

Tesis Doctoral

Aislamiento, purificación y caracterización de factores de transformación de neoplasias malignas

Elizalde, Patricia Virginia

1989

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias
Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the Master's and Doctoral Theses Collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Elizalde, Patricia Virginia. (1989). Aislamiento, purificación y caracterización de factores de transformación de neoplasias malignas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n2215_Elizalde

Cita tipo Chicago:

Elizalde, Patricia Virginia. "Aislamiento, purificación y caracterización de factores de transformación de neoplasias malignas". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1989. http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n2215_Elizalde

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

AISLAMIENTO, PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE FACTORES DE
TRANSFORMACION DE NEOPLASIAS MALIGNAS

AUTORA: PATRICIA VIRGINIA ELIZALDE

DIRECTOR: Dr EDUARDO H. CHARREAU

LUGAR DE TRABAJO:

INSTITUTO DE BIOLOGIA Y MEDICINA EXPERIMENTAL (IBYME)
Y SECCION CITOGENETICA, INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
HEMATOLOGICAS, ACADEMIA NACIONAL DE MEDICINA

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TITULO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS

BUENOS AIRES 1989

2215
Ej 2.

A mis padres

A Martín Francisco y Gustavo

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Eduardo H. Charreau, por todas sus enseñanzas durante estos años, su constante estímulo y apoyo y porque el ejemplo de su trabajo me ha permitido conocer lo que es verdaderamente la investigación científica.

A la Dra. Sonia Brioux de Salum, por haber posibilitado mi iniciación en esta tarea.

A la Lic. Catalina Bianchi de Di Risio por sus enseñanzas de las técnicas de cultivo de tejidos y su guía y crítica durante la etapa inicial de este trabajo.

A la Lic. Marcela Gronda por toda su colaboración en las técnicas de cultivo de tejidos y porque su amistad ha sido un valiosísimo apoyo durante el desarrollo de este trabajo.

A la Lic. Nora Ranni por su estímulo y colaboración para la iniciación de esta labor.

A la Dra. Claudia Lanari por su participación en los estudios del modelo experimental y su valioso aporte en la discusión de los resultados.

A la Dra. Irene Larripa y las demás integrantes de la Sección Citogenética de la Academia Nacional de Medicina por su colaboración y el afecto que me han brindado durante los años de realización de esta tarea.

A mis compañeros de laboratorio del Instituto de Biología y Medicina Experimental por su apoyo y estímulo para llevar a cabo esta investigación.

A la Dra María Marta de Elizalde de Bracco por su orientación y consejos y a todos los integrantes de la Sección Inmunohematología de la Academia Nacional de Medicina, por su colaboración en distintas etapas de este trabajo.

A la Dra Christiane Dosne Pasqualini y a los miembros de la Sección Leucemia Experimental de la Academia Nacional de Medicina por su apoyo en la realización de esta tarea.

A la Lic María Teresa Santarelli por su ayuda en el análisis estadístico de los resultados.

A los Lics. Catalina Kempfer y Alberto Ochoa por su colaboración en la etapa inicial de purificación de proteínas.

ABREVIATURAS

GFs:	Factores de crecimiento polipeptídicos
PDGF:	Factor de crecimiento de plaquetas.
EGF:	Factor de crecimiento epidérmico
IGF-1:	Factor de crecimiento semejante a la insulina tipo I, Somatomedina C.
IGF-II:	Factor de crecimiento semejante a la insulina tipo II
TGF-alfa:	Factor de transformación tipo α
TGF-beta:	Factor de transformación tipo β
aFGF:	Factor de crecimiento de fibroblastos ácido
bFGF:	Factor de crecimiento de fibroblastos básico
SSV:	Virus del sarcoma de simios
AEV:	Virus de la eritroblastosis de aves
IGF-BP:	Proteína transportadora de IGFs
SFB:	Suero fetal bovino
BSA:	Albúmina sérica bovina
DSS:	Disuccinimidil suberato
SDS:	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE:	Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio
E ₂ :	Estradiol
E-R:	Receptor de estrógenos
PG-R:	Receptor de progesterona
EGF-R:	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
IGF-I-R:	Receptor del factor de crecimiento semejante a la insulina tipo I
MPA:	Acetato de medroxiprogesterona

