

## Estudios sobre el factor de crecimiento epidérmico.

### V. Biodistribución en ratones normales y portadores de tumores

C. MATEO DE ACOSTA, E. JUSTIZ y A. LAGE

Instituto Nacional de Oncología y Radiobiología, 29 y F Vedado, La Habana, Cuba.

*Recibido en enero de 1989*

*Aprobado en mayo de 1989*

#### RESUMEN

El factor de crecimiento epidérmico (EGF) y su receptor (EGF-R) son de gran interés actualmente por su rol en la tumorigénesis, pues se ha demostrado la presencia de altos niveles de receptores de EGF en algunos tumores humanos y en nódulos metastásicos, así como que su expresión es índice de mal pronóstico.

En este trabajo se estudia la biodistribución del  $^{131}\text{I}$ -EGF por inyección subcutánea en ratones normales, obteniéndose que el EGF circuló rápidamente y se acumuló en hígado, piel, riñón y glándula submaxilar fundamentalmente, con un tiempo de vida media de aproximadamente una hora, siendo eliminado por la orina.

La acumulación del EGF fue dependiente de su habilidad para reconocer a los receptores específicos.

En ratones portadores de tumores, la biodistribución se comporta dependiendo de la expresión de los receptores del EGF en el tumor.

#### SUMMARY

Epidermal growth factor (EGF) and his receptor (EGF-R) are very interesting due to their role in cancer. Several tumors and metastatic nodes express high levels of EGF-R.

In this paper the  $^{131}\text{I}$ -EGF biodistribution was studied. High levels of radioactivity were observed mainly in liver, kidney, skin and submaxillary gland with a half-life time of approximately 1 hour, with clearance performed through urine.

EGF biodistribution was dependent on its ability to recognize specific membrane receptors.

In nude mice xenotransplanted the  $^{131}\text{I}$ -EGF biodistribution was dependent on the EGF-R expression in the tumor.

#### INTRODUCCION

El factor de crecimiento epidérmico (EGF) y su receptor (EGF-R) son de gran interés en la actualidad por su rol en la tumorigénesis. Se sabe que el EGF tiene un rol regulador del crecimiento de las células de carcinoma mamario de ratón (Kurachi *et al.*, 1985), e incluso, se conoce que los receptores de EGF tienen homología estructural

con el producto del oncogen v-erb B (Ulrich *et al.*, 1984). Resultados de nuestros laboratorios (Pérez *et al.*, 1984; Skood *et al.*, 1986), así como de otros (Fitzpatrick *et al.*, 1984), han demostrado que algunos tumores humanos expresan altos niveles de receptores de EGF. Un resultado interesante lo constituye el hecho de que en nódulos metastásicos hay mayor expresión de receptores de EGF que en los tumores primarios (Macías *et al.*, 1986; Sainsbury *et al.* 1986; Liberman, 1984), así como que su expresión indica probablemente un mal pronóstico (Macías *et al.*, 1987).

La alta expresión de receptores de EGF en los tumores menos diferenciados ofrece la posibilidad del uso del EGF como transportador de radionúclidos, drogas o toxinas. Nosotros demostramos recientemente que el EGF puede reducir la incorporación de timidina en células tumorales *in vivo* (Lombardero, 1986) y resultados similares fueron reportados por otros laboratorios en experimentos *in vitro* (Barnes, 1982; Buss *et al.*, 1982; Schonbrann, 1980).

Este resultado sugiere que altas dosis de EGF pueden ser utilizadas para inhibir la proliferación celular en tumores con receptores de EGF. Considerando lo anterior, el uso del EGF *in vivo* requiere un previo conocimiento de su biodistribución.

En el presente trabajo se muestran los resultados de la biodistribución del  $^{131}\text{I}$ -EGF en ratones normales, en ratones portadores de carcinoma de pulmón y en ratones desnudos portadores de xenotrasplantes de células de carcinoma humano A431 (tabla 1).

