

Caracterización y expresión del factor de crecimiento transformante alfa (TGF-ALFA) en los tumores mamarios humanos

A. MACÍAS¹, R. PÉREZ¹, T. HAGESTROM² y L. SKOOG²

¹ Instituto Nacional de Oncología y Radiobiología, 29 y F, Vedado, La Habana, Cuba.

² Departamento de Patología Tumoral, Hospital Karolinska, 104-01, Estocolmo, Suecia.

Recibido en marzo de 1989

Aprobado en junio de 1989

RESUMEN

Se conoce por estudios previos en sistemas experimentales *in vitro*, que la transformación maligna se acompaña frecuentemente de la producción de péptidos análogos a factores de crecimiento, capaces de reconocer los receptores de membrana y de producir estimulación *autocrina* de la proliferación celular. Sin embargo, hasta el presente no existen datos clínicos que avalen la significación biológica de este fenómeno en los tumores humanos.

En este trabajo presentamos un estudio de la presencia de Factor de crecimiento transformante alfa (TGF- α) en tumores primarios de la mama y sus metástasis ganglionares. En el 25 % de los tumores primarios se detectó actividad TGF- α capaz de reconocer el receptor del Factor de crecimiento epidérmico (EGF) con igual afinidad que el ligando natural y no suprimida por anticuerpos anti-EGF.

La expresión de TGF- α fue más frecuente (50 %) en las metástasis ganglionares. La expresión de TGF- α se asocia significativamente a la expresión de receptores de EGF, lo cual apoya la hipótesis del papel de estas moléculas en la estimulación *autocrina* del crecimiento de estas neoplasias.

SUMMARY

It is known that in several experimental systems, malignant transformation *in vitro* is accompanied by the production and release of peptides analogues to Growth Factors and able to bind Growth Factors receptors and to elicit an autocrine stimulation of cell proliferation. However, until now there is no clinical evidence supporting the relevance of this fact for tumor growth in humans.

In this paper we present a study of the presence of Transforming Growth Factors Alpha (TGF) in primary human breast tumors and their lymph node metastasis.

In about 25 % of primary tumors there is measurable TGF alpha activity, which is acid extracted, able to recognize Epidermal Growth Factor (EGF) receptors with the same affinity as EGF, and not suppressible by anti-EGF antibodies.

TGF alpha expression is more frequent in lymph node metastasis than in primary tumors. The expression of TGF is significantly associated with the expression of EGF-receptors, which provide support to the hypothesis of the role of these molecules in the autocrine stimulation of cell proliferation in these tumors.

INTRODUCCION

Los factores de crecimiento regulan el crecimiento celular *in vitro* (Gospodarowicz *et al.*, 1976; Carpenter y Cohen, 1979, 1984; Heldin *et al.*, 1985). Ha sido demostrado en numerosos sistemas experimentales que la transformación maligna se acompaña de la producción de péptidos análogos al Factor de crecimiento epidérmico (EGF), capaces de reconocer su receptor (R-EGF) (Anzano *et al.*, 1982, 1983; De Larco *et al.*, 1980; Massague, 1983). Estos factores han sido denominados Factores de crecimiento transformantes tipo alfa (TGF- α).

El TGF- α es un polipéptido de 50 aminoácidos que presenta poca homología estructural con el EGF (De Larco y Todaro, 1978; De Larco *et al.*, 1980; Massague, 1983) y no es reconocido por anticuerpos anti-EGF (De Larco y Todaro, 1978; De Larco *et al.*, 1980; Massague, 1983). La secuencia completa de aminoácidos del TGF- α es conocida y su gen ha sido clonado en *E. coli* (Derynck *et al.*, 1984).

La producción de TGF- α por las células transformadas *in vitro* y la similitud entre el producto del oncogen *v-sis* y la cadena B del Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) han sustentado la hipótesis autocrina de estimulación del crecimiento para explicar la proliferación celular continua y autónoma de los tumores malignos (Sporn *et al.*, 1980; Heldin *et al.*, 1986).