El símbolo ^{125}I colocado delante del nombre de una especie indica que la misma está marcada con ese isótopo radiactivo

INDICE

INTRODUCCION.....	1
FACTORES DE CRECIMIENTO POLIPEPTIDICOS.....	2
PDGF.....	8
FACTORES DE CRECIMIENTO SEMEJANTES A PDGF.....	21
EGF.....	22
IGF-I, IGF-II.....	30
FGFs.....	38
TGFs.....	46
TGF-alfa.....	50
TGF-beta.....	56
OTROS FACTORES DE TRANSFORMACION.....	76
ADENOCARCINOMA DE MAMA MURINO.....	78
INDUCCION DE ADENOCARCINOMAS DE MAMA EN RATONES POR ACETATO DE MEDROXIPROGESTERONA.....	81
OBJETIVOS.....	86
MATERIALES Y METODOS.....	88
METODOS GENERALES.....	89
1) TUMORES HUMANOS.....	89

2) TUMORES EXPERIMENTALES.....	89
A) Inducción de adenocarcinomas de mama por MPA.....	89
B) Estudios morfológicos e inmunohistoquímicos.....	90
C) Transplantes singeneicos de los adenocarcinomas de mama inducidos por MPA.....	91
3) CUANTIFICACION DE PROTEINAS.....	92
4) EXTRACCION ACIDO-ALCOHOLICA DE FACTORES DE CRECIMIENTO Y TRANSFORMACION.....	92
5) TRATAMIENTOS FISICO-QUIMICOS DE LOS EXTRACTOS CRUDOS.....	93
6) CULTIVOS CELULARES.....	94
7) ENSAYOS DE ACTIVIDAD TRANSFORMANTE EN MEDIO SEMISOLIDO DE AGAR.....	94
8) ENSAYOS DE ACTIVIDAD MITOGENICA EFECTOS SOBRE LA SINTESIS DE DNA INDUCIDA EN CELULAS NRK-49F POR EGF E INSULINA.....	95
9) CROMATOGRAFIA DE EXCLUSION MOLECULAR.....	96

10) CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA PRESION.....	97
11) TRATAMIENTO DE LOS TEJIDOS PARA LOS ESTUDIOS DE RECEPTORES HORMONALES.....	98
12) PREPARACIONES DE MEMBRANA PARA LOS ESTUDIOS DE RECEPTORES DE FACTORES DE CRECIMIENTO.....	99
A) Obtención de receptores de EGF de membranas plasmáticas de placentas humanas a término.....	99
B) Tratamiento de los tejidos tumorales para la obtención de receptores para EGF e IGF-I. I) Obtención de membranas para receptores totales.....	99
II) Obtención de preparados de membrana libres de proteína transportadora de IGF-I.....	101
13) ESTUDIOS DE RECEPTORES PARA HORMONAS ESTEROIDEAS.....	102
14) ESTUDIOS DE RECEPTORES PARA EGF E IGF-I.....	103
A) Marcación y purificación de EGF.....	103
B) Marcación y purificación de IGF-I.....	104
C) Ensayos de radioligando receptor	

para EGF e IGF-1.....	104
15) ESTABILIZACION COVALENTE DE LOS COMPLEJOS HORMONA-RECEPTOR. ESTUDIOS CON REACTIVOS DE ENTRECRUZAMIENTO.....	106
16) ELECTROFORESIS Y AUTORADIOGRAFIA.....	107
17) RADIOINMUNOANALISIS DE EGF.....	108
18) RADIOINMUNOANALISIS DE IGF.....	109
19) DETERMINACION DE LA PRESENCIA DE LA PROTEINA TRANSPORTADORA DE IGF-I.....	110
 DESARROLLO DE METODOS EXPERIMENTALES PARA LA CARACTERIZACION BIOLOGICA DE TGFs.....	111
A) Actividad mitogénica de EGF e insulina sobre células NRK-49F. Ensayos de incorporacion de (³ H)timidina.....	111
B) Ensayo de radioligando-receptor para EGF.....	123
C) Aislamiento y purificación de TGF-β	

