

Efecto antitumoral del factor de crecimiento epidérmico (EGF) en carcinomas de piel humanos: reporte preliminar

R. FONSECA, J. LOMBARDERO, R. PÉREZ, S. QUINTERO, B. TORMO, A. MACÍAS, M. A. RÍOS, N. CORDIES, F. FONT, V. LEÓN, M. PUIG, O. AGUILAR, C. RODRÍGUEZ y A. LAGE

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

Recibido en julio de 1988

RESUMEN

El factor de crecimiento epidérmico (EGF), es un polipéptido mitogénico para células de origen epitelial y mesenquimatoso; sin embargo, tiene un efecto inhibitorio de la proliferación *in vitro* de las células que tienen un número muy elevado de receptores de EGF en su superficie. Resultados precedentes de nuestro laboratorio demostraron que este efecto inhibitorio también puede obtenerse *in vivo*, en tumores humanos creciendo como xenotransplantes en ratones atímicos.

En este artículo presentamos las primeras evidencias clínicas del efecto del EGF en carcinomas humanos.

Se trataron 10 carcinomas de piel (9 pacientes) mediante la aplicación diaria tópica de una crema que contenía 10 $\mu\text{g/g}$ de EGF humano recombinante.

Durante las tres semanas de tratamiento no se obtuvo ninguna evidencia de progresión tumoral, al contrario, la mitad de las lesiones mostraron una respuesta objetiva favorable. Cuatro pacientes refirieron mejoría subjetiva intensa, dada por alivio del dolor y recuperación funcional de las estructuras afectadas por el tumor. En cuatro pacientes se registraron notables cambios histológicos, dados por una disminución en la proporción de células tumorales en el tejido, un aumento en la reacción estromal y la aparición de infiltrado inflamatorio.

La ampliación del concepto de hormono-dependencia, para incluir la regulación de tumores por factores de crecimiento, implica como corolario la aplicación del campo de la terapia hormonal, para incluir el tratamiento con factores de crecimiento o sus análogos. Estos resultados preliminares son la primera evidencia de que estos conceptos pueden ser aplicables en la clínica.

SUMMARY

Epidermal growth factor (EGF), a mitogenic polypeptide for epithelial and mesenchymal cells, has been shown to be inhibitory for proliferation *in vitro* of cells containing high amounts of EGF receptors. Previous results from our laboratory have shown this inhibitory effect can also be obtained *in vivo*, in human tumors growing as xenografts in nude mice.

In the present paper we show the first clinical evidence of the effect of EGF in human carcinomas. Ten advanced skin carcinomas, (9 patients) already resistant to conventional treatments, have been treated by daily topical applications of a cream containing human recombinant EGF (10 $\mu\text{g/g}$) during three weeks. No evidence of tumor progression was found in any patient. Half of the lesions showed an intense objective clinical response. Four patients referred intense subjective improvement as shown by pain relief and functional recovery of involved structures. In six patients, major histological changes were seen, given by a decrease in tumor cellularity, and enhancement of stromal reaction and inflammatory infiltration.

The enlarged hormone-dependence concept (to include growth factor regulation) implies as a corollary the enlargement of the field of hormone-therapy to include treatment with growth factors and related molecules. These preliminary results are the first evidence that these concepts can be operative in the clinical setting.

INTRODUCCION

El factor de crecimiento epidérmico (EGF) es un péptido de 53 aa, obtenido originalmente de glándulas submaxilares de ratón (Cohen, 1962; Savage *et al.*, 1972), y purificado posteriormente de la orina humana (Cohen y Carpenter, 1975). El EGF es una molécula ubicua, y al igual que otros factores de crecimiento y a diferencia de las hormonas clásicas, su producción parece ser sistémica y su acción paracrina (Gospodarowicz y Morán, 1976; Carpenter y Cohen, 1979).

Esta molécula presenta una gran conservación evolutiva; existe más del 70% de homología estructural entre el EGF humano y el murino (EGFh y EGFm).

El EGF tiene una potente actividad mitogénica *in vitro* sobre células de origen ectodérmico y mesodérmico (Carpenter y Cohen, 1981), sin embargo sus funciones fisiológicas están insuficientemente esclarecidas. El EGF ejerce su acción a través de un receptor específico de alta afinidad presente en la membrana celular, cuyo gen ha sido recientemente clonado y completamente secuenciado, mostrando una alta homología estructural con el producto del oncogen v-erbB (Downward *et al.*, 1984).

