EFECTO *in vitro* DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDERMICO (EGF) SOBRE LINEAS CELULARES DE CANCER DE PULMON

Eduardo Suárez[1], Gunilla Björklund[2], José Luis Bello[3]

[1]*Centro de Inmunología Molecular, Calle 216 esq. 15 Reparto Atabey, Playa, C.P. 11600 Ciudad de La Habana, Cuba.* [2]*Departament of Pathology, University Hospital Uppsala S-75185 Uppsala, Suecia,* [3]*Instituto Nacional de Oncología y Radiobiología. 29 y F Vedado Plaza de la Revolución, LaHabana 4, Ciudad de La Habana, C.P. 10400, Cuba.*

Recibido en octubre de 1993. Aprobado en noviembre de 1994

Key words: Lung cancer, EGF, EGF-R, cell lines

SUMMARY

We have analyzed the expression of Epidermal Growth Factor (EGF) receptor on 11 human lung cell carcinomas established cell lines which are representative of the major four histologies types of lung cancer. We found differential expression among non small cell lung cancer and small cell carcinomas, five of six were positive in N-SCLC however only one of five was positive in SCLC for the expression of de receptor. The effect of EGF over the cells lines which had the higher amounts of receptors was growth stimulatory.

RESUMEN

La expresión del receptor para el factor de crecimiento epidérmico (EGF) fue estudiada en 11 líneas de cáncer de pulmón establecidas en cultivo, las cuales son representativas de los cuatro tipos histológicos más abundantes de esta localización. Las cantidades de receptores son expresadas de forma diferencial. En el grupo de carcinomas de células grandes (N-SCLC) cinco de seis líneas estudiadas fueron positivas para la presencia del receptor, y en el grupo de carcinoma de células pequeñas (SCLC) donde sólo una de las cinco estudiadas resultó positiva para la presencia del receptor. El efecto del EGF humano recombinante sobre las líneas con mayor cantidad de receptores fue de estimulación del crecimiento.

INTRODUCCION

Debido al rol fisiológico del factor de crecimiento epidérmico (EGF) y su receptor (EGF-R) en el crecimiento y la diferenciación celular (Cohen y Elliot, 1963) y su relación con la transformación maligna (Pérez y Lage, 1986), numerosos estudios han sido realizados en tumores primarios y líneas celulares establecidas a partir de tumores. Estos estudios han demostrado el valor pronóstico de los receptores de EGF en el carcinoma de mama (Macías *et al.*, 1987), y su importancia en otras localizaciones malignas como los tumores neurogliales (Libermann *et al.*, 1984), renales (Neal *et al.*, 1985). En otro sentido han sido dirigidos los trabajos que aprovechan la presencia del receptor en las células así como la misma molécula de EGF para la *hormonoterapia* del cáncer. Mausi *et al.*, (1984) trataron tumores mamarios humanos xenotransplantados en ratones desnudos con anticuerpos monoclonales contra el EGF-R produciendo inhibiciones del crecimiento tumoral. Lombardero *et al.*, 1986 reportaron inhibición de la incorporación de timidina en el tumor ascítico de Ehrlich con EGF a una dosis de 100 ng/kg. Después de encontrar evidencias de inhibición del crecimiento de tumores epiteliales (A-431, epidermoide de vulva y CPH-3, epidermoide de pulmón) con alta expresión EGF-R, Fonseca *et al.* (1988) trataroncon EGF tópico a altas dosis a pacientes con carcinomas cutáneos, logrando respuestas parciales.

El cáncer de pulmón puede ser dividido en dos grandes grupos carcinoma de células pequeñas (SCLC) y de células grandes (N- SCLC). Esta distinción está basada en diferencias morfológicas, bioquímicas, y en la respuesta a la quimio y radioterapia (Gazdar *et al.*, 1985, Minna *et al.*, 1982). El grupo N-SCLC con 70% del total de los casos incluye según la clasificación de la Organización Mundial de la Salud de Ginebra (1981) a tres grupos: adenocarcinoma (ADC), carcinoma epidermoide o escamoso (SQC) y carcinoma de células grandes indiferenciadas (LCC). Este grupo presenta una marcada resistencia a la quimio y radioterapia, alta expresión de marcadores epiteliales y en menor medida marcadores neuroendocrinos, a diferencia de SCLC que en principio es más sensible a la terapia y expresa mayormente los marcadores neuroendocrinos y no los epiteliales (Bergh *et al.*, 1981, Gazdar *et al.*, 1983, Betsholtz *et al.*, 1987). Es necesario aclarar que aun siendo este último grupo más sensible a la terapia, la sobrevida por largos períodos de tiempo es solamente de 1-5% de los pacientes (Bergh *et al.*, 1981).

