

## Estudios sobre el factor de crecimiento epidérmico (EGF). IV. Efecto del EGF sobre la incorporación de timidina en células tumorales *in vivo*

A. LAGE, J. LOMBARDEO y R. PÉREZ

Instituto Nacional de Oncología y Radiobiología, MINSAP, 29 y E, Vedado, La Habana 4, Cuba

### RESUMEN

La presencia de receptores para el EGF en los tumores humanos más indiferenciados y el hecho de que el EGF inhibe la proliferación de las células de carcinoma A431 *in vitro*, nos sugirió la posibilidad de evaluar los efectos del EGF *in vivo*, en animales portadores de tumores. El tumor ascítico de Ehrlich en ratones fue el modelo escogido. El EGF inyectado en región subcutánea tuvo una rápida distribución, alcanzando el peritoneo y reconociendo los receptores específicos en las células tumorales. Los valores pico se obtuvieron en una hora. La expresión de receptores para el EGF en las células disminuye durante, al menos, cinco horas. La inyección de EGF inhibió la incorporación de timidina al material ácido-insoluble de las células tumorales. Este efecto fue dependiente de la dosis y se obtuvo tanto con EGF murino como con EGF humano. Estos resultados plantean la posibilidad de extender el concepto de dependencia hormonal en los tumores al control de la proliferación por los factores de crecimiento.

### SUMMARY

The presence of EGF receptors in non-differentiated human tumors and the fact that EGF inhibits cell proliferation in A431 carcinoma cells *in vitro* suggested us to evaluate *in vivo* the effect of EGF in tumor-bearing animals. Ehrlich ascitis tumor in mice was the model of choice. EGF given subcutaneously underwent rapid distribution reaching the peritoneum and recognizing tumor cell specific receptors. Peak values were obtained at one hour. The expression of receptors for EGF in tumor cells were diminished for at least five hours. The injection of EGF inhibited thymidine incorporation to acid-insoluble material of tumor cells. This effect was dose-dependent and was obtained either with murine or human EGF. Probably, the concept of hormone-dependence in tumors could be extended to cover growth control by peptide growth factors.

### INTRODUCCION

El control de la proliferación celular a través de los factores de crecimiento se ha relacionado con la transformación neoplásica a partir de tres líneas de evidencia: primera, el hecho de que las células transformadas en cultivo tienen menores requerimientos de factores de crecimiento para la proliferación (Clarke *et al.*, 1970; Dulbecco, 1970; Scher *et al.*, 1978); segunda, el hallazgo de que algunas células transformadas en cultivo (Todaro *et al.*, 1981; Kaplan *et al.*, 1981)

y tumores *in vivo* (Nickell *et al.*, 1983) liberan factores de crecimiento; tercera, la relación que se ha establecido recientemente entre los factores de crecimiento, o sus receptores, y los productos de los oncogenes (Downward *et al.*, 1984; Heldin y Westermark, 1984).

Nuestro laboratorio ha trabajado en los últimos años sobre el Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF) y su relación con las neoplasias malignas (Pérez *et al.*, 1984; Macías *et al.*, 1985 y 1985a; Lage *et al.*, 1985). En 1984 publicamos que parte de los tumores mamarios humanos presentan receptores de alta afinidad para el EGF y que existe una relación inversa entre la expresión de los receptores de EGF y la expresión de los receptores de estradiol (Pérez *et al.*, 1984).

La idea de explorar las posibilidades de manipular el sistema EGF/receptor para interferir en la proliferación de los tumores, se sustenta en los siguientes antecedentes: primero, los receptores de EGF existen en los tumores experimentales y humanos, especialmente en los más indiferenciados (Pérez *et al.*, 1984; Libermann *et al.*, 1984); segundo, el EGF, además de su efecto mitogénico, regula la expresión de funciones de diferenciación (Johnson *et al.*, 1980; Schonbrunn *et al.*, 1980), especialmente en tejido mamario (Tonelli *et al.*, 1980; Okamoto y Oka, 1984); tercero, el EGF inhibe la proliferación de las células de carcinoma humano en cultivo A431 (Barnes, 1982) y este efecto se relaciona con la alta expresión de receptores en esas células (Lifshitz *et al.*, 1983).

En este artículo presentamos un estudio del efecto del EGF *in vivo* sobre ratones portadores del tumor ascítico de Ehrlich. Este tumor fue seleccionado como modelo experimental por su alto contenido de receptores de EGF, aproximadamente  $10^4$  sitios por célula (R. Pérez, INOR, comunicación personal).