Nosotros caracterizamos la expresión de ARNm del TGF- α en líneas celulares de cáncer de mama (Pérez *et al.*, 1987). Sin embargo, hasta el momento NO existen datos clínicos que avalen la significación biológica de la expresión de TGF- α en los tumores mamarios humanos.

MATERIALES Y METODOS

Materiales

El Factor de crecimiento epidérmico murino (EGFm) fue aislado de las glándulas submaxilares de ratones machos, según el método descrito por Savage y Cohen (Savage y Cohen, 1972). El Factor de crecimiento epidérmico humano recombinante (EGFh) fue suministrado por el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB) de La Habana.

El EGFm y el EGFh fueron radioyodados por el método de la cloramina T (Hunter y Greenwood, 1962), con una actividad específica de 150-200 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$. La producción de antisuero contra el EGFh fue realizada como ha sido previamente reportado (Starkey y Orth, 1977).

Tumores

Todos los tumores provenían de pacientes femeninas, las cuales fueron sometidas a la mastectomía radical modificada. Los tumores fueron clasificados como carcinomas invasivos. En 26 casos un ganglio linfático metastásico fue removido conjuntamente con el tumor primario durante la mastectomía.

Determinación de receptores

El receptor de estradiol (RE) se determinó en el citoplasma soluble tumoral según el método previamente reportado (Pascual *et al.*, 1983). Los valores se expresaron en fmoles/ μg ADN.

El receptor de Factor de crecimiento epidérmico (R-EGF) fue determinado a través de la unión específica del EGF- I^{125} a la fracción cruda de membrana tumoral, como ha sido previamente reportado (Pérez *et al.*, 1984; Macías *et al.*, 1985). Los valores se expresaron en fmoles/mg proteínas.

Extracción de la actividad EGF-equivalente del tejido tumoral

El tejido tumoral fue sometido a dos procedimientos de extracciones diferentes. Un grupo de 21 tumores primarios fue procesado de acuerdo con el método de extracción ácido-etanólico clásico (Roberts *et al.*, 1980).

Los tumores restantes fueron procesados utilizando un método simplificado de extracción ácida. Brevemente, los tumores fueron homogeneizados en 1 M de ácido acético (10:1 v/w). Después de 24 horas de extracción, el homogeneizado fue centrifugado a 100 000 g durante 30 minutos y el sobrenadante obtenido fue liofilizado y resuspendido en solución fosfato salina pH 7,4 (PBS). La solución obtenida ligeramente turbia fue clarificada por centrifugación.

La concentración de proteínas se estimó por el método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951).

Radioreceptor-análisis de EGF (RRA-EGF)

Un ensayo de competencia por la unión del EGF a su receptor, fue realizado usando el EGF murino- 125 como sonda y las células del tumor ascítico de Erhlich como fuente de receptor, según el método previamente reportado (Macías *et al.*, 1985).

En cada experimento fue incluida una curva estándar de desplazamiento y cada muestra estudiada fue ensayada por lo menos en 5 diluciones diferentes.

El contenido de TGF- α en la muestra se expresó como nanogramos de EGF-equivalente por miligramos de proteínas del extracto tumoral.

Radioinmunoanálisis de EGF (RIA-EGF)

Un radioinmunoanálisis homólogo para cuantificar EGFh fue realizado según el método previamente reportado, con modificaciones menores (Starkey y Orth, 1977).

En cada experimento, una curva estándar fue incluida. Cada muestra estudiada fue ensayada en al menos 5 diluciones diferentes. Como en el RRA-EGF los datos experimentales fueron ajustados por *regresión lineal* (Macías *et al.*, 1985). El límite de detección de este ensayo está por debajo de 1 ng/ml (80 pm concentración final de EGFh).

Análisis de los datos

Los porcentajes fueron comparados, utilizando el test de hipótesis para dos proporciones de grupos independientes.

