. Esto hace suponer que el EGF y su REGF jueguen un papel en la fisiología del pulmón normal.

Por otro lado, la concentración mediana de REGF del cáncer de pulmón (Fig.9), con 110 pg REGF/mg PT, alcanza cifras netamente superiores a la mediana de 65 pg REGF/mg PT del tejido peritumoral sano, aunque esta diferencia sólo llega al límite de la significación estadística (MW=449; $P=0.08$). No obstante, el cociente REGF/EGF del cáncer de pulmón con mediana de 816 resulta significativamente superior (MW=472; $P=0.013$) al de 250 del tejido peritumoral sano. La mayor concentración de REGF en el pulmón tumoral podría ser atribuible a la gran abundancia de carcinomas epidermoides en los que se ha demostrado una mayor abundancia de REGF.

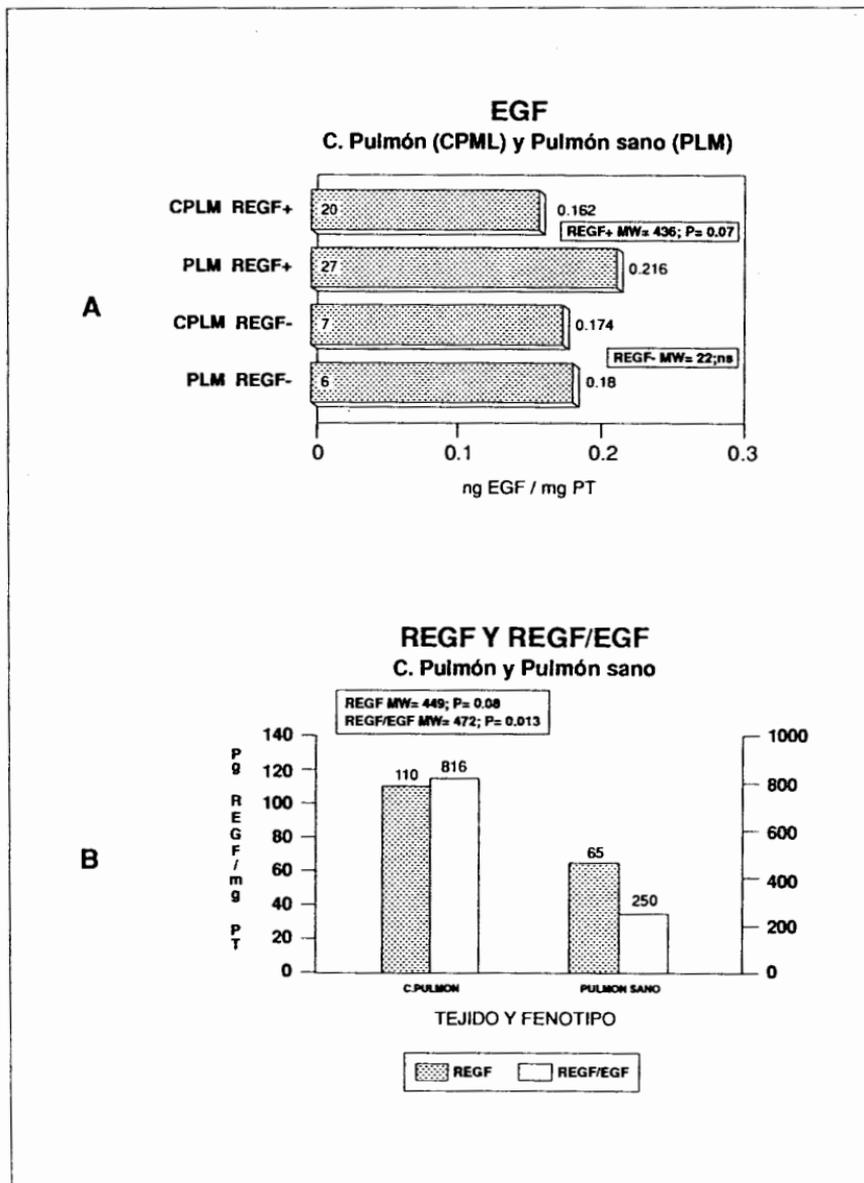


Figura 9
EGF (A) y REGF (B) en cánceres de pulmón y tejido peritumoral

Se ha probado la existencia de una *correlación* lineal (Fig. 10) directa entre las concentraciones de EGF y REGF para el tejido peritumoral sano ($r_s=0.49$; $P=0.01$), que se invierte en el cáncer pulmonar ($r_s=-0.38$; $P=0.064$). Esta diferencia en los patrones de REGF y EGF entre el pulmón sano y el cáncer pulmonar se