El gen del receptor del EGF está amplificado en la mayoría de los carcinomas humanos de células escamosas (Cowley *et al.*, 1984; Merlino *et al.*, 1984; Yamamoto *et al.*, 1986), lo que pudiera constituir una vía para escapar al control del crecimiento. Nosotros también hemos demostrado que la expresión del receptor de EGF (R-EGF) en el cáncer mamario humano está asociado a la malignidad del tumor (Pérez *et al.*, 1984; Macías *et al.*, 1986; Skoog *et al.*, 1986; Macías *et al.*, 1987; Ríos *et al.*, 1988).

Algunos autores han sugerido que el R-EGF pudiera constituir un blanco específico para la terapéutica con anticuerpos monoclonales (Masui *et al.*, 1984; Mendelsohn *et al.*, 1985; Masui *et al.* 1986).

Existen suficientes evidencia experimentales de que concentraciones no fisiológicas de EGF pueden inhibir el crecimiento celular *in vitro* de líneas celulares de cáncer humano que contienen una alta cantidad de sitios receptores de EGF (más de $1 \cdot 10^6$ sitios por células) (Gill y Lazar, 1981; Kawamoto *et al.*, 1984; Kamata *et al.*, 1986; Filmus *et al.*, 1987). También hemos reportado previamente que la administración subcutánea de dosis farmacológicas de EGF inhiben la incorporación de 3H-timidina en células del tumor ascítico de Ehrlich *in vivo* (Lombardero *et al.*, 1986). Resultados recientes de nuestro laboratorio también demuestran que el EGFh recombinante, en dosis de 20 mg/kg de peso, es capaz de producir una inhibición transitoria del crecimiento de dos carcinomas epidermoides transplantados en ratones atímicos (en proceso de publicación).

Estos resultados experimentales, y los resultados satisfactorios obtenidos con la aplicación tópica del EGFh recombinante en proceso de cicatrización en pacientes (enviado para su publicación) nos condujo a iniciar un ensayo clínico piloto en carcinomas de piel. En el presente trabajo se muestran las evidencias preliminares que sugieren que el EGFh recombinante posee una actividad anti-tumoral.

MATERIALES Y METODOS

Materiales

El EGFh recombinante fue obtenido en colaboración con el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de La Habana; los detalles acerca de su obtención, purificación y caracterización han sido presentados previamente (Lombardero *et al.*, 1988). La forma terapéutica utilizada fue una crema de sulfadiazina de plata al 1% que contiene 10 µg/g de EGFh recombinante.

El anticuerpo monoclonal R1 anti-R-EGF fue obtenido de Amersham. Otros dos anticuerpos monoclonales contra el R-EGF de placenta humana, obtenidos en nuestro laboratorio (en proceso de publicación) fueron también utilizados para la determinación inmunohistoquímica del R-EGF.

Pacientes

Diez carcinomas de piel avanzados fueron incluidos en este ensayo clínico piloto. Todos estos pacientes habían recibido previamente la terapia convencional, y ya no eran tributarios de ningún tratamiento establecido. Ningún paciente había recibido tratamiento oncoespecífico, al menos durante cuatro semanas antes de iniciar este ensayo. En todos los casos expresaron su deseo de ser sometidos a este nuevo tratamiento.

Esquema de tratamiento

La administración tópica de una crema de sulfadiazina de plata al 1% conteniendo 10 µg/g de EGFh recombinante, fue realizada diariamente luego de una *toilette* de la lesión tumoral, durante tres semanas.

Criterios de evaluación

Cuatro bloques de evidencias se tomaron en cuenta: 1) respuesta clínica objetiva medible, en términos de remisión total, remisión parcial, estabilización y progresión; 2) respuesta clínica objetiva evaluable, es decir, los cambios morfológicos macroscópicos de la lesión; 3) respuesta clínica subjetiva, evaluada por disminución del dolor y recuperabilidad funcional de estructuras relacionadas con la lesión; 4) criterios anatomopatológicos.

Se tomaron biopsias antes y después de las tres semanas de tratamiento, aproximadamente en el mismo lugar de la lesión, evaluándose comparativamente en todos los casos las alteraciones fenotípicas de las células tumorales, la relación entre el componente estromal y la abundancia de células tumorales, y la infiltración inflamatoria.