RESULTADOS

Los carcinomas primarios mamarios contienen TGF-alfa

Las diluciones seriadas de los extractos ácidos-etanólicos de los carcinomas primarios de mama, producen curvas de desplazamiento paralelas en un ensayo de RRA-EGF (figura 1). La actividad medida fue expresada como nanogramos-equivalentes de EGF por miligramo de proteína en los extractos tumorales. Estas mismas diluciones fueron testadas en un RIA-EGF homólogo para el EGFh y los extractos tumorales no fueron reconocidos por el antisuero anti-EGFh. Extractos de cinco tumores diferentes que mostraron actividad equivalente de EGF, medida por RRA-EGF, fueron sometidos a análisis de tamiz molecular en cromatografía líquida de alta presión (HPLC). Esta actividad equivalente de EGF en los extractos tumorales apareció como un sólo pico con un peso molecular aparente de 6 000 dalton (figura 1).

Un análisis más detallado de esta actividad fue realizado a través de experimentos de supresión de la misma, utilizando un antisuero anti-EGFh.

La figura 2 muestra que la incubación previa durante 24 horas del EGFh con el antisuero suprime la capacidad de unión del EGFh al receptor de EGF. En la misma figura podemos observar cómo el antisuero *no* es capaz de bloquear la actividad equivalente de EGF presente en los extractos ácidos de los carcinomas mamarios.

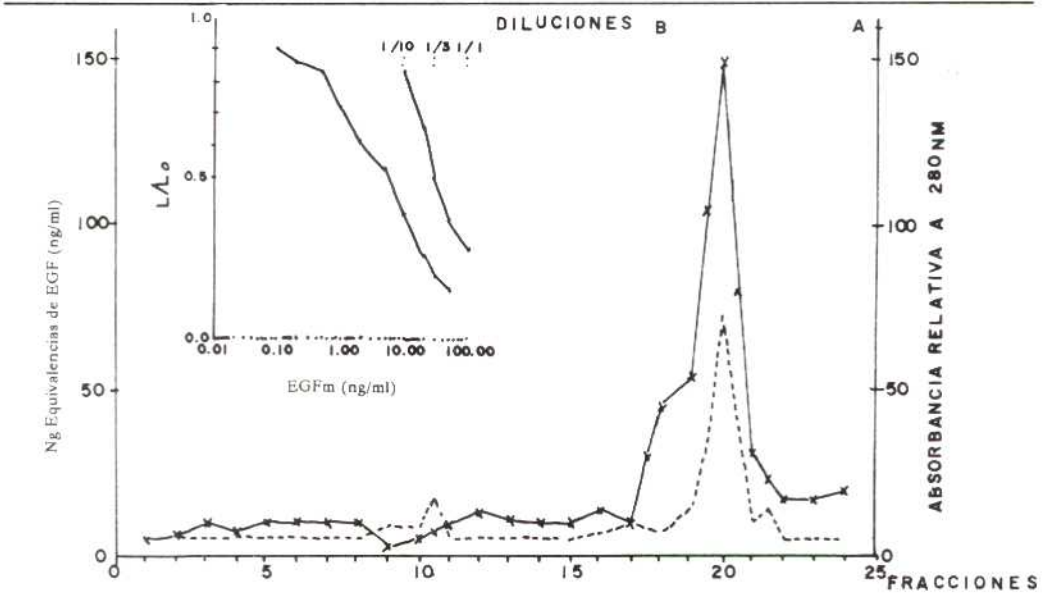
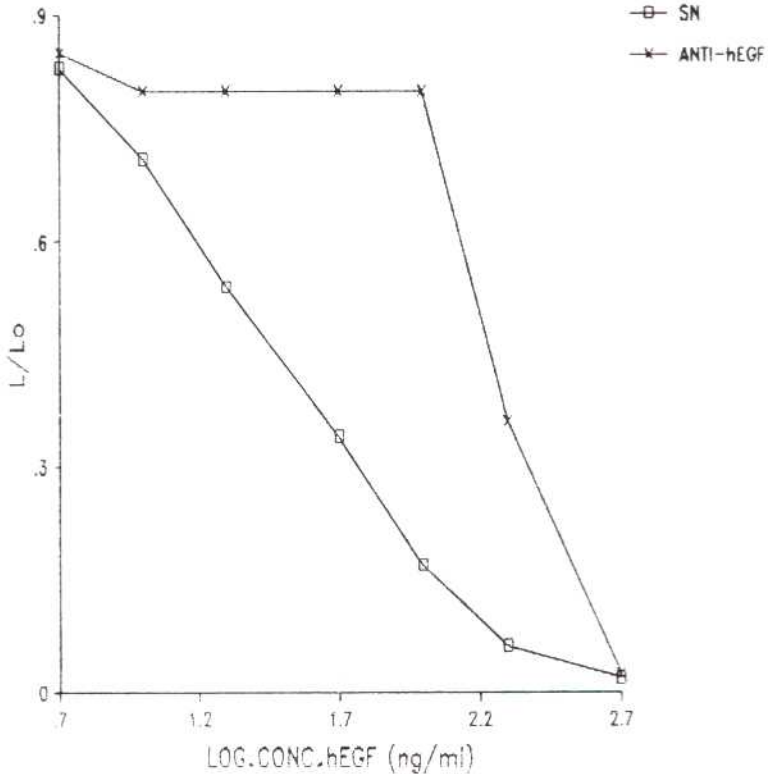