de plaquetas humanas.....	130
RESULTADOS.....	136
I) AISLAMIENTO, PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE FACTORES DE TRANSFORMACION EN NEOPLASIAS MALIGNAS HUMANAS.....	137
1) AISLAMIENTO DE FACTORES DE TRANSFORMACION DE NEOPLASIAS MALIGNAS HUMANAS.....	137
A) Determinación de la actividad transformante de los extractos ácido-alcohólicos de las neoplasias.....	137
B) Tratamientos físico-químicos de los extractos crudos.....	144
2) PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE TGFs DE NEOPLASIAS MALIGNAS HUMANAS.....	146
A) Purificación de los extractos ácido- alcohólicos de las neoplasias malignas por Cromatografía de Exclusión Molecular.....	146
B) Caracterización de los TGFs purificados.....	147
I) Ensayos de unión al receptor del EGF.....	147
II) Ensayos de actividad mitogénica y efectos en la síntesis de DNA inducida por EGF e insulina en células NRK-49F.....	148

II) AISLAMIENTO, PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE FACTORES DE CRECIMIENTO Y TRANSFORMACION EN TUMORES DE MAMA INDUCIDOS POR ACETATO DE MEDROXIPROGESTERONA EN HEMBRAS BALB/c. ESTUDIO DE RECEPTORES PARA EGF E IGF-I EN LAS CELULAS TUMORALES.....	156
A) INDUCCION DE ADENOCARCINOMAS DE MAMA POR MPA.....	157
1) INCIDENCIA.....	157
2) TRANSPLANTES SINGENEICOS DE LOS ADENOCARCINOMAS.....	158
B) AISLAMIENTO, PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE TGFs.....	168
1) EXTRACCION ACIDO-ALCOHOLICA DE TGFs DE LOS ADENOCARCINOMAS.....	168
2) PURIFICACION DE LOS EXTRACTOS POR CROMATOGRAFIA EN COLUMNAS DE BIO-GEL P-60.....	171
3) CARACTERIZACION DE LOS TGFs PURIFICADOS POR COLUMNA DE BIO-GEL P-60.....	173

A) Ensayos de competencia por los receptores del EGF.....	173
B) Ensayos de estimulación mitogénica/ inhibición de la síntesis de DNA inducida por EGF e insulina en las células NRK-49F.....	174
4) PURIFICACION DE LOS TGFs POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA PRESION EN COLUMNA DE INTERACCION HIDROFOBICA.....	176
5) BLOQUEO DE LA ACTIVIDAD BIOLOGICA DE LOS TGFs DE 13 Y 43 KDa.....	179
C) ESTUDIO DE LA PRESENCIA DE FACTORES DE CRECIMIENTO (IGF-I, EGF) Y DE SUS RESPECTIVOS RECEPTORES EN LOS ADENOCARCINOMAS.....	183
1) DETERMINACION DEL CONTENIDO DE EGF E IGF-I	184
2) DETERMINACION DE LA PRESENCIA DE EGF E IGF-I POR RIAs EN LAS FRACCIONES DE LAS COLUMNAS DE BIO-GEL.....	187
3) DETERMINACION DE LA PRESENCIA DE LA PROTEINA TRANSPORTADORA DE IGF-I.....	189

4) DETERMINACION DE RECEPTORES DE ESTROGENOS Y PROGESTERONA.....	190
5) DETERMINACION DE RECEPTORES PARA EGF EN LOS TEJIDOS TUMORALES.....	193
6) CARACTERIZACION ESTRUCTURAL DE LOS RECEPTORES PARA EGF EN LAS CELULAS TUMORALES.....	196
7) DETERMINACION DE RECEPTORES PARA IGF-I EN LOS TEJIDOS TUMORALES.....	201
8) CARACTERIZACION ESTRUCTURAL DE LOS RECEPTORES PARA IGF-I EN LAS CELULAS TUMORALES.....	208
DISCUSION.....	210
CONCLUSIONES.....	244
BIBLIOGRAFIA.....	250

INTRODUCCION

FACTORES DE CRECIMIENTO POLIPEPTIDICOS

Los factores de crecimiento polipeptídicos (GFs) constituyen un grupo de agentes regulatorios que están involucrados en el control de la proliferación y diferenciación celular (1).

Si bien el mecanismo de acción de los GFs no se conoce con exactitud, de acuerdo a los hallazgos realizados hasta el momento es evidente que la unión de GFs con receptores de membrana específicos inicia una cascada de respuestas celulares que involucran una serie de proteínas, además del GF y su receptor (2).