Determinación histoquímica del R-EGF

Fueron utilizados cortes por criostato para la inmunotinción con los anticuerpos monoclonales anti-R-EGF. Un segundo anticuerpo anti-ratón biotinilado y el complejo estreptavidina-peroxidasa fueron utilizados como sistema de detección (Amersham, U.K.) (Hsu *et al.*, 1981).

RESULTADOS

En la tabla 1 se resumen los principales resultados obtenidos. Todos los carcinomas epidermoides estudiados mostraron una alta expresión del R-EGF, de acuerdo con la inmunotinción con tres anticuerpos monoclonales independientes contra el R-EGF. No se encontraron diferencias en la expresión del R-EGF en las biopsias pre y postratamiento. Por el contrario, en los dos carcinomas basales incluidos en esta serie se encontró una reacción ligera o nula con los anticuerpos monoclonales anti-R-EGF.

Luego de tres semanas de tratamiento tópico con EGFh recombinante, obtuvimos dos remisiones parciales. Las otras lesiones tumorales pudieron ser evaluadas como estables en términos de respuesta clínica objetiva medible. Durante este tratamiento no se encontraron evidencias de progresión de las lesiones tratadas.

TABLA 1

Pacientes	Tipo Hist.	Expresión R-EGF	Criterios de actividad antitumoral			
			Obj. med.	Respuesta clínica		Criterios Anat. pat.
				Obj. ev.	Subj.	
FSS	CEQBD	+++	ESTAB.	+++	+++	+++
TTP	CEQMD	++/+++	RP	+++	NE	+++
RTR	CEQMD	+++	ESTAB.	+++	+++	++
ABP	CEQMD	+++	RP	+++	NE	+++
ABP*	CBS	-	ESTAB.	+	+	++
JMP	CEQBD	+++	ESTAB.	+	NE	+++
CSC	CEQBD	+++	ESTAB.	++	+++	NR
RPN	CEQBD	+++	ESTAB.	+	++	+
EVO	CEQBD	+++	ESTAB.	+++	+++	+++
SCV	CBS	+	ESTAB.	++	NE	+++

* Un paciente tuvo dos lesiones diferentes independientes.

CEQBD: Carcinoma epidermoide queratinizante bien diferenciado.

CEQMD: Carcinoma epidermoide queratinizante moderadamente diferenciado.

CBS: Carcinoma basal sólido.

ESTAB: Estabilización.

RP: Remisión parcial.

NE: No evaluable.

NR: No realizado.

+++ : Intenso

++ : Moderado

+: Pobre

En la figura 1 se muestra uno de los pacientes que hizo remisión parcial. Como puede apreciarse en las fotografías, las lesiones tumorales fueron casi completamente reepitelizadas.

Por otra parte, el 50% de los pacientes mostraron una respuesta clínica objetiva evaluable intensa. Fue observado un cambio dramático favorable en la morfología macroscópica de estas lesiones, es decir, el tejido friable, sangrante y protuberante, después del tratamiento se aplana, endurece, deja de sangrar y cambia de coloración (tabla 1).

El 40% de los pacientes mostró una respuesta clínica subjetiva intensa (tabla 1). La disminución del dolor fue referida por estos pacientes, y en dos casos fue lograda una recuperación funcional de estructuras afectadas por la lesión. En el caso del paciente RTR se logró una recuperación del movimiento de los dedos del pie, y en el caso del paciente ABP, con un carcinoma basal infiltrando el globo ocular, se obtuvo una recuperación parcial del movimiento del ojo y del párpado correspondiente.

Desde el punto de vista anatomopatológico, también se obtuvieron evidencias de un efecto biológico del EGFh recombinante sobre los carcinomas humanos de piel. Seis de nueve pacientes evaluados mostraron una respuesta intensa en términos de una alteración de la morfología de las células tumorales y un aumento del tejido estromal y de la reacción inflamatoria. En la figura 2 se muestra un ejemplo típico.

En la biopsia pretratamiento se observaron abundantes células tumorales con un estroma escaso y laxo, y sin infiltrado inflamatorio (figuras 2a y 2b). Por el contrario, después de tres semanas de tratamiento se encontró una mayor proporción de tejido estromal con respecto a las células tumorales observadas, así como un rico infiltrado inflamatorio, fundamentalmente compuesto por linfocitos y neutrófilos (figuras 2c-2f).