FIG. 1. Análisis de tamiz molecular en cromatografía líquida de alta presión (HPLC) en los extractos tumorales: A) Perfil cromatográfico típico de HPLC. Línea continua: perfil de absorbancia a 280 nm. Línea con asteriscos: contenido de actividad equivalente de EGF, determinada en cada fracción por radioreceptor-análisis (RRA). La ordenada es el contenido de actividad equivalente de EGF en ng/ml. La abscisa es el número de cada fracción. B) Curvas de desplazamiento paralelas producidas por diluciones seriadas de un extracto tumoral y por concentraciones crecientes de EGF.



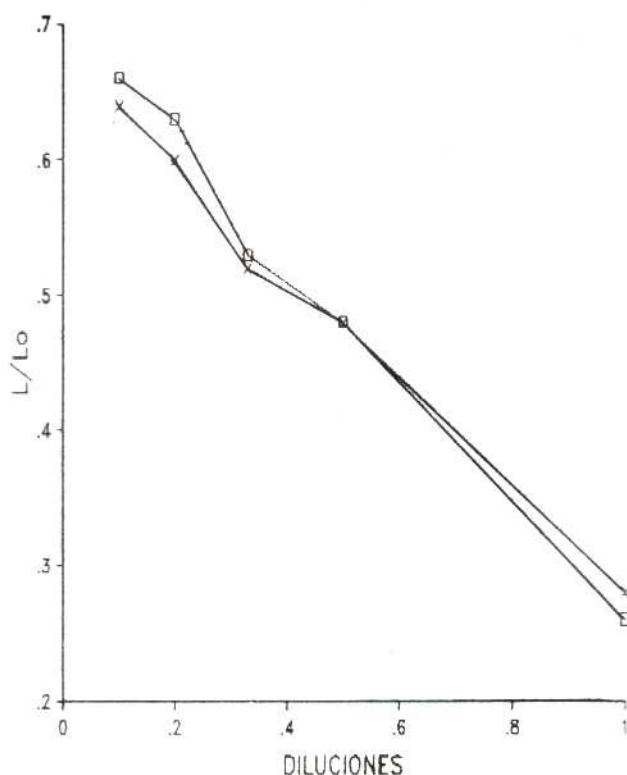


FIG. 2. A) Curvas de desplazamiento de la unión del EGFm-I125 a las células del tumor ascítico de Erlich, por concentraciones crecientes de EGF. B) Diluciones seriadas de un extracto tumoral. En ambos casos pre-incubados previamente durante 24 horas (1:1) con suero normal (□) y con antisuero anti-EGFh (-x-).