## MATERIALES Y METODOS

### Factor de crecimiento epidérmico murino

El EGF murino (mEGF) fue obtenido de glándula submaxilar de ratón macho por el método de Savage y Cohen (1972), con modificaciones menores. Brevemente, el tejido fue homogeneizado en ácido acético 0,5 M y ultracentrifugado (100 000 g, 60 min) y el sobrenadante fue liofilizado, resuspendido en HCl 0,05 N/NaCl 0,15 M, recentrifugado y fraccionado en columna de biogel P-10, aprovechando la propiedad del mEGF de absorberse a pH ácido en la matriz de acrilamida. El EGF eluyó en un pico a 1,6 veces el volumen total de la columna y fue sometido a ultrafiltración (Amicon, límite de peso molecular 1 000) y a un paso final de purificación en columna de DEAE-celulosa, eluyéndose con un gradiente de 0,02 M-0,2 M de acetato de amonio pH 5,6.

El EGF fue radioiodado por el método de la cloramina-T (Hunter y Greenwood, 1962).

### Factor de crecimiento epidérmico humano

El EGF humano (hEGF) fue purificado a partir de orina de mujer embarazada, mediante el método de Cohen y Carpenter (1975), con modificaciones menores. Brevemente, la orina fue adsorbida con ácido benzoico y el polvo benzoico fue extraído con etanol. El extracto etanólico fue rotoevaporado, redisoluto en NaOH hasta pH 9,0 y desalado en columna de Sephadex G-10. El material excluido de Sephadex G-10 fue concentrado por rotoevaporación y fraccionado en Sephadex G-50. El pico de EGF fue identificado por el método de radioreceptor análisis, previamente descrito por nosotros (Macías *et al.*, 1985a). Este material fue finalmente sometido a dos pasos sucesivos de purificación por cromatografía de intercambio iónico de DEAE-celulosa y CM-celulosa respectivamente.

### Determinación de receptores

El número de receptores de EGF en la membrana de las células se determinó midiendo la unión específica de  $^{125}\text{I}$ -EGF (150-200  $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ ) a células enteras de la ascitis de Ehrlich, en presencia de diez concentraciones diferentes de EGF no marcado, de 0,1 a 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , como fue descrito previamente por nosotros (Macías *et al.*, 1985). Los resultados se ajustaron a una línea recta según el gráfico de Scatchard (1969).

### Incorporación de timidina *in vivo*

Se utilizaron ratones hembras de 20 gramos de peso, inoculados previamente (5-7 días) con  $2 \cdot 10^6$  células del tumor ascítico de Ehrlich en la cavidad peritoneal. En cada experimento, el grupo de pruebas fue inyectado con EGF subcutáneo en la región dorsal. Se incluyeron dos grupos de control: en el grupo "control positivo", los ratones recibieron 5 mg de ciclofosfamida subcutánea, y en el grupo "control negativo" no recibieron tratamiento previo a la inyección de timidina. Después de seis horas, todos los ratones recibieron  $40 \mu\text{Ci}$  de  $^3\text{H}$ -Timidina (Amersham, 55,4 Ci/mmol) y después de una hora adicional (tiempo de "pulso") fueron sacrificados. La cavidad peritoneal se lavó con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y las células se sedimentaron (200 g, 10 min,  $4^\circ\text{C}$ ) y se lavaron una vez más con PBS.

Después de contarlas, las células se diluyeron convenientemente para obtener dos sedimentos de  $5 \cdot 10^6$  células de cada animal. Cada sedimento se resuspendió en ácido tricloroacético (TCA) al 10 por ciento en baño de hielo, y el material insoluble en TCA fue sedimentado (2 000 g, 10 min,  $0^\circ\text{C}$ ) lavado una vez más con TCA frío. El sedimento final se disolvió en NaOH 0,2 N (una hora a temperatura ambiente) y se contó la radiactividad mediante centelleo líquido (Aquasol, NEN eficiencia 36 por ciento). Las medias de la radiactividad TCA-insoluble en cada grupo se compararon mediante una prueba estadística de diferencia de medias para pequeñas muestras (*t* de Student). La cantidad de proteínas se estimó por el método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951).

## RESULTADOS

### Distribución del EGF subcutáneo

El Factor de Crecimiento Epidérmico murino inyectado en la región subcutánea dorsal de los ratones, se distribuyó rápidamente, alcanzando la cavidad peritoneal. Desde los 15 minutos a partir de la inyección de EGF, se recuperó radiactividad de  $^{125}\text{I}$ -EGF en la cavidad peritoneal (tabla 1). La concentración pico se obtuvo en una hora y posteriormente se mantuvo la radiactividad en el líquido ascítico durante al menos seis horas, en un nivel que equivale aproximadamente al 1 por ciento de la radiactividad inyectada.