podría explicar como consecuencia de que el aumento de REGF del cáncer pulmonar induciría a una mayor fijación del EGF a su receptor con disminución en la concentración de EGF. En el pulmón, al igual que se ha visto al comparar en los fenotipos de REGF y RE del tejido mamario normal con el cáncer de mama (35), la transformación cancerosa ocasionaría la expresión de un patrón fenotípico distinto al observado en el tejido sano.

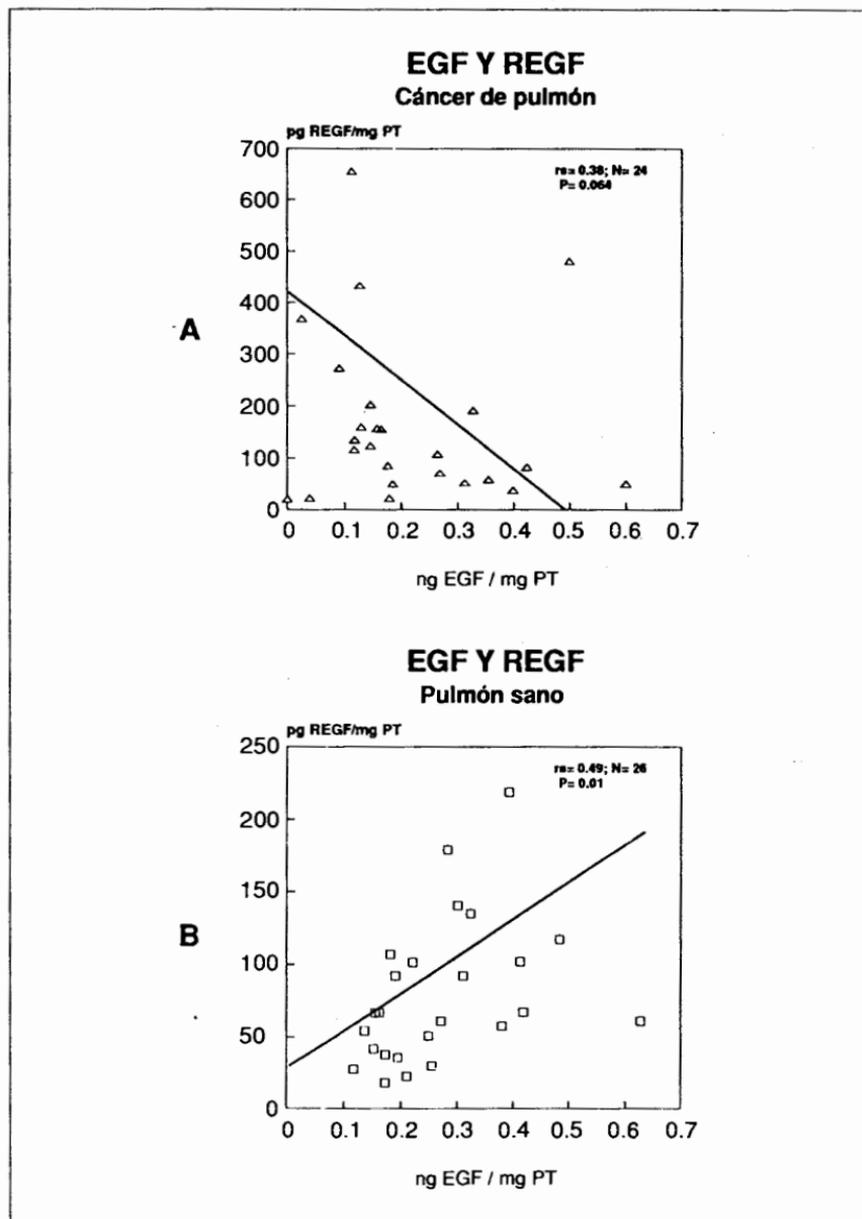
Los resultados anteriores permiten obtener las siguientes conclusiones:

Cáncer mamario

- 1º) La mayor cuantía de REGF en los cánceres RE- en comparación con los RE+ junto a la relación inversa entre ambos receptores sugieren que en la célula transformada se perderían los mecanismos de regulación estrogénica del REGF descrito en tejidos diana.
- 2º) La mayor concentración de EGF detectada en los escasos tumores benignos en comparación con la de los cánceres mamaros cuestiona su papel en el desarrollo y progresión tumoral.
- 3º) La falta de relación de los niveles de EGF presentes en los líquidos biológicos con la presencia del tumor o con su invasión metastásica afianzan la conclusión anterior.