Este péptido de 6 000 dalton presente en los tumores mamarios humanos, capaz de reconocer al R-EGF y que es inmunológicamente diferente al EGFh, puede ser definido operacionalmente como TGF- α .

Diferentes niveles de TGF alfa en los tumores primarios de mama

Nosotros realizamos el procedimiento clásico de extracción ácido-etanólico en 21 carcinomas primarios de mama. Cinco de estos tumores (23,8 %) mostraron niveles medibles de actividad equivalentes de EGF, dosificada a través del RRA-EGF (figura 3). Los valores de esta actividad estuvieron en el rango de 14 a 193 ng/mg de proteína del extracto tumoral. Esta extracción ácido-etanólica es un procedimiento muy laborioso y no adecuado para realizarlo de manera sistemática, por lo cual nosotros estudiamos otros 33 tumores primarios de mama utilizando un método simplificado de extracción ácida.

En esta serie se encontraron los mismos resultados; 27 % de estos tumores mostraron actividad medible equivalente de EGF (figura 3) con valores en el rango de 4,1 a 56,8 ng/mg de proteínas del extracto tumoral. Esta ligera diferencia cuantitativa (no estadísticamente significativa) puede ser atribuida a las diferencias en el contenido de proteínas de los extractos obtenidos por ambos procedimientos. El procedimiento de extracción ácido-etanólica clásica rinde extractos con cantidades de proteínas por gramo de tejido tumoral menores que la extracción en ácido acético.

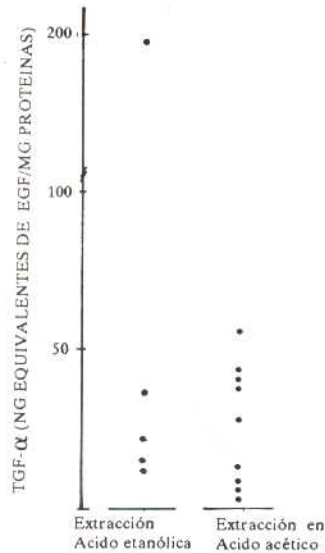


FIG. 3. Distribución de la actividad equivalente de EGF en tumores. La ordenada es la cantidad de actividad equivalente de EGF expresada en ng/mg proteínas. Cada punto es un tumor diferente.

Expresión del R-EGF y el TGF- α en los tumores primarios de mama

Nosotros analizamos en 37 carcinomas primarios de mama el contenido del R-EGF y el TGF- α . Niveles medibles de ambos marcadores fueron encontrados en 16 % de estos tumores (tabla 1).

Tabla 1
EXPRESION DEL TGF- α Y EL R-EGF EN LOS CARCINOMAS MAMARIOS HUMANOS

	R-EGF +	R-EGF -	total
TGF+	6	3	9
TGF-	9	19	28
TOTAL	15	22	37
Positividad de TGF-alfa	40 %	13,6 %	24,3 %

Sin embargo, en esta serie limitada de tumores los carcinomas R-EGF positivos presentaron una mayor expresión de TGF- α (40 %) que los tumores R-EGF negativos. Esta diferencia alcanzó significación estadística ($p=0,03$, test de hipótesis para dos proporciones de grupos independientes).

Expresión del TGF- α en los tumores primarios mamarios y sus metástasis

Se estudió la expresión del TGF- α en una serie de 45 carcinomas primarios de mama. En 26 casos fueron obtenidos los correspondientes ganglios metastásicos. El 31 % de los tumores primarios presentaron actividad TGF- α , en cambio, el 50 % de los depósitos metastásicos mostraron niveles medibles de esta actividad (figura 4).