Tabla 1  
BIODISTRIBUCION EN RATONES DESNUDOS PORTADORES DE TUMOR DE CELULAS A431

Organo	% DI/g	Relación tumor/órgano
Hígado	8,5 ± 3,67	0,682 ± 0,290
Riñón	22,36 ± 6,86	0,250 ± 0,076
Piel	10,67 ± 4,30	0,540 ± 0,210
Glánd. Subm.	19,02 ± 5,08	0,300 ± 0,080
Sangre	2,76 ± 0,61	0,470 ± 0,100
Pulmón	5,90 ± 0,07	2,000 ± 0,048
Tumor	5,80 ± 1,56	1,000

Acumulación tumor/órgano. Fue determinada en grupos de ratones con xenotrasplantes, los cuales fueron inyectados con  $3 \times 10^6$  células de carcinoma humano A431 (s.c.) en ratones desnudos Balb/C. Los experimentos fueron realizados el día 20 después de la implantación del tumor, cuando los ratones recibieron inyecciones (s.c.) de  $^{131}\text{I}$ -EGF. Cada animal fue sacrificado una hora después de la inyección y los órganos fueron extraídos, pesados y tomados para conteo de radioactividad. El porcentaje de DI/g fue determinado como se describe en "Materiales y Métodos".

## MATERIALES Y METODOS

### Ratones y tumores

Los experimentos fueron realizados con ratones normales de 6 a 8 semanas, del tipo IOR/Hab (Castillo, 1982). El carcinoma de pulmón RL-67 fue trasplantado por vía subcutánea en la extremidad inferior de un ratón híbrido BDF1 (C57 B<sub>1</sub>/BDA<sup>2</sup>). Los xenotrasplantes fueron obtenidos por inyección subcutánea de  $3 \times 10^6$  células de carcinoma humano (A431), en ratones desnudos BalbC hembras. Los experimentos se realizaron el día 20 después del trasplante, cuando el tumor tenía aproximadamente seis gramos de peso.

## EGF

Fue aislado de glándula submaxilar de ratón por extracción ácida, cromatografía de adsorción sobre Biogel P-10 y cromatografía de intercambio iónico en DEAE- celulosa, como describen Cohen y Savage (1972). Este procedimiento produce cantidades de EGF del orden de los miligramos y la pureza del mismo fue demostrada por cromatografía líquida de alta presión (HPLC-filtración en gel) y electroforesis en gel de acrilamida.

El EGF desnaturalizado fue obtenido por reducción de sus puentes disulfuros en 10 mM de ditiotreitolo (DTT), una hora a 60°C. El exceso de DTT y de iodoacetato se separó mediante una columna de filtración en gel de Sephadex G-25.

El EGF fue marcado con yodo radioactivo ( $^{131}\text{I}$ ), con una actividad específica de 12-25  $\mu\text{Ci}/\text{mg}$ , usando el método de la Cloramina-T, de Hunter y Greenwood (1962).

## Experimentos de biodistribución

Cada ratón fue inyectado por vía subcutánea con  $10^7$  cpm de EGF marcado con  $^{131}\text{I}$  (13,77  $\mu\text{Ci}$ , 0,055  $\mu\text{g}$ ). Se tomaron muestras de sangre a diferentes intervalos de tiempo y se sacrificaron los ratones. Se extrajeron los órganos y se contó la radioactividad incorporada a los mismos en un contador de radiaciones Gamma (LKB). Los resultados se expresaron como el porcentaje de la dosis inyectada por gramo de peso (DI/g) y la concentración absoluta de EGF en los órganos se obtuvo multiplicando este valor por la dosis administrada.

Cada punto es la media de los datos obtenidos de tres animales. El tiempo de vida media del EGF marcado, en los ratones, fue estimado por tres experimentos diferentes, ajustando los puntos experimentales en una línea recta (log. cpm contra tiempo).

## Dosimetría de la radiación

La dosis de la radiación fue estimada a partir de la biodistribución del EGF marcado, asumiendo biodistribución uniforme del isótopo en cada órgano individual. El área bajo la curva de biodistribución fue estimada de la media de tres experimentos diferentes, usando integración trapezoidal. La concentración inicial de EGF radioactivo se asumió que era de 0 % DI/g.