Copyright © 1994, Sociedad Iberolatinoamericana de Biotecnología Aplicada a la Salud
La Habana, Cuba

Teniendo en cuenta el origen epitelial del carcínoma de pulmón nosotros hemos determinado la expresión del EGF-R en 11 líneas de cáncer de pulmón establecidas 5 SCLC y 6 N-SCLC, a través de radio análisis de receptorores. Todas las líneas N-SCLC excepto una, expresan el receptor con la misma afinidad que es reportada en la literatura. Opuesto a ésto, sólo una de las 5 SCLC presenta receptores para el EGF.Las líneas con mayor cantidad de receptores fueron utilizadas para ensayar el efecto de altas concentraciones de EGF *in vitro*.

MATERIALES Y METODOS

Líneas celuares

Las líneas celulares empleadas fueron:

SCLC- NCI H 82 (Carney *et al.*, 1985), U1285, U1690, U1906, y U2020 (Bergh *et al.*, 1981, 1982 and 1985) que crecen en suspensión. N-SCLC NCI H 23, NCI H 125 ADC (Gazdar *et al.*, 1980, Carney *et al.*, 1985); U1810 (Bergh *et al*, 1985), NCI H 157, NCI H 661 (Carney *et al.*, 1985) LLC; U1752 (Bergh *et al.*, 1981) SQC todas estas crecen adheridas y es necesario el uso la tripsinización en su manipulación . Todas las células crecieron en medio de cultivo RPMI-1690 (SEROMED, Berlin, RFA) suplementado con 10% de suero de ternera sin ingerir calostro (CUBAVET, Habana Cuba), y antibióticos, manteniéndose a 37°C en atmósfera de aire CO_2 (95- 5%). La viabilidad fue calculada antes de cada experimento con tripán azul, siendo siempre mayor del 90%.

Radio análisis de receptores

La determinación de los receptores se hizo según la técnica descrita por Macías *et al.*, (1986). Para N-SCLC 5 x 10^5 células se sembraron por pozo en placas de 24 pozos, incubándose por el período de tiempo necesario para su adhesión. El medio de cultivo fue eliminado mediante tres lavados con solución salina tamponada con fosfatos (PBS), con 10 mM de cloruro de magnesio, realizándose el ensayo en la misma placa. La única variante al método originalmente descrito fue para SCLC donde se utilizaron 10^6 células por punto y el ensayo realizó en tubos de centrífuga (LUCKHAN, Burgess G.B.) porque las mismas crecen en suspensión. El ensayo se realizó de la siguiente forma, las células en la monocapa o la suspensión celular se incubaron en tampón de unión (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 10 mM $MgCl_2$, 0.1% BSA) con aproximadamente 10^4 cpm de I^{125} EGF (150-200 µci/µg) y una serie de diluciones seriadas de EGF no marcado (0, .1, .2, .5, 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100 y 1000 ng/mL; este último punto para determinar la unión inespecifica) durante una hora a temperatura ambiente en un volumen total de 0.5 mL. La incubación se detuvo con 1.5 mL del tampón de unión frio seguida de dos lavados con PBS para la monocapa y lavados con centrifugación para la suspensión celular. La radioactividad fue arrastrada con 150 mL de NaOH 1.5 M en el caso de la monocapa en el sedimento, en el caso de la suspensión celular , se realizó en un contador gamma. La determinación de la constante de disociación Kd y la cantidad de sitios de unión o receptores por células fue hecha según el análisis de Scatchard, (1949). Los ensayos para cada línea celular se realizaron tres veces y los valores mostrados representan la media de los mismos. Como control se uso el carcinoma epidermoide de vulva A-431 con alrededor de 10^6 sitios de unión por célula y una constante de disociación de 10^{-9} M.

Curvas de crecimiento

A todas las líneas celulares se le determinaron las condiciones óptimas y mínimas de crecimiento en dependencia de las concentraciones de suero. Para ello se sembraron a diferentes tiempos 10^5 células en placas de cultivo de 24 pozos. Las capas celulares crecidas en los pozos se lavaron con PBS y desprendiéndose por adición de 100 mL de NaOH 1 M durante 2 h a temperatura ambiente, siguiéndose la cinética de crecimiento durante 10 días, las cantidades de células se determinaron indirectamente a través de la cantidad total de proteinas, medidas por el método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951). Los ensayos se hicieron por triplicado.