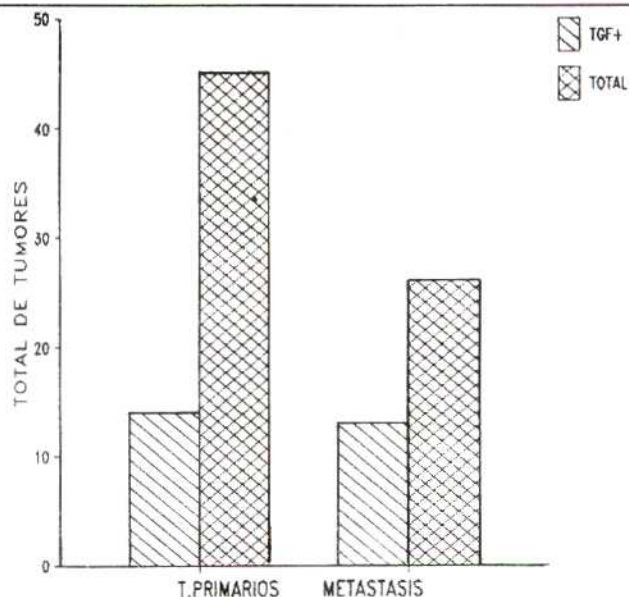


FIG. 4. Positividad de TGF- α en los tumores mamarios primarios y sus metástasis.

Esta diferencia en el contenido de TGF- α fue estadísticamente significativa ($p = 0,05$, test de hipótesis para dos proporciones de grupos independientes). No se encontraron diferencias en los niveles cuantitativos de TGF- α entre los tumores primarios y los depósitos metastásicos (figura 5).

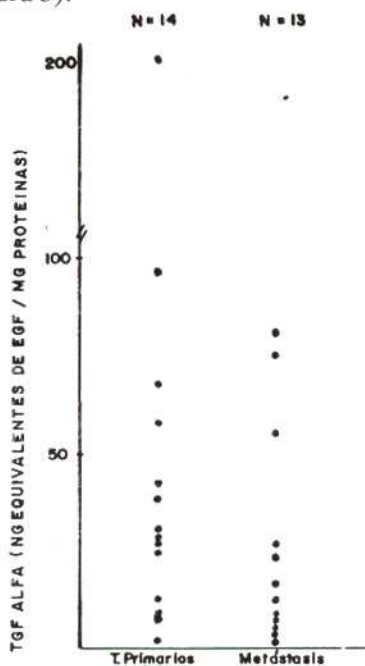


FIG. 5. Distribución de los niveles de la actividad del TGF- α en los tumores primarios y las metástasis. La ordenada es la cantidad de actividad equivalente de EGF expresada en ng/mg proteínas. Cada punto es un tumor diferente.

Cuando comparamos el contenido de TGF- α de los 26 tumores primarios con sus correspondientes metástasis, encontramos que más de la mitad de las metástasis TGF- α positivas (54 %) emergieron de tumores primarios negativos. Sin embargo, 75 % de los tumores primarios positivos dieron origen a depósitos metastásicos positivos (tabla 2). El contenido de TGF- α fue independiente del valor del receptor de estradiol (RE) (tabla 3).

Tabla 2
STATUS DEL TGF- α EN LOS TUMORES PRIMARIOS MAMARIOS
Y LOS DEPOSITOS METASTASICOS

Status TGF- α		Número (total 26)	Porcentaje
Primario	Metástasis		
+	+	6	23 %
+	-	2	7 %
-	+	7	27 %
-	-	11	42 %

Tabla 3
EXPRESION DEL TGF- α Y EL RECEPTOR DE ESTROGENO
EN LOS TUMORES MAMARIOS PRIMARIOS

	RE (fmol/ μ gADN)		
	<0,1	0,1-1,0	>1,0
TGF- α positivos	7	4	3
TGF- α negativos	12	9	10
Total	19	13	13
Positividad de TGF- α	37 %	31 %	23 %

DISCUSION

En el presente trabajo, nosotros demostramos que el 25 % de los carcinomas primarios de mama contienen un polipéptido ácido estable que compite con el EGF por su receptor específico de membrana. Esta actividad equivalente de EGF tiene un peso molecular *similar* al del EGF pero es *antigénicamente diferente*.

Así, el polipéptido extraído de los carcinomas mamarios cumple los criterios operacionales que definen el TGF- α (De Larco y Todaro, 1978; De Larco *et al.*, 1980; Massague, 1983).