Las dosis de radiaciones fueron calculadas para 1000  $\mu\text{Ci}$  de EGF multiplicando  $\mu\text{Ci} \times \text{h/g}$  y por  $\text{g.Cy}/\mu\text{Ci.h}$ , el cual ha sido tabulado por el Comité Integral de Radiaciones Médicas (Dillman, 1969). En el caso del  $^{131}\text{I}$ , este valor es de 0,4165 (para el total de todas las partículas, rayos X y electrones Auger), todas las cuales son totalmente absorbidas en el órgano donde el isótopo es depositado.

Para los órganos de ratón, el componente gamma puede ser despreciado, pues esta energía es muy poco absorbida (aproximadamente se absorbe el 10 % en una esfera de 3 cm de radio).

## Determinación de receptores de EGF

Los receptores de membrana para el EGF fueron medidos en tejidos normales y tumorales. Los detalles de la técnica han sido descritos por nosotros en artículos anteriores (Pérez, 1984; Skood, 1986).

# RESULTADOS

## Biodistribución en ratones normales

Se inyectaron ratones normales por vía subcutánea con  $^{131}\text{I}$ -EGF y la radioactividad fue recuperada fundamentalmente en hígado, riñón, glándula submaxilar y piel (figura 1). Los valores más altos fueron obtenidos antes de una hora de inyectado el EGF marcado para hígado y piel, y se relacionan con el alto número de receptores de EGF presentes en dichos órganos (20-40 fmoles/mg proteína).

En el riñón no se han detectado receptores de EGF y la acumulación en él puede ser a causa de la excreción urinaria de este producto. En glándula submaxilar, la máxima acumulación del  $^{131}\text{I}$ -EGF fue observada tres horas después de la inyección. El aclaramiento del EGF por los órganos mostró una curva de cinética de primer orden con tiempo de vida media aparente de una hora para el hígado y la piel, y de 2,3 horas

para la glándula submaxilar (figura 1). En el pulmón, corazón, bazo, intestino, hueso y sistema nervioso central, las cantidades acumuladas de EGF fueron despreciables. No han sido detectados receptores de EGF para estos órganos.

La biodistribución del EGF fue dependiente de su habilidad para reconocer los receptores de EGF. Cuando los ratones fueron inyectados con EGF desnaturalizado radioactivo, la radioactividad fue excretada rápidamente y pudieron ser recuperadas muy pequeñas cantidades en hígado, piel, riñón y glándula submaxilar (figura 2).

La rápida desaparición del EGF de los órganos fue seguida de una acumulación en orina, en las primeras tres horas después de la excreción (datos no mostrados).

### Biodistribución en animales portadores de tumores

La biodistribución de esta molécula en animales portadores de carcinoma de pulmón RL-67, fue muy similar a la de los patrones normales. Este tumor no acumula cantidades significativas de EGF, lo cual es coherente con el hecho de que el mismo tiene bajo contenido de receptores para el EGF (8,7 fmoles/mg proteína) (figura 3).