Cáncer de endometrio

- 1º) El hallazgo de fenotipos de receptores de REGF y RE muy diferenciados, cualitativa y cuantitativamente, en los dos cánceres estrógeno-dependientes mamario y endometrial, podría ser la consecuencia de la existencia de diferentes mecanismos de regulación genética de estos receptores específicos de cada uno de estos tejidos.

**Figura 10**

Correlación entre el EGF y REGF en cáncer de pulmón (A) y tejido peritumoral sano (B)

Cáncer pulmonar

- 1º) La presencia de REGF en el tejido pulmonar sano le confiere un rasgo de diferenciación, que explica la disminución o pérdida de este receptor con la indiferenciación del tumor.
- 2º) La presencia de EGF y REGF en casi en todas las muestras de tejido pulmonar y la mayor concentración en pulmón sano, indica que el EGF y su receptor posiblemente tengan un papel fisiológico en el pulmón normal.
- 3º) La inversión de la correlación entre EGF y REGF en el cáncer pulmonar en comparación con el pulmón sano podría deberse a la internalización o disminución de la síntesis de REGF paralela al aumento en la síntesis de factores de crecimiento polipeptídicos por parte del tumor.

Bibliografía

1. BOLUFER P. FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO Y SU PAPEL EN EL DESARROLLO TUMORAL. *ONCOLOGIA*, 1, 1-7, 1988.
2. SAINSBURY JR, FARDON JR, KEEDHAM GK, MALCOLM AJ, HARRIS AL. EPIDERMAL GROWTH-FACTOR RECEPTOR STATUS AS PREDICTOR OF EARLY RECURRENCE AND DEATH FROM BREAST CANCER. *LANCET*, 1, 1398-1402, 1987.
3. SINGLETARY SE, BAKER FL, SPITZER G, TUCKER SL, TOMASOVIC B, BROCK WA, AJANI JA, KELLY AM. BIOLOGICAL EFFECT OF EPIDERMAL GROWTH FACTOR ON THE IN VITRO GROWTH OF HUMAN TUMORS. *CANCER RES* 47, 403-406, 1987.
4. MATTILLA AL, PERHEENTUPA J, PESONEN K, VIINIKKA L, EPIDERMAL GROWTH FACTOR IN HUMAN URINE FROM BIRTH TO PUBERTY. *J CLIN ENDOCRIN METAB* 61 997-1000, 1985.
5. STARKEY R, ORTH DN. RADIOIMMUNOASSAY OF HUMAN EPIDERMAL GROWTH FACTOR (UROGASTRONE). *J. CLIN. ENDOCRIN METAB*, 45, 1144-1153, 1977.
6. GREGORY H, HOLMES JE, WILLSHIRE IR. UROGASTRONE LEVELS IN THE URINE OF NORMAL AND ADULT HUMANS. *J. CLIN ENDOCRIN METAB* 45, 668-672, 1977.
7. WANG DY, MOCKRIDGE CI, FANTL VE, DE STAVOLA B, ALLEN DS, THOMAS BS, MOORE JW, BULBROOK RD, GRAVELLE IH, KWA HG, FENTIMAN IS, HAYWARDS JL. URINARY EPIDERMAL GROWTH FACTOR EXCRETION AND BREAST CANCER RISK. *EUR J CANCER CLIN ONCOL* 24, 1049-1053, 1988.
8. TWARDZIK DR, SHERWIN SA, RANCHALIS J, TODARO GJ. TRANSFORMING GROWTH FACTORS IN THE URINE OF NORMAL, PREGNANT AND TUMOR-BEARING HUMANS. *JNCI* 69, 793-798, 1982.
9. KIMBALL ES, BOHN WH, COCKLEY KD, WARREN TC, SHERWIN SA. DISTINCT HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY PATTERN OF TRANSFORMING GROWTH FACTOR ACTIVITY IN URINE OF CANCER PATIENTS AS COMPARED WITH THAT OF NORMAL INDIVIDUALS. *CANCER RES* 44, 3613-3619, 1984.