Nuestros resultados están de acuerdo con reportes previos que demuestran la producción de TGF- α y la expresión de su ARNm por las células de cáncer de mama (Macías *et al.*, 1987; Pérez *et al.*, 1987).

Aunque algunos autores han sugerido la existencia de formas de TGF- α de alto peso molecular (Sherwin *et al.*, 1983; Kimball *et al.*, 1984), nosotros solo pudimos detectar la forma molecular de 6 000 dalton.

Nosotros y otros autores (Pérez *et al.*, 1984; Macías *et al.*, 1985; Fitzpatrick *et al.*, 1984; Sainsbury *et al.*, 1985) hemos demostrado que la expresión del R-EGF está inversamente correlacionada con la del receptor de estradiol (RE) en los tumores de mama. A pesar que los tumores TGF- α positivos son más frecuentemente R-EGF positivos, *no* existe una correlación entre los niveles de TGF- α y el contenido de RE.

Ha sido sugerido que las células tumorales escapan del control normal de los factores de crecimiento exógenos por la producción de sus propios factores de crecimiento. Este tipo de autoestimulación ha sido denominada estimulación *autocrina* del crecimiento (Sporn *et al.*, 1980; Heldin *et al.*, 1986). Existe un grupo de tumores primarios de mama que expresan el TGF- α y el R-EGF, lo que constituye el prerequisite molecular para la estimulación del crecimiento.

La expresión del TGF- α fue más frecuente en los depósitos metastásicos que en sus correspondientes tumores primarios. Nosotros también previamente reportamos que el contenido de R-EGF es también mayor en los depósitos metastásicos que en sus correspondientes tumores primarios (Macías *et al.*, 1986). Estos resultados sugieren que los carcinomas primarios están compuestos por una población celular heterogénea con respecto a la expresión de ambos marcadores. Estos hallazgos están de acuerdo con la hipótesis de la selección clonal durante el proceso de diseminación metastásica. El hecho de que algunas metástasis TGF- α y R-EGF positivas surjan de tumores primarios TGF- α y R-EGF negativos nos sugiere que las células tumorales que expresan ambos marcadores tienen ventajas de crecimiento durante el proceso metastásico.

Finalmente estos resultados también contribuyen a validar nuestra hipótesis de que el EGF y/o péptidos análogos pueden desempeñar un papel importante en la regulación del control del crecimiento en el cáncer mamario humano.

REFERENCIAS

- ANZANO, M.A.; A.B. ROBERTS; C.A. MEYERS; A. KOMORIYA; C. LAMBL; J.M. SMITH y M.B. SPORN (1982). *Synergistic interaction of two classes of transforming growth factors from murine sarcoma cells*. Cancer Res. **42**: 4776-4778.
- ANZANO, M.A.; A.B. ROBERTS; J.M. SMITH; M.B. SPORN y J.E. DE LARCO (1983). *Sarcoma growth factor from conditioned medium of virally transformed cells is composed by both alpha and beta transforming growth factors*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **80**: 6264-6268.
- CARPENTER, C. y S. COHEN (1979). *Epidermal growth factor*. Ann. Rev. Biochem **48**: 193-216.
- CARPENTER, C. y S. COHEN (1984). *Peptide growth factors*. Tibs **9**: 169-171.
- DE LARCO, J.E. y G.J. TODARO (1978). *Growth factors from murine sarcoma virus transformed cells*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **75**: 4001-4005.
- DE LARCO, J.E. y G.J. TODARO (1980). *Sarcoma Growth Factor (SGF): Specific binding to epidermal growth factor (EGF) membrane receptors*. J. Cell Physiol **102**: 267-277.
- DERYINCK, R.; A.B. ROBERTS; M.E. WINKER; E.Y. CHEN y D.U. GOEDEL (1984). *Human transforming growth factor, precursor structure and expression in E. coli*. Cell **38**: 287-297.
- FITZPATRICK, S.; J. BRIGHTWELL; J. WITTLIFT; G. BARROWS y G. SHULTZ (1984). *Epidermal growth factor binding by breast tumor biopsies and relationship to estrogen and progesterin receptor levels*. Cancer Res. **44**: 3448-3453.
- GOSPODAROWICZ, D. y J.S. MORAN (1976). *Growth factors in mammalian cell culture*. Ann. Rev. Biochem **45**: 531-558.
- HELDIN, C.H.; A. WASTESON y B. WESTERMARK (1985). *Platelet-derived growth factor*. Mol. Cell. Endocrinol **39**: 169-187.
- HELDIN, C.H.; C. BESHOLTZ; A. JOHANSSON y B. WESTERMARK (1986). *Role of PDGF-like growth factors in malignant transformation*. Cancer Reviews **2**: 34-47.
- HUNTER, W.M. y F.C. GREENWOOD (1962). *Preparation of Iodine-1131 labelled human growth hormone of high specific activity*. Nature **194**: 495-496.