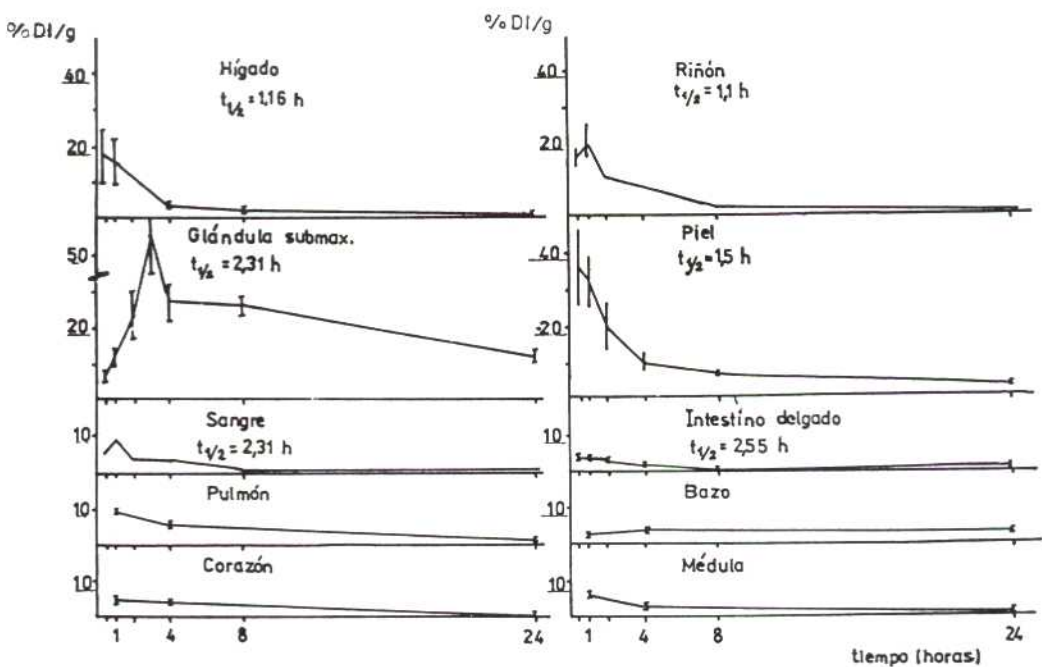


FIG. 1. Biodistribución en ratones normales. Grupos de ratones IOR/Hab recibieron inyección (s.c.) de  $^{131}\text{I}$ -EGF. Cada ratón fue sacrificado a intervalos de tiempos diferentes después de la inyección y los tejidos fueron extraídos, pesados y contada la radioactividad incorporada a los mismos. Las ordenadas representan la media de los porcentajes de la dosis inyectada por gramo de tejido (% DI/g). Las barras muestran las desviaciones estándares. Los datos son el resultado de tres experimentos por separado. La abscisa representa el tiempo en horas.

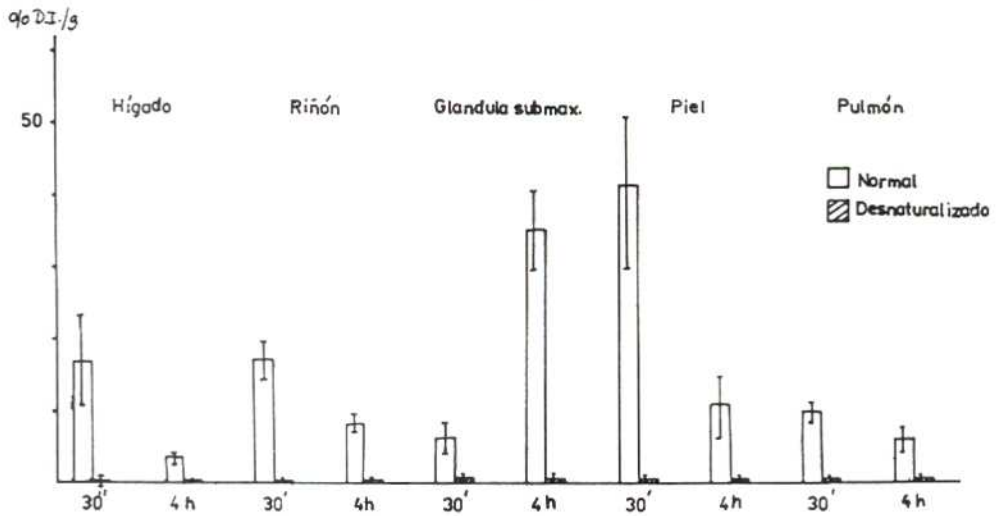


FIG. 2. Especificidad de la biodistribución. Grupos de ratones IOR/Hab recibieron una inyección subcutánea de  $^{125}\text{I}$ -EGF (columna en blanco) y EGF desnaturalizado marcado con  $^{125}\text{I}$  (columna en negro). Cada ratón fue sacrificado a los 30 min y 4 h después de la inyección y los tejidos se extrajeron, se pesaron y se les contó la radioactividad incorporada. La ordenada representa la media de los porcentajes de la dosis inyectada por gramo de tejido (% DI/g) de tres experimentos por separado. Las barras muestran las desviaciones estándares. La abscisa representa el tiempo en horas.