Tabla 1  
DISTRIBUCION DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDERMICO

Tiempo	Cantidad de EGF en el líquido ascítico		
	CPM	pg EGF equivalente	Por ciento del total
15 min	27 764 $\pm$ 6 074	87,6 $\pm$ 19,2	1,3
1 hora	83 310 $\pm$ 22 712	263,0 $\pm$ 71,7	4,0
2,5 horas	29 080 $\pm$ 10 408	91,7 $\pm$ 32,8	1,4
6 horas	24 570 $\pm$ 1 130	77,6 $\pm$ 3,6	1,2

Los animales portadores del tumor ascítico de Ehrlich recibieron  $2,09 \cdot 10^6$  cpm (6,6 ng) de  $^{125}\text{I}$ -mEGF ( $200 \mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ ) región subcutánea dorsal. A diferentes tiempos después de la inyección, se extrajo líquido ascítico de la cavidad peritoneal (volumen total, 2 ml) para conteo de radiactividad (eficiencia de conteo 0,72).

La tabla expresa las cantidades de radiactividad encontradas en el líquido ascítico en cpm, la cantidad estimada de EGF a la que corresponde esa radiactividad, y el porcentaje con relación a la cantidad inyectada.

### Efecto del EGF sobre la expresión de sus receptores

Cuando se inyectó mEGF subcutáneo, se produjo una disminución de la cantidad de receptores medibles en las células tumorales de la cavidad peritoneal (tabla 2), que se mantuvo

durante, al menos, cinco horas. A las 24 horas, la expresión del receptor de EGF ya había comenzado a recuperarse. Estos resultados indican que el EGF inyectado en región subcutánea no solo llega a la cavidad peritoneal, sino que llega sin alteraciones que afecten su capacidad de reconocer los receptores de membrana y provoca su regulación negativa.

**Tabla 2**  
**EFFECTO DEL EGF SOBRE LA EXPRESION DE RECEPTORES EN LAS CELULAS TUMORALES**

Tiempo	Receptores de EGF	
	Sitios por célula	Porcentaje
0	37 500 ± 3 676	100
1 hora	13 767 ± 3 213*	37
5 horas	8 633 ± 3 528*	23
24 horas	21 050 ± 9 687	56

Los animales fueron inyectados con 50 µg de EGF subcutáneo en la región dorsal. A diferentes tiempos se extrajo 0,2 ml de líquido ascítico, se lavaron las células con PBS y se utilizaron para la determinación de receptores de EGF, midiendo la unión específica de <sup>125</sup>I-EGF.

El experimento se hizo en triplicado. Los asteriscos indican que la diferencia de medias entre el contenido de receptores en ese tiempo y en el tiempo cero fue estadísticamente significativa ( $p \leq 0,01$ ).

### Efecto del EGF sobre la incorporación de timidina

La inyección de mEGF en la región subcutánea produjo una disminución de más del 70 por ciento en la incorporación de timidina radiactiva al material ácido-insoluble de las células tumorales de la cavidad peritoneal. Este efecto se obtuvo con la dosis de 100 µg de EGF (tabla 3).

**Tabla 3**  
**EFFECTO DEL EGF MURINO SOBRE LA INCORPORACION DE TIMIDINA**

Grupo	Incorporación de <sup>3</sup> H-timidina al material ácido-insoluble			
	(cpm/millón de células)	(%)	(cpm/mg de proteína)	(%)
Control (-)	20 989 ± 5 850	100	143 959 ± 28 931	100
Ciclofosfamida (control +)	3 321 ± 1 204*	15,8	17 629 ± 4 826*	12,2
mEGF 50 µg/ratón	18 676 ± 3 804	89,0	118 322 ± 36 666	82,0
mEGF 100 µg/ratón	5 860 ± 2 906*	27,9	36 149 ± 20 042*	21,5

Los animales fueron divididos en cuatro grupos: el grupo control negativo no recibió tratamiento; el control positivo recibió 5 mg de ciclofosfamida por ratón y los grupos de prueba recibieron 50 µg y 100 µg de EGF, respectivamente, en la región subcutánea dorsal. Después de seis horas todos los animales recibieron un pulso de una hora con 40 µCi de <sup>3</sup>H-Timidina intraperitoneal y posteriormente se extrajeron las células de la ascitis y se contó la radiactividad incorporada al material celular precipitable con TCA. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas en relación con el grupo control ( $p \leq 0,025$ ).