Ensayos con EGF

Condiciones de crecimiento óptimas (10% de suero y mínimas 1% de suero). Con el fin de determinar un efecto inhibidor o estimulador del EGF, se diseñaron ensayos usando EGF humano recombinante (Centro de Ingenieria Genética y Biotecnología) a 10,100, y 1000 ng/mL. Se sembraron 5x10^4 células por pozo incubándolas 1, 3, 5, y 7 días con las diferentes concentracriones de EGF con reposición de medios cada dos días. Se incluyó un control de medio sin EGF y con la concentración de suero determinada. Cada punto se hizo por triplicado al igual que el ensayo, la determinación de las cantidades de células se hizo según la técnica descrita anteriormente. Para la comparación de los datos se usó un test estadístico de comparación de medias no paramétrico (U de Mann Whitney).

RESULTADOS

Receptores

La tabla 1 muestra la cantidad de receptores por célula y la constante de disociación para cada línea celular. Las líneas de mayor cantidad de receptores (alrededor de 10^5 sitios/célula) fueron las U 1752 SQC,

Tabla 1

Constantes de disociación (Kd) y cantidades de receptores de las líneas celulares de cáncer de pulmón.

Línea celular	Tipo histológico	KD 10^{-9}M	Cantidad de receptores sitios/células
NCI H23	ADC	6.06 ± 1.4	2.96 ± 1.7 x10^4
NCI H125	ADC	4.23 ± 0.2	1.62 ± 0.3x10^5
NCI H157	LCC	2.66 ± 0.44	1.27 ± 0.1x10^5
NCI H661	LCC	-	-
U-1810	LCC	1.40 ± 0.56	7.32 ± 2.8x10^3
U-1752	SQC	1.88 ± 0.22	1.30 ± 0.26x10^5
NCI H82	SCLC	-	-
U-1285	SCLC	-	-
U-1690	SCLC	2.47 ± 1.3	2.40 ± 1.44x10^4
U-1906	SCLC	-	-
U-2020	SCLC	-	-

Las cifras representan los valores medios de los resultados de tres ensayos diferentes con sus desviaciones estándar.

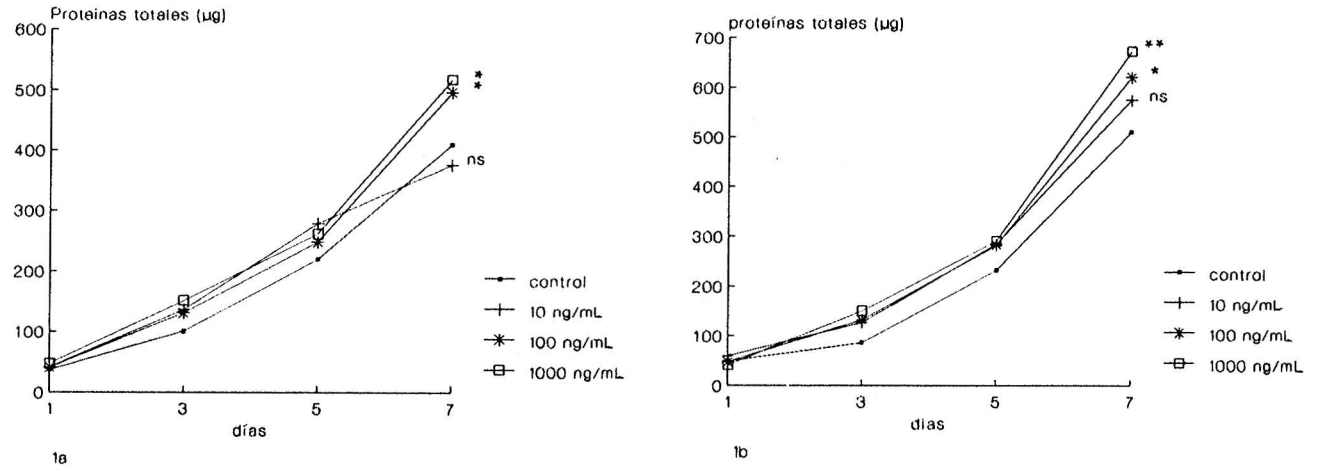
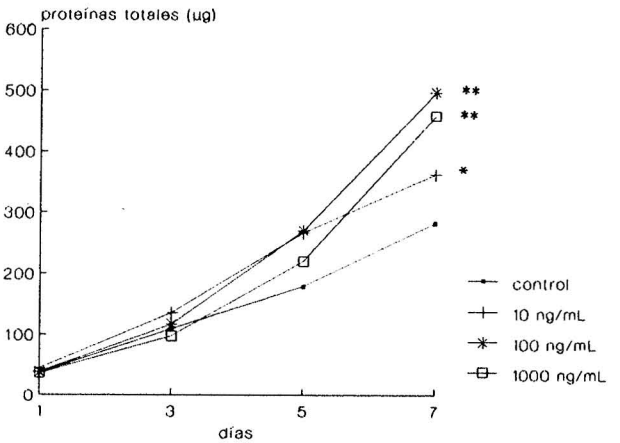