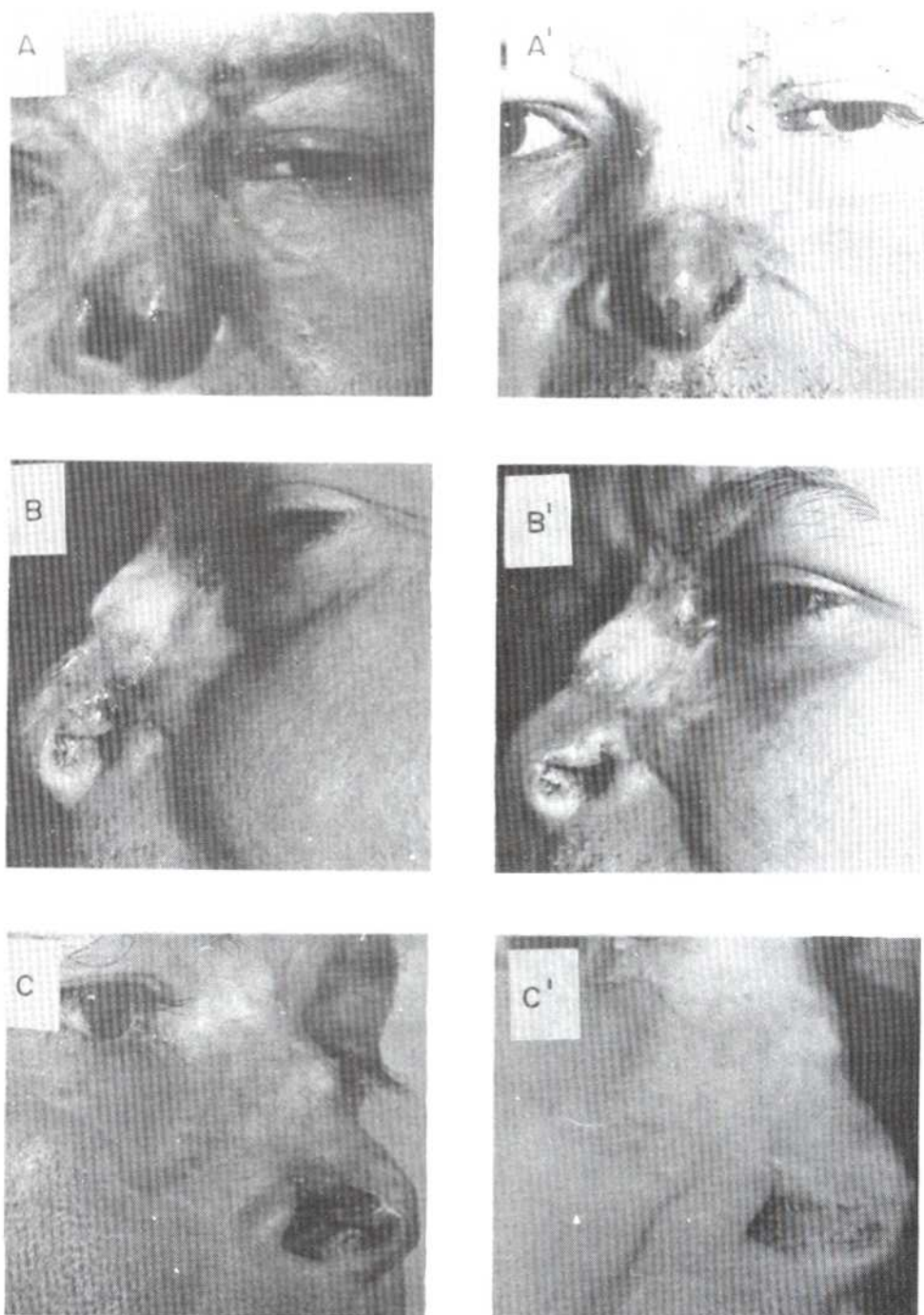


FIG. 1. Paciente (TTP) con remisión parcial. A, B y C: antes del tratamiento; A', B' y C' después de tres semanas de tratamiento.