10. SHERWIN SA, TWARDZIK DR, BOHN WH, COCKLEY KD, TODARO GJ. HIGH-MOLECULAR-WEIGHT TRANSFORMING GROWTH FACTOR ACTIVITY IN THE URINE OF PATIENTS WITH DISSEMINATED CANCER. *CANCER RES* 43, 403-407, 1983.
11. KIM MK, WARREN TC, KIMBAL ES. PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF LOW MOLECULAR WEIGHT TRANSFORMING GROWTH FACTOR FROM THE URINE OF MELANOMA PATIENTS. *J. BIOL CHEM* 260, 9237-9243, 1985.
12. KOGA J, NISHIMURO S, SHIRONO H, ITO CH. MOLECULAR ANTIBODIES SPECIFIC FOR HIGH MOLECULAR WEIGHT FORM OF HUMAN EPIDERMAL GROWTH FACTOR. *BIOCHEM INTERNATIONAL* 19, 445-452, 1989.
13. MOSES HL, BRANUM EL, PROPER JA, ROBINSON RA. TRANSFORMING GROWTH FACTOR PRODUCTION BY CHEMICALLY TRANSFORMED CELLS. *CANCER RES* 41, 2842-2848, 1981.
14. DICKSON RB, LIPPMAN ME. ESTROGENIC REGULATION OF GROWTH POLYPEPTIDE GROWTH FACTOR SECRETION IN HUMAN BREAST CARCINOMA. *ENDO REVIEWS* 8, 29-43, 1987
15. LINSLEY PS, HARGREAVES WR, TWARDZIK RD, TODARO GJ. DETECTION OF LARGER POLYPEPTIDES STRUCTURALLY AND FUNCTIONALLY RELATED TO TYPE I TRANSFORMING GROWTH FACTOR. *BIOCHEMISTRY*, 82, 356-360, 1985.
16. CONNOLLY JM, ROSE DP. SECRETION OF EPIDERMAL GROWTH FACTOR AND RELATED POLYPEPTIDES BY DU 145 HUMAN PROSTATE CANCER CELL LINE. *THER PROSTATE* 15, 177-186, 1989.
17. BRADFORD MM. A RAPID AND SENSITIVE METHOD FOR QUANTIFICATION OF MICROGRAM QUANTITIES OF PROTEIN UTILIZING THE PRINCIPLE OF PROTEIN-DYE BINDING. *ANAL BIOCHEM* 72, 248-254, 1976.
18. BOLUFER P, MIRALLES F, RODRIGUEZ A, VAZQUEZ C, LLUCH A, GARCIA CONDE J, OLMOS T. EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR IN HUMAN BREAST CANCER: CORRELATION WITH CYTOSOLIC AND NUCLEAR RECEPTOR AND WITH BIOLOGICAL AND HISTOLOGICAL TUMOR CHARACTERISTICS. *EUR J CANCER* 26, 283-290, 1990.
19. BOLUFER P, RODRIGUEZ A, ANTONIO P, VIRTO A. PROCEDIMIENTO DE ESCRUTINIO PARA LOS RECEPTORES DE ESTRADIOL EN EL CANCER MAMARIO. *REV DIAG BIOL* 32, 169-175, 1983.
20. LEAKE RE, LAING L, SMITH DC. A ROLE FOR NUCLEAR ESTROGEN RECEPTORS IN PREDICTION OF THERAPY REGIME FOR BREAST CANCER PATIENTS. IN: KING RJB ED. STEROID RECEPTOR ASSAYS IN HUMAN BREAST TUMORS: METHODOLOGICAL AND CLINICAL ASPECTS. CARDIFF, ALPHA OMEGA PRESS, 75-86, 1979.
21. MUÑOZ J, BOLUFER P, RODRIGUEZ A, ANTONIO P, VAZQUEZ C. DNA/PROTEIN RATIO AS AN INDEX OF OESTROGEN RECEPTOR CONTENT IN HUMAN BREAST CANCER. *EUR J CANCER CLIN ONCOL* 19, 1207-1212, 1983.
22. KATZELENBOGEN BS, LEAKE RE. DISTRIBUTION OF ESTROGEN-INDUCED PROTEIN BETWEEN ENDOMETRIAL AND MYOMETRIAL FRACTIONS OF IMMATURE AND MATURE RAT UTERUS. *J. ENDOCRINOL* 63, 439-449, 1974.
23. OLSEN PS, NEXO E, POULSEN SS, HANSEN HF, KIRKEGAARD P. *Renal origin of rat urinary epidermal growth factor. Regul Peptides* 10, 37-45, 1984.
24. KVIST N, NEXO E. EPIDERMAL GROWTH FACTOR IN URINE AFTER KIDNEY TRANSPLANTATION IN HUMANS. *UROL RES* 17, 255-258, 1989.
25. RABKIN SW, LUNGA P, MYRDAL S. THE EFFECT OF EPIDERMAL GROWTH FACTOR ON CHRONOTROPIC RESPONSE IN CARDIAC CELLS IN CULTURE. *BIOCHEM BIOPHYS RES COMM.* 146, 889-897, 1987.
26. KASHIMATA M, HIRAMATSU M, MINAMI N. SEX DIFFERENCE IN EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR LEVELS IN RAT LIVER PLASMA MEMBRANE. *ENDOCRINOLOGY* 122, 1707-1714, 1988.
27. ALM J, LAKSHMANAM J, FISHER A. SEXUAL DIMORPHISM AND TESTOSTERONE EFFECTS ON LIVER EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR IN MICE. *ACTA ENDOCRINO (COPEHH)* 113, 140-144, 1986.
28. BROWN FCH, TENG CHT, PENTECOST BT, DIAUGUSTINE RP. EPIDERMAL GROWTH FACTOR PRECURSOR IN MOUSE LACTATING MAMMARY GLAND ALVEOLAR CELLS. *MOL ENDO* 3, 1077-1083, 1989.
29. SMITH K, MILLER WR, FENNELLY JA, MATTHEWS JNS, SCOTT WN, HARRIS AL. QUANTIFICATION OF EPIDERMAL GROWTH FACTOR IN HUMAN BREAST CYST FLUIDS: CORRELATION WITH DEHYDROEPIANDROSTERONE-SULPHATE AND ELECTROLYTE CONCENTRATIONS. *INT J CANCER* 44, 229-232, 1989.