Fig. 1. Efecto del EGF sobre la línea celular U 1752 (SQC) en el tiempo. * $p < 0.05\%$ ** $p < 0.01\%$. a) condiciones minimas de crecimiento, 1% suero de ternera. b) condiciones óptimas de crecimiento, 10% suero de ternera.

H125 ADC y H157 LCC, seguidas por H23 ADC y U1690 SCLC con 10^4 sitios/célula. Por último, se determinó que la línea U1810 LCC tenía aproximadamente 10^3 sitios/célula. El resto de las líneas celulares resultaron negativas para la expresión del receptor. De un total de seis N-SCLC, cinco fueron positivas, sólo la H661 resultó negativa, y tres de ellas con la mayor cantidad receptores para este estudio, lo contrario sucede con SCLC donde sólo U1690 fue positiva.

Actividad del EGF sobre algunas líneas celulares con mayor cantidad de receptores

U1752. Tanto para las condiciones mínimas como para las óptimas de crecimiento con suero, se observa que el EGF ejerce un efecto estimulador del crecimiento; este efecto se observa a partir del tercer día. La diferencia es mayor con respecto al control en el día 7 y para las concentraciones mayores (figuras 1a y 1b).



Gráfica 2.-

Fig. 2. Efecto del EGF sobre la línea celular H 125 en el tiempo para la condición mínima de crecimiento 1% de suero de ternera. * $p < 0.05\%$, ** $p < 0.01\%$.

H125. Sobre esta línea celular el EGF actua estimulando el crecimiento para las dos condiciones ensayadas aunque es mayor para las condiciones mínimas (figura 2) observándose, al igual que en la línea U 1752, la mayor estimulación a los siete días de cultivo. Similares resultados fueron obtenidos con la línea celular H157, (resultados no mostrados).

DISCUSION

La expresión del receptor para el EGF en cáncer de pulmón ha sido abordada por algunos autores. Harris *et al.* (1989) caracterizaron 36 biopsias de N-SCLC en cuanto a la expresión y afinidad; ellos compararon los resultados obtenidos en biopsias frescas de tumores con tejidos pulmonares sanos, siendo significativamente mayor la cantidad de receptores en las membranas de los tumores. Otro grupo (Haeder *et al.*, 1989) usando un panel de líneas celulares de cáncer de pulmón encontraron la expresión diferencial del EGF-R, concluyendo que N-SCLC expresa el receptor, mientras que en SCLC rara vez es expresado. Estos resultados son similares a los obtenidos por nosotros, aun cuando ellos encontraron de 11 líneas de SCLC, 4 positivas, y nosotros de 5 SCLC sólo 1. La diferencia puede ser explicada según Sherwin *et al.* (1981) por cambios en las líneas celulares depués de muchos pases en cultivo y la diferencia de procedencia de las líneas celulares.

Algunas de las líneas usadas por Haeder (H82, H69, H125, U1752) también fueron utilizadas por nosotros, coincidiendo ambos resultados de expresión del EGF-R en N-SCLC y no expresión en SCLC. El mismo panel de líneas celulares usadas en nuestro estudio habían sido usadas por Belsholtz *et al.* (1987) en un estudio de expresión de diferentes factores de crecimiento a nivel de ARNm. Este incluyó ARNm para EGF-R para PDGF, IGF, TGF y EGF. Los resultados obtenidos por ellos a nivel de ARNm para el EGF-R coinciden con los nuestros con la sola excepción de la línea U 1690 SCLC, que fue negativa en su estudio y positiva en el nuestro. Esta incongruencia no ha podido ser explicada. La constante de disociación determinada en este estudio se corresponde con la reportada en la literatura para el EGF-R; además, estos resutados fueron corroborados por inmunoflourescencia indirecta (datos no mostrados) usándose como control positivo A 431.