Un efecto similar pudo obtenerse empleando EGF de origen humano (tabla 4).

**Tabla 4**  
**EFFECTO DEL EGF HUMANO SOBRE LA INCORPORACION DE TIMIDINA**

Grupo	Incorporación de timidina al material TCA-insoluble	
	(cpm por millón de células)	(%)
Control (-)	17 064 ± 4 222	100
Ciclofosfamida control (+)	2 617 ± 971*	15,5
hEGF 20 µg/ratón	3 804 ± 929*	22,3

Los animales fueron divididos en tres grupos: el grupo control (-) no recibió tratamiento; el grupo control (+) fue inyectado con 5 mg subcutáneo de ciclofosfamida, y en el grupo de prueba cada animal recibió una inyección subcutánea de 20 µg de hEGF. Después de seis horas todos los animales recibieron un "pulso" de 40 µCi de <sup>3</sup>H-Timidina intraperitoneal durante una hora. Al finalizar el pulso los animales se sacrificaron y se contó la radiactividad incorporada a la fracción TCA-precipitable de las células tumorales de la ascitis. Los asteriscos indican diferencia estadísticamente significativa ( $p \leq 0,01$ ) con el grupo control.

## DISCUSION

Los resultados de los experimentos presentados demuestran: primero, que el EGF inyectado en la región subcutánea se distribuye rápidamente y alcanza la cavidad peritoneal; segundo, que el EGF se distribuye en forma activa, capaz de reconocer los receptores específicos de membrana; tercero, que el EGF provoca *in vivo* un efecto de inhibición de la incorporación de timidina al material ácido-insoluble.

Es importante notar que el efecto de inhibición de la incorporación de timidina es independiente del origen del EGF (murino o humano). El EGF murino se obtiene purificado a homogeneidad por el procedimiento descrito. Además, el hecho de que el efecto de inhibición se obtenga también con EGF de otro origen (humano) y purificado por un procedimiento completamente diferente, indica que la inhibición de la incorporación de timidina es provocada por el propio EGF y no por impurezas o moléculas que copurifiquen con él en pequeñas cantidades.

Según nuestra información, este es el primer reporte en la literatura de un efecto inhibitorio del Factor de Crecimiento Epidérmico sobre células tumorales *in vivo*. En 1982, Barnes publicó que el EGF inhibe la proliferación de células A431 en cultivo (Barnes, 1982) y posteriormente Buss y colaboradores demostraron que este efecto es dependiente de la alta concentración de receptores de EGF en la membrana de estas células (Lifshitz *et al.*, 1983).

Nosotros encontramos que aproximadamente la mitad de los tumores mamarios humanos expresan sitios receptores específicos para el EGF, y en el 21 por ciento de ellos hay una elevada expresión de estos receptores (Pérez *et al.*, 1984; Macías *et al.*, 1985).

Si resultase un hecho general el efecto inhibitorio del Factor de Crecimiento Epidérmico sobre la síntesis de ADN en células con elevada expresión de receptores, ello tendría importantes implicaciones, pues en el orden práctico plantearía la posibilidad de obtener efectos terapéuticos en tumores con este factor de crecimiento, y desde el punto de vista teórico, ampliaría el concepto de "dependencia hormonal" de los tumores a nuevos reguladores biológicos.

Los resultados obtenidos en este trabajo deben ahora ser verificados en nuevos y diferentes sistemas experimentales para evaluar la generalidad del fenómeno encontrado.