- KIMBALL, E.S.; W.H. BOHN; K.D. COCKLEY; T.C. WARREN y S.A. SHERWIN (1984). *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.
- LOWRY, D.H.; N.J. ROSEBROUGH; A.L. FARRY y R.J. RANDALL (1951). *Protein measurement with the Folin Phenol reagent*. *J. Biol. Chem.* **191**: 175-195.
- 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 (EGF). II. Desarrollo de un radioreceptor análisis para la determinación de cantidades picomolares*. *Interferón y Biotecnología* **2**: 115-127.
- 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.; R. PEREZ; T. HAGESTROM y L. SKOOG (1987). *Identification of transforming growth factor alpha in human primary breast carcinomas*. *Anticancer Res.* **7**: 1271-1276.
- MASSAGUE, J. (1983). *Epidermal growth factor-like transforming growth factor. II. Interaction with epidermal growth factor receptors in human placenta membranes and A431 cells*. *J. Biol. Chem.* **258**: 13614-13620.
- PASCUAL, M.R.; A. MACIAS; L. MORENO y A. LAGE (1983). *Factors associated with prognosis in human breast cancer. III. Estradiol receptors and short-term relapse*. *Neoplasma* **30**: 589-596.
- PEREZ, R.; M. PASCUAL; A. MACIAS y A. LAGE (1984). *Epidermal growth factor receptors in human breast cancer*. *Breast Cancer Res. and Treat.* **4**: 189-193.
- PEREZ, R.; C. BESHOLTZ; B. WESTERMARK y C-H. HELDIN (1987). *Frequent expression of growth factor for mesenchymal cells in human mammary carcinoma cell lines*. *Cancer Res.* **47**: 3425-3429.
- ROBERTS, B.A.; C.L. LAMB; D.L. NEWTON; B.M. SPORN; J.E. DE LARCO y G.J. TODARO (1980). *Transforming growth factors: Isolation of polypeptides from virally and chemically transformed cells by acid/ethanol extraction*. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **77**: 3494-3498.
- SAINSBURY, J.R.; J.R. FARNDOM; G.V. SHERBET y A.L. HARRIS (1985). *Epidermal growth factor receptor and estrogen receptor in human breast cancer*. *Lancet* **I 8425**: 364-366.
- SAVAGE, C.R. y S. COHEN (1972). *Epidermal growth factor and new derivative. Rapid isolation procedures and biological and chemical characterization*. *J. Biol. Chem.* **47**: 7609-7611.
- SHERWIN, S.A.; D.R. TWARDZIK; W.H. BOHN; K.D. COCKLEY y G.J. TODARO (1983). *High molecular weight transforming growth factor activity in the urine of patients with disseminated cancer*. *Cancer Res.* **43**: 403-407.
- SPORN, M.B. y G.J. TODARO (1980). *Autocrine secretion and malignant transformation of cells*. *New Engl. J. Med.* **303**: 878-880.
- STARKEY, R.H. y D.N. ORTH (1977). *Radioimmunoassay of human epidermal growth factor (Urogastrone)*. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **45**: 1144-1152.