La expresión diferencial del receptor puede ser utilizada como blanco de inmunotoxinas (Shimizu *et al.*, 1989), o en el caso de tumores con dependencia de EGF para crecimiento, el uso de antirreceptores pudiera resultar un arma útil en el tratamiento de algunos tumores (Mateo de Acosta *et al.*, 1992).

No obstante, se ha reportado anteriormente el uso de la molécula de EGF como inhibidor del crecimiento tumoral *in vitro* (Lombardero *et al.*, 1990) e *in vivo* (Lombardero *et al.* 1986). También se han obtenido respuestas parciales de carcinomas cutáneos (Fonseca *et al.*, 1988). Contrarios a lo anterior son los resultados obtenidos en nuestros ensayos, donde para las tres líneas con mayor cantidad de sitios por célula el efecto fue mitogénico. El efecto antiproliferativo del EGF reportado por otros grupos ha sido en líneas celulares con muy alta expresion del EGF-R (Barnes *et al.*, 1982) y es posible que en nuestro caso las líneas celulares no tengan el nivel de expresión de receptores requerido para lograr la inhibición (Pathak *et al.*, 1982; Barnes 1982, Kamata *et al.*, 1986).

Nuestros resultados indican la utilidad del EGF-R como marcador para el diagnóstico de los carcinomas de pulmón, así como la actividad mitogénica del EGF sobre estas líneas en cultivo.

REFERENCIAS

BARNES, D.W. (1982). Epidermal Growth Factor inhibit growth of A431 human epidermoid carcinoma in serum free cell culture. *J. Cell Biol.* **93**:1-4.

BERGH, J., K. NILSSON; L. ZECH and B. GIOVANELLA (1981). Establishment and characterization of continous lung squamous cell carcinoma cell line (U-1752). *Anticancer Res.* **1**:317-322.

BERGH, J., E. LARSSON; L. ZECH and K. NILSSON (1982). Establishment and characterization of two neoplastic cell line (U-1285 and U-1568) derived from small cell carcinoma of the lung. *Acta Path. Microbiol. Immunol. Scand.* Sect. A. **90**:149-158.

BERGH, J., K. NILSSON; R. EKMAN and P. GIOVANELLA (1985). Establishment and characterization of cell line from human small cell and large cell carcinoma of the lung. *Acta Path. Microbiol. Immunol. Scand.* Sect. A. **93**:133-147.

BETSHOLTZ, C., J. BERGH; M. BYWATER; M. PETTERSSON; A. JOHANSSON; C.H. HELDI; NR. OHLSSON, T.J. KNOTT, J. SCOTT, G.I. BELL and B. WESTERMARK (1987). Expression of multiples growth factors in a human lung cancer cells lines. *Int. J. Cancer* **29**:502-507.

CARNEY, D.N., A. F. GAZDAR, G. BEPLER, G.J. GUCCION, P. J. MARANGOS, T.W. MOODY, M.H. ZWEING and J.D. MINNA (1985). Establishment and identification of small cell cancer cell line having classic and variant features. *Cancer Res.* **45**:2913-2923.

COHEN, S. and G.A. ELLIOTT (1963). The estimulation of epidermal keratinization by the protein isolated from submaxillary gland of the mouse. *J. Invest. Dermatol.* **40**:1-15.

FONSECA, R., J. LOMBARDERO; R. PEREZ; S. QUINTERO; B. TORMO; A. MACIAS; M.A. RIOS; N. CORDIES; F. FONT; B. LEON; M. PUIG; O. AGUILAR; C. RODRIGUEZ and A. LAGE (1988). Efecto antitumoral del factor de crecimiento epidermico en carcinoma de piel humano: reporte preliminar. *Interferón y Biotecnologia* **5(3)**:270-277.

GAZDAR, A.F., D.N. CARNEY; E.K. RUSSEL; H.L. SIMS; S. BAYLIN; JR. BUNN; G.J. GUCCION and J.D. MINNA (1980). Establishment of continous clonable culture of small cell carcinoma of the lung which have amino precursor uptake and decarboxylation cell properties. *Cancer Res.* **40**:3502-3507.

GAZDAR, A. F., D.N. CARNEY and J.D. MINNA (1983). The biology of non-small cell lung cancer. *Semin. Oncol.* **10**:3-19.