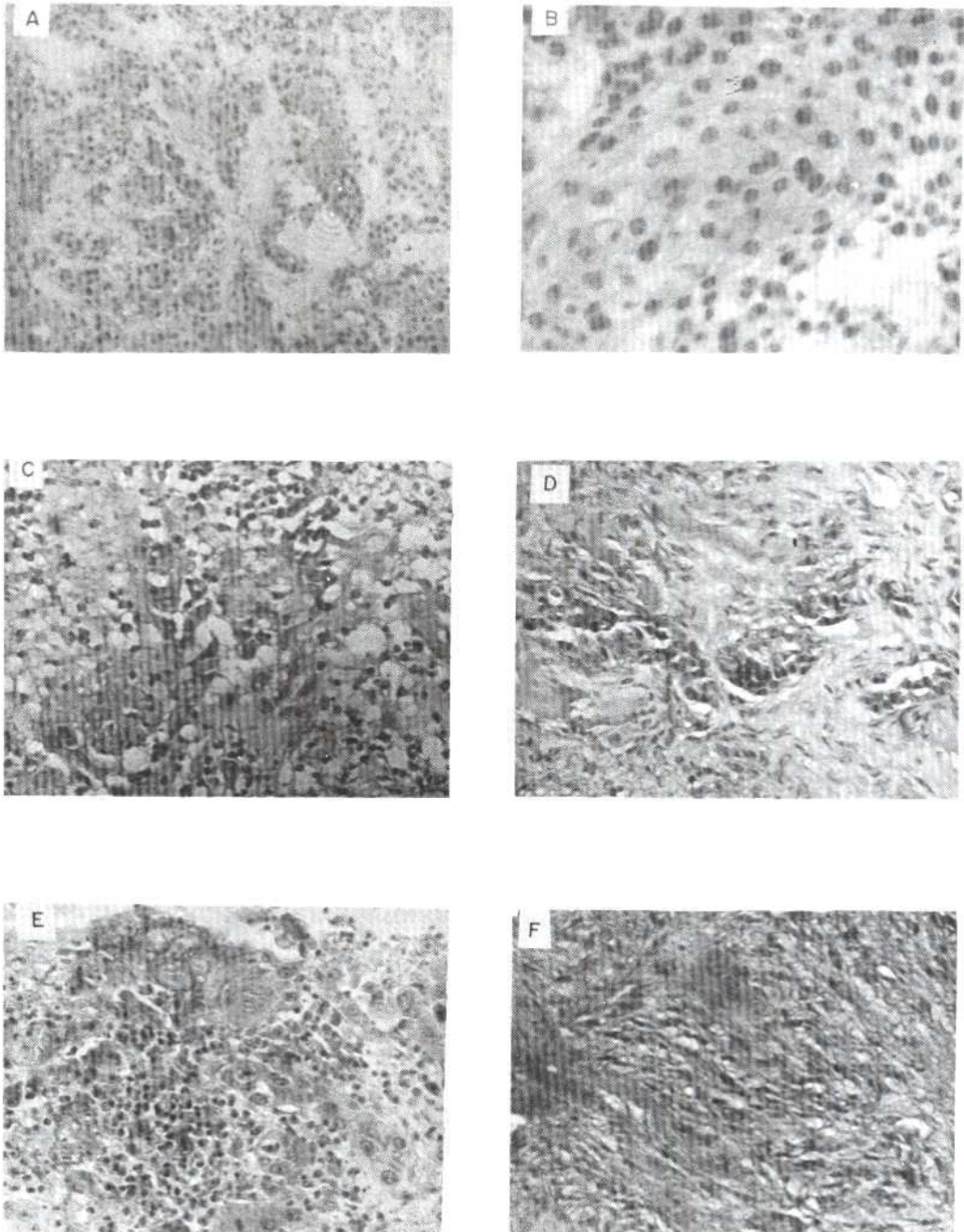


FIG. 2. Evidencias anatomopatológicas de la actividad antitumoral del EGFh recombinante: *A y B*) biopsias antes del tratamiento; *C-F*) biopsias después de tres semanas de tratamiento. *A*: células tumorales abundantes, estroma escaso y laxo, 10x; *B*: idem, 25x; *D*: abundante estroma rodeando las células tumorales, 25x; *E*: infiltrado inflamatorio rodeando las células tumorales, 25x; *F*: fuerte reacción estromal, 25x.

Pudieron ser distinguidos nidos de células tumorales apesadas por tejidos estromal y grupos de células tumorales rodeadas por linfocitos y neutrófilos.