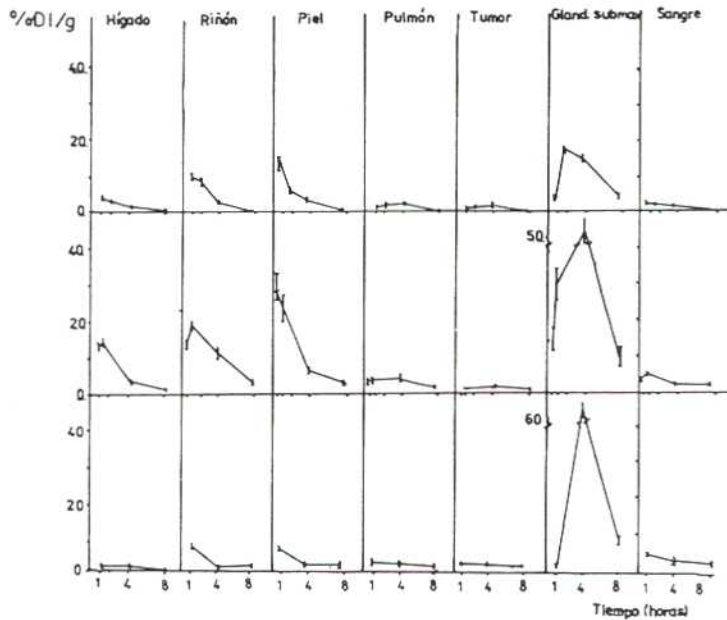


FIG. 3. Biodistribución en animales portadores de tumor. El carcinoma de pulmón fue trasplantado por vía subcutánea en la pata de los ratones BDF-1. Grupos de estos ratones recibieron una inyección (s.c.) de  $^{125}\text{I}$ -EGF después de 7, 15, y 25 días de la inoculación del tumor. Cada ratón fue sacrificado a los diferentes tiempos y los órganos fueron extraídos, pesados y tomados para conteo de radioactividad. La ordenada representa la media de los porcentajes de dosis inyectada por gramo de tejido (% DI/g). Las barras representan las desviaciones estándares y la abscisa el tiempo en horas.

## DISCUSION

En un artículo anterior mostramos que el EGF inyectado a ratones por la vía intraperitoneal, es eliminado en menos de una hora. Cuando se inyectó por vía subcutánea, entre 1 y 5 % de la dosis total permaneció en la cavidad intraperitoneal por lo menos ocho horas. De acuerdo con esto, la ruta subcutánea fue la seleccionada para los experimentos *in vivo* (Lombardero *et al.*, 1986).

Se mostró en detalle el estudio de la biodistribución del EGF inyectado por vía subcutánea en ratones normales y portadores de tumores. El EGF circuló rápidamente y se acumuló en hígado, piel, riñón y glándula submaxilar: En otros órganos la captación fue despreciable. La eliminación de EGF desde los órganos tuvo un tiempo de vida media aproximado de una hora y fue eliminado mediante la orina. Este patrón de biodistribución es dependiente de la habilidad del EGF para reconocer sus receptores específicos.

El carcinoma trasplantable de poca cantidad de receptores para el EGF también acumuló poca cantidad de EGF marcado durante tres tiempos de evolución del tumor. Usando xenotrasplantes con células de A431 que tienen dos veces más sitios receptores que el hígado, la acumulación de EGF en el tumor aumentó, pero sin lograr relaciones de acumulación de EGF radioactivo tumor/hígado favorables. Probablemente la vascularización del tumor limita la acumulación del EGF en este órgano.

La dosis de radioactividad necesaria para destruir el tumor puede ser lograda solo a expensas de dosis inaceptables para el hígado. Esto significa que el EGF usado en este experimento no fue un buen transportador de radionúclidos para fines terapéuticos. El mismo razonamiento puede ser considerado válido en moléculas híbridas entre EGF y toxinas.