## REFERENCIAS

- BARNES, D. W. (1982). *Epidermal Growth Factor inhibits growth of A431 epidermoid carcinoma in serum-free cell culture*. J. Cell Biol. **93**: 1-4.
- CLARKE, G. D.; M. G. P. STOKER; A. LUDLOW y M. THORNTON (1970). *Requirement of serum for DNA-synthesis in BHK 21 cells: Effects of density, suspension and virus transformation*. Nature **227**: 798-801.
- COHEN, S. y G. CARPENTER (1975). *Human Epidermal Growth Factor: Isolation and chemical and biological properties*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA **72**: 1317-1321.
- DOWNWARD, J.; Y. YARDEN; E. MAYES; G. SCRACE; N. TOTTY; P. STOCKWELL; A. ULLRICH; J. SCHLESSINGER y D. M. WATERFIELD (1984). *Close similarity of Epidermal Growth Factor Receptor and V-erb-B oncogene protein sequence*. Nature **307**: 521-527.
- DULBECCO, R. (1970). *Top inhibition and serum requirement of transformed and untransformed cells*. Nature **227**: 802-806.
- HELDIN, C. H. y B. WESTERMARK (1984). *Growth Factors: Mechanism of action and relation to oncogenes*. Cell **37**: 9-20.
- HUNTER, W. M. y F. C. GREENWOOD (1952). *Preparation of Iodine 131 labelled Human Growth Hormone of high specific activity*. Nature **194**: 495-496.
- JOHNSON, L. K.; J. D. BAXTER; I. VLODAVSKY y D. GOSPODAROWICZ (1980). *Epidermal Growth Factor and the expression of specific genes: Effects on cultured rat pituitary cells are dissociable from the mitogenic response*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA **77**: 394-398.
- KAPLAN, P. L.; W. C. TOPP y B. OZANNE (1981). *Transforming growth factors production enables cells to grow in the absence of serum: an autocrine system*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA **79**: 485-489.
- LAGE, A.; R. PEREZ; D. VALDES y J. GAVILONDO (1985). *Estudios sobre el Factor de Crecimiento Epidérmico. III. Obtención de moléculas EGF equivalentes a partir de medio condicionado de células L929*. Interferón y Biotecnología (en imprenta).
- LIBERMANN, A. T.; N. RAZON; D. A. BARTAL; Y. YARDEN; J. SCHLESSINGER y H. SOREQ (1984). *Expression of Epidermal Growth Factor Receptors in human brain tumors*. Cancer Res. **44**: 753-760.
- LIFSHITZ, A.; C. S. LAGAR; J. E. BUSS y G. N. GILL (1983). *Analysis of Morphology and Receptor Metabolism in Clonal Variant A431 Cells with differing growth response to Epidermal Growth Factor*. J. Cell. Physiol. **115**: 235-242.
- LOWRY, D. H.; N. J. ROSEBROUGH; A. L. FARR y R. J. RANDAL (1951). *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. J. Biol. Chem. **193**: 265-275.
- MACIAS, A.; R. PEREZ y A. LAGE (1985). *Estudios sobre el Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF). I. Expresión del receptor en el cáncer mamario humano*. Interferón y Biotecnología **2**: 27-40.
- MACIAS, A.; R. PEREZ y A. LAGE (1985). *Estudios sobre el Factor de Crecimiento Epidérmico. II. Desarrollo de un radioreceptor análisis para la determinación de cantidades picomolares*. Interferón y Biotecnología **2**: 115-127.
- NICKELL, K. A.; J. HALPER y H. L. MOSES (1983). *Transforming Growth Factors in solid human malignant neoplasms*. Cancer Res. **22**: 1966-1971.
- OKAMOTO, S. y T. OKA (1984). *Evidence for physiological function of Epidermal Growth Factor: Progesterone sialoadenectomy of mice decreases milk production and increases offspring mortality during lactation period*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA **81**: 6059-6063.
- PEREZ, R.; M. R. PASCUAL; A. MACIAS y A. LAGE (1984). *Epidermal Growth Factor Receptors in human breast cancer*. Breast Cancer Res. & Treat. **4**: 189-193.
- SAVAGE, C. R. y S. COHEN (1972). *Epidermal Growth Factor and a new derivative. Rapid isolation procedures and biological and chemical characterization*. J. Biol. Chem. **247**: 7609-7611.
- SCATCHARD, G. (1969). *The attraction of proteins for small molecules and ions*. Ann. N. Y. Acad. Sci. **31**: 660-672.
- SCHER, C. D.; W. J. PLEDGER; P. MARTIN; H. ANTONIADES y C. D. STILES (1978). *Transforming viruses directly reduce the cellular growth requirement for a platelet derived growth factor*. J. Cell. Physiol. **97**: 371-380.
- SCHONBRUNN, A.; M. KRFSNOFF; J. M. WESTERNDORF y A. H. TASHJIAN (1980). *Epidermal Growth Factor and Thyrotropin-releasing hormone act similarly on a clonal pituitary cell strain*. J. Cell. Biol. **85**: 786-797.
- TODARO, G. J.; J. E. DELARCO; C. FRYLING; P. A. JOHNSON y M. B. SPORN (1981). *Transforming Growth Factors (TGF's): properties and possible mechanisms of action*. J. Supramol. Struct. Mol. Biochem. **15**: 187-301.
- TONELLI, Q. J. y S. SOROF (1980). *Epidermal Growth Factor requirement for development of cultured mammary gland*. Nature **285**: 250-252.