DISCUSION

Nosotros presentamos en este trabajo los primeros datos clínicos que sugieren que el EGFh recombinante puede poseer una actividad antitumoral. El objetivo de este ensayo clínico piloto fue el de encontrar algún efecto biológico del EGFh recombinante sobre los carcinomas de células escamosas, por tanto, hemos seleccionado los carcinomas de piel como un modelo por dos ventajas fundamentales: primero, estos pacientes podían ser sometidos a un seguimiento clínico constante, y segundo, estas lesiones tumorales permitían una administración tópica de la molécula, lo que nos aseguraba una concentración farmacológica *in situ*. De hecho, nosotros obtuvimos evidencias inmunohistoquímicas de la penetración EGFh recombinante en las células tumorales mediante anticuerpos monoclonales anti-EGFh (datos no mostrados).

Tomando en consideración todos estos resultados en conjunto, es decir, las respuestas clínicas objetivas, tanto evaluables como medibles, las respuestas clínicas subjetivas y los criterios anatomopatológicos, nosotros concluimos que la forma medicamentosa de EGFh recombinante usada posee una actividad antitumoral en los carcinomas epidermoides de piel.

Al parecer, esta actividad antitumoral pudiera ser ocasionada por un efecto de inhibición de las células tumorales, o por una estimulación de la reparación del tejido normal, que a su vez podría afectar también el crecimiento de las células tumorales. De acuerdo con esta hipótesis, el EGFh podría actuar como un modificador de la respuesta biológica, capaz de inhibir el crecimiento tumoral a través de la modificación de la interacción tumor-organismo. Los efectos biológicos del EGFh recombinante encontrados en carcinomas de células escamosas, están de acuerdo con la hipótesis de que altas concentraciones de EGF pueden inhibir el crecimiento de células tumorales que expresen un alto número de sitios receptores de EGF (Gill y Lazar, 1981; Kawamoto *et al.*, 1984; Kamata *et al.*, 1986; Filmus *et al.*, 1987). Por el contrario, en los carcinomas de células basales, aunque sólo tenemos dos pacientes hasta el presente, no está clara la naturaleza de la respuesta biológica encontrada. Algunos criterios morfológicos preliminares de inducción de diferenciación en las células tumorales son prometedores.

Estos pacientes continúan bajo tratamiento, y el seguimiento y la evaluación de ellos a largo plazo se impone. Es importante llegar a determinar en qué condiciones es posible llegar a obtener remisiones completas y cuán estables serían estas respuestas una vez suspendido el tratamiento.

Desde hace algunos años nosotros hemos venido estudiando la expresión del R-EGF en el cáncer mamario humano (Pérez *et al.*, 1984; Macías *et al.*, 1986; Skoog *et al.*, 1986; Macías *et al.*, 1987; Ríos *et al.*, 1988), lo que nos ha permitido sugerir que el EGFh puede desempeñar un rol importante en la regulación del crecimiento de los tumores humanos, ampliando de esta forma el concepto de hormono-dependencia, y por tanto, las posibilidades de hormonoterapia. Estos resultados preliminares pueden constituir el inicio de una nueva vía en la bioterapia del cáncer.

REFERENCIAS

- CARPENTER, G. y S. COHEN (1979). *Epidermal growth factor*. Ann. Rev. Biochem. 48: 193-216.
CARPENTER, G. Y S. COHEN (1981). "EGF-receptor interactions and the stimulation of cell growth", en: *Receptor Regulation* (Series B), vol. 13, Lefkowitz, Ed., Chapman and Hall, p. 41.