La probabilidad de éxito utilizando el EGF como transportador de dichas moléculas puede ser incrementada por la unión del EGF a citostáticos dependientes de la proliferación celular como la adriamicina o metotrexate, o aprovechando el efecto propio del EGF en células con alto contenido de receptores. Actualmente exploramos estas posibilidades.

## REFERENCIAS

- BARNES, D.W. (1982). *Epidermal growth factor inhibits growth of A431 epidermoid carcinoma in serum-free cell culture*. J. Cell Bio. 93: 1-4.
- BUSS, J.E.; J.E. KIDLOW; C.S. LAZER y G.N. GELL (1982). *Altered Epidermal Growth Factor, stimulated protein kinase activity in variant A431 cells with altered growth response to epidermal growth factor*. Proc. Natl. Acad. Sci. 79: 2574-2578.
- CASTILLO, R. (1982). *New inbred strain: IOR-Hab*. Mouse New Letter 67: 14-17.
- DILLMAN, L.T. (1969). *Radionuclide decay schemes and nuclear parameters for use in radiation-dose estimation*. MIRD Pamphlet No. 4, The Society of Nuclear Medicine.
- FITZPATRICK, S.; J. BRIGTHWELL; J. WITLIFF; G. BARROWS y G. SCHULTZ (1984). *EGF binding by breast tumor biopsies and relationships to estrogen and progesterin receptor*. Cancer Res. 44: 3448-3453.
- HUNTER, W.M. y F. GREENWOOD (1962). *Preparation of iodine-131 labelled human growth hormones of high specific activity*. Nature, 194: 495-498.
- KURACHI, H. y S.O.T. OKAMOTO (1985). *Evidence for the involvement of the submaxillary gland epidermal growth factor in mouse-mammary tumor genesis*. Proc. Natl. Acad. Sci. 82: 5940-5943.
- LIBERMAN, T.A.; N. RAZON; D. BARTAL; Y. YARDEN; J. SCHLESSINGE y H. SAREG (1984). *Expression of epidermal growth factor receptors in human brain tumor*. Cancer Research, 44: 753-760.
- LOMBARDERO, J.; R. PEREZ y A. LAGE (1986). *Epidermal growth factor inhibits thymidine incorporation in Ehrlich ascitis tumor cells in vivo*. Neoplasma 33: 423-429.

- MACIAS, A.; E. AZAVEDO; R. PEREZ; L.E. RUTQVIST y L. SKOOD (1986). *Receptors for epidermal growth factor in human mammary carcinomas and their metastasis*. *Anticancer Research* **6**: 849-851.
- PEREZ, R.; M.R. PASCUAL; A. MACIAS y A. LAGE (1984). *Epidermal growth factor receptor in human breast cancer*. *Breast Cancer Research and Treatment* **4**: 183-193.
- SAINSBURY, J.R.; J.R. FARNDOM; G.V. SHIBERT y A.L. HARRIS (1986). *Epidermal growth factor receptors and estrogen receptors in human breast cancer*. *Lancet* **1**: 364-366.
- SAVAGE, R. y S. COHEN (1972). *Epidermal growth factor and a new derivat*. *Rapid isolation procedures and biological and chemical characterization*. *J. Biol. Chem.* **24**: 7609-7612.
- SCHONBRANN, A.; M. KRESNOFF; J. M. WESTENDORF y A.H. TASHIJIAN (1980). *Epidermal growth factor and Thyrotropin-releasing hormone act similarly on a clonal pituitary cell strain*. *J. Cell. Biol.* **85**: 786-797.
- SKOOD, L.; A. MACIAS; E. AZAVEDO; J. LOMBARDEO y C. KLINTENBERG (1986). *Receptors for epidermal growth factor and estradiol and thymidine-kinase activity in different histological subgroups of human mammary carcinoma*. *J. Cancer* **54**: 171-176.
- ULLRICH SCHLESSINGE, J. y M.D. WATERFIELD (1984). *Clase similarity of epidermal growth factor-receptor and v-erb B oncogen protein sequences*. *Nature* **307**: 521-527.