30. MATILLA AL, SAARIO I, VIINIKKA L, YLIKORKALA O, PERHEENTUPA J. URINARY EPIDERMAL GROWTH FACTOR CONCENTRATIONS IN VARIOUS HUMAN MALIGNANCIES. *BR J CANCER* 57, 139-141, 1988.
31. BERCHUCK A, SOISSON AP, OLT GJ, SOPER JT, CLARKE-PEARSON DL, BAST RC, MCCARTY KS. EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR EXPRESSION IN NORMAL AND MALIGNANT ENDOMETRIUM. *AM J OBSTET GYNECOL* 161, 1247-1257, 1989.
32. CERNY T, BARNES DM, HASLETON P, BARKER PV, HEALY K, GULLICK W, THATCHER N. EXPRESSION OF EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR (EGF-R) IN HUMAN LUNG TUMOURS. *BR J CANCER* 54, 265-269, 1986.
33. DAZZI H, HASLETON PS, THATCHER N, BARNES DM, WILKES S, SWINDELL R, LAWSON RAM. EXPRESSION OF EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR (EGF-R) IN NONSMALL CELL LUNG CANCER. USE OF ARCHIVAL TISSUE AND CORRELATION OF EGF-R WITH HISTOLOGY, TUMOUR SIZE, NODE STATUS AND SURVIVAL. *BR J CANCER* 59, 746-749, 1989.
34. GAMOU S, HUNTS J, HARIGAI H, HIROHASHI S, SHIMOSATO Y, PASTAN I, SHIMIZU N. MOLECULAR EVIDENCE FOR THE LACK OF EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR GENE EXPRESSION IN SMALL CELL LUNG CARCINOMA CELLS. *CANCER RES* 47, 2668-2673, 1987.
35. BARKER S, PANAHY C, PUDDEFOOT JR, GOODE AW, VINSON GP. EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR AND OESTROGEN RECEPTORS IN THE NON-MALIGNANT PART OF THE CANCEROUS BREAST. *BR. J. CANCER* 60, 673-677, 1989.