- COHEN, S. (1962). *Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal*. J. Biol. Chem. 237: 1555-1562.
- COHEN, S. y G. CARPENTER (1975). *Human epidermal growth factor. Isolation and chemical and biological properties*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72: 1317-1321.
- COWLEY, G.; J. A. SMITH; B. GUSTERSON; F. HENDLOR y B. OZANNE (1984). "The amount of EGF receptor is elevated on squamous cell carcinomas", en: J. L. Arnold, G. F. Van de Woude, W. C. Topp y J. D. Watson (eds.) *Cancer Cell 1*, pp. 5-10. Cold Spring Harbor Laboratory.
- DOWNWARD, J.; Y. YARDEN; E. MAYES; G. SCRACE; N. TOFFY; P. STOCKWELL; A. ULLRICH; J. SCHLESSINGER y M. D. WATERFIELD (1984). *Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erbB oncogen protein sequence*. Nature 307: 521-527.
- FILMUS, J.; J. M. TRENT; M. N. POLLAK y R. N. BUICK (1987). *Epidermal growth factor receptor gene-amplified MDA-468 breast cancer cell line and its non amplified variants*. Molecular and Cellular Biology 7: 251-157.
- GILL, G. N. y C. S. LAZAR (1981). *Increased phosphotyrosine content and inhibition of proliferation in EGF-treated A431 cells*. Nature 293: 305-307.
- GOSPODAROWICZ, D. y J. S. MORAN (1976). *Growth factors in mammalian cell culture*. Ann. Rev. Biochem. 45: 531-558.
- HSU, S. M.; L. RAINE y H. FANGER (1981). *Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures*. J. Histochem. Cytochem. 29: 577-580
- KAMATA, N.; K. CHIDA; K. RIKIMARU; M. HORIKOSHI; S. ENOMOTO y T. KUROKI (1986). *Growth inhibitory effects of epidermal growth factor and over expression of its receptors on human squamous cell carcinomas in culture*. Cancer Res. 46: 1648-1653.
- KAWAMOTO, T.; J. MENDELSON; A. LE; G. H. SATO; C. S. LAZAR y G. N. GILL (1984). *Relation of epidermal growth factor receptor concentration to growth of human epidermoid carcinoma A431 cells*. J. Biol. Chem. 259: 7761-7766.
- LOMBARDERO, J.; R. PEREZ y A. LAGE (1986). *Epidermal growth factor inhibitors thymidine incorporation in Ehrlich ascites tumor cell in vivo*. Neoplasma 33: 423-429.
- LOMBARDERO, J.; A. M. CINZA; M. QUINTANA; R. PEREZ y A. LAGE (1988). *Purificación del factor de crecimiento epidérmico humano recombinante: estrategia del escalado de la producción*. Revista CENIC 19: 102.
- MACIAS, A.; E. AZAVEDO; R. PEREZ; E. L. RUTQUIST y L. SKOOG (1986). *Receptors for epidermal growth factor in human mammary carcinomas and their metastases*. Anticancer Res. 6: 849-852.
- MACIAS, A.; E. AZAVEDO; T. HAGERSTROM; C. KLINTENBERG; R. PEREZ y L. SKOOG (1987). *Prognostic significance of the receptor of epidermal growth factor in human mammary carcinomas*. Anticancer Res. 7: 459-464.
- MASUI, H.; T. KAWAMOTO; J. D. SATO; B. WOLF; G. SATO y J. MENDELSON (1984). *Growth inhibition of human tumor cells in athymic mice by anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody*. Cancer Res. 44: 1002-1007.
- MASUI, H.; T. MOROYAMA y J. MENDELSON (1986). *Mechanism of anti-tumor activity in mice for anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies with different isotypes*. Cancer Res. 46: 5592-5598.
- MENDELSON, J.; H. MASUI y C. MACLEOD (1985). *Anti-EGF receptor monoclonal antibody inhibits proliferation of a subset of human tumor cell in culture and xenografts*. Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 26: 287-294.
- MERLINO, G. T.; Y. H. XU; S. ISHII; A. J. L. CLARK; K. SEMBA; K. TOYOSHIMA; T. YAMAMOTO e I. PASTAN (1984). *Amplification and enhanced expression of the epidermal growth factor receptor gene in A431 human carcinoma cells*. Science 224: 417-419.
- PEREZ, R.; M. R. PASCUAL; A. MACIAS y A. LAGE (1984). *Epidermal growth factor receptors in human breast cancer*. Breast Cancer Res. and Treat. 4: 189-193.
- RIOS, M. A.; A. MACIAS; R. PEREZ; A. LAGE y L. SKOOG (1988). *Receptors for epidermal growth factor and estrogen as predictors of relapse in patients with mammary carcinoma*. Anticancer Res. 8: 173-176.
- SAVAGE, C. R.; T. INIGAMI y S. COHEN (1972). *The primary structure of epidermal growth factor*. J. Biol. Chem. 247: 7612-7621.
- SKOOG, L.; A. MACIAS; E. AZAVEDO; J. LOMBARDERO y C. KLINTENBERG (1986). *Receptors for EGF and estradiol and thymidine kinase activity in different histological subgroups of human mammary carcinomas*. Br. J. Cancer 54: 271-276.
- YAMAMOTO, T.; N. KAMATA; H. KAWANO; S. SHIMIZU; T. KUROKI; K. TOYOSHIMA; K. RIKIMARU; N. NOMURA; R. ISHIZAKI; I. PASTAN; S. GAMOU y N. SHIMIZU (1986). *High incidence of amplification of the epidermal growth factor receptor gene in human squamous carcinoma cell lines*. Cancer Res. 46: 414-416.