GAZDAR, A.F., D. N. CARNEY, M. M. NAU and J. D. MINNA (1985). Characterization of variant subclasses of cell lines derived from small cell lung cancer having distinctives biochemical, morphological and growth properties. *Cancer Res.* **45**:2924-2930.

HAEDER, M., M. ROTSH, G. BEPLER, C. HENNING, K. HAVENANN, B. HEIMANN and K. MOELLING (1989). Epidermal Growth Factor Receptor expression in human lung cancer cell lines. *Cancer Res.* **48**:1132- 1136.

HARRIS, H. L., D. VEALE, N. KEN and G.J. GIBSON (1989). Characterization of epidermal growth factor receptor in primaries human non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* **49**:1313-1317.

HISTOLOGICAL TYPING OF LUNG TUMORS (1981). WHO, Geneva pp 1-50.

KAMATA, N., K. CHIDA; K. RIKAMARU; M. HORIKOSHI and S. ENOMOTO and T. KUROKI (1986). Growth inhibitory effect of epidermal growth factor and over expression of its receptor on human squamous cell carcinoma in culture. *Cancer Res.* **46**:1648-1653.

LIBERMANN, T. A., N. RAZON; A. D. BARTEL; G. GARDEN; J. SCHLESSINGER and H. SOREQ (1984). Expression of epidermal growth factor receptor in human brain tumors. *Cancer Res.* **44**:753-760.

LOMBARDERO, J., A. LAGE and R. PEREZ (1986). Epidermal growth factor inhibits thimidine incorporation in Ehrlich ascites tumor cells *in vivo*. *Neoplasma* **33**:423-429.

LOMBARDERO, J., R. PEREZ and L. SCOOG (1990). Synergistic inhibitory effect on gamma interferon and EGF in A-431 cells. *Anticancer Res.* **12**:201-204.

LOWRY, O.H., N.J. ROSEMBROUGH; A.L. FARR and R.J. RANDALL (1951). Protein measurement with the Folin Phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**:265-275.

MACIAS, A., C. AZAVEDO; T. HAGERSTROM; C. KLINTEMBERG; R. PEREZ and L. SKOOG (1987). Prognosis significance of the receptor for epidermal growth factor in human mammary carcinomas. *Anticancer Res.* **7**:459-464.

MACIAS, A., M. R. PASCUAL; R. PEREZ and A. LAGE (1984) Epidermal growth factor receptor in human breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment* **4**:183-193.

MASUI, H., T. KAWAMOTO; T. D. SATO; B. WOLF; G. SATO and J. MENDELSOHM (1984). Growth inhibition of human tumor cells in athimic mice by anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies. *Cancer Res.* **44**:1002-1007.

MATEO DE ACOSTA, C., A. FERNANDEZ; R. PEREZ and L. SKOOG (1992). Anti EGF monoclonal antibody with EGF antagonist activity: A different biding site. *Anticancer Res.* **12**:201-204.

MINNA, J.D., G.A. HIGGNS and E.J. GLATSLEIN (1982). Cancer of the lung: *Cancer Principles of Oncology*. Edited by V.T. De Vita, Jr.S. Hillman, S.A. Rosenberg, Philadelphia, T. B. Lippincortt pp 396-474.

NEAL, D.E., C. MARCH; M.K. BENNETT; P.D. ABEL; R.R. HALL; J.R.C. SAINSBURY and A.L. HARRIS (1985). Epidermal growth factor receptor in human blader cancer: comparisons of invasive and superficial tumor. *Lancet* **1**:366-368.

PATHAK, M.A., L.M. MATRISIAN; B.E. MAGUN and S.E. SALMON (1982) Effect of epidermal growth factor on clononogenic growth of primary human tumor cells. *Int. J. Cancer* **30**:745-750.

PEREZ, R. y A. LAGE (1986). Los factores de crecimiento epidérmicos y sus relaciones con la transformación maligna. *Interferón y Biotecnologia* **3(3)**:179-209.

SCATCHARD, G. (1949). The attraction of protein for small molecules and ions. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **5**:660-665.

SHERWIN, S.A., J.D. MINNA; A.F. GAZDAR and G.J. TODARO (1981). Expression of epidermal and nerve growth factor receptors and soft agar growth factor production by human lung cancer cells. *Cancer Res.* **41**:3538-3542.

SHIMIZU, N., S. OZAWA; M. UEDA; N. ANDO; O. ABE; S. MINOSHIMA (1989). Selective killing of squamous carcinoma cell by an immunotoxin that recognizes the EGF receptor. *Int. J. Cancer* **43**:152-157.