Los conocimientos actuales sobre GFs han permitido confirmar la relación existente entre las hormonas polipeptídicas y estos factores; sin duda, una de las evidencias más convincentes en favor de esta conexión es que ambos grupos deben interaccionar con receptores de membrana específicos para ejercer su efecto sobre las células (3). La caracterización molecular de los receptores para hormonas polipeptídicas y para GFs ha revelado semejanzas sustanciales en su organización estructural y en sus propiedades funcionales (4). Los estudios con reactivos de entrecruzamiento, anticuerpos monoclonales y finalmente el clonado y la secuenciación de los correspondientes cDNAs han establecido similitudes en los tamaños, estructura de las subunidades y homología en la secuencia de aminoácidos entre ambos grupos de receptores.

MECANISMO DE ACCION

Las respuestas funcionales de las células a los GFs son conocidas, pero los mecanismos por los cuales los factores de crecimiento desencadenan estas respuestas no han podido hasta el momento determinarse exactamente.

El complejo GF/receptor es capaz de inducir señales transmembranares que son amplificadas intracelularmente. En ciertos casos, se ha demostrado claramente que esto regula la expresión de distintos genes a nivel transcripcional o traduccional (1). Sin embargo, hay otra serie de procesos metabólicos que resultan afectados, usualmente en forma mas rápida que la expresión génica, lo que indica la participación de un sistema de segundos mensajeros. De acuerdo a las evidencias obtenidas con distintos GFs, los productos de clivaje de los fosfoinosítidos por la fosfolipasa C: el inositoltrifosfato y el diacilglicerol (DAG) podrían actuar como mensajeros intracelulares de la señal de los factores de crecimiento (5).

Otra consecuencia de la interacción entre el GF y su receptor es la inducción de la endocitosis de ambos, la que finalmente conduce a la lisis de factor y receptor (6). Todavía queda por establecer si alguno de los dos (directamente o en alguna forma alterada) tiene una participación en la transmisión de la señal.

RELACION ENTRE FACTORES DE CRECIMIENTO POLIPEPTIDICOS, TRANSFORMACION NEOPLASICA Y ONCOGENES

Los estudios de crecimiento celular en medios libres de suero han establecido que para la proliferación de células no neoplásicas es necesaria la acción sinérgica de múltiples GFs que actúan en distintos puntos del ciclo celular (7). A través de estos estudios se ha podido establecer que las células normales sin los GFs apropiados suspenden reversiblemente su crecimiento en la fase G_1/G_0 del ciclo celular. Por el contrario, las células transformadas pueden proliferar en ausencia de esos GFs (8). Se ha postulado así que la independencia de factores de crecimiento y el crecimiento autónomo de las células neoplásicas se debería a la expresión constitutiva de alguno de los agentes mitogénicos normales del ciclo celular: factores de crecimiento, receptores para estos o algunas de las señales intracelulares que conducen a la síntesis del DNA (8).

Otra evidencia en favor de la relación de GFs y transformación maligna surge de los actuales conocimientos sobre oncogenes. En 1983 Waterfield y col. y Doolittle y col. (9,10) establecieron la homología existente entre la secuencia de aminoácidos de la cadena B del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y la proteína p28^{sis} producto del oncogen viral sis (virus del sarcoma de simios). La secuencia correspondiente al protooncogen c-sis humano y la de la cadena B del PDGF son idénticas. Otro oncogen, el erb-B (virus de la eritroblastosis de

aves) codifica para el receptor de un factor de crecimiento: la proteína gp65^{erb-B} tiene una secuencia homóloga a la de los dominios de transmembrana e interno del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF) (11). En 1985 Mulcahy y col. (12) establecieron que la proteína p21 producto del oncogen ras está involucrada en la transducción de la señal de los factores de crecimiento. Se considera que p21 cumpliría una función análoga a la subunidad G regulatoria en la transducción de la señal de las hormonas proteicas que actúan via AMPc, conectando el receptor de los GFs con la fosfolipasa C.

Por otra parte, existe una importante homología en la secuencia de aminoácidos de las proteínas producto de oncogenes con actividad de tirosina quinasas y el dominio con función de tirosina quinasa de algunos receptores de GFs (13). Se conoce además que ciertos GFs aumentan la transcripción de los proto-oncogenes c-myc y c-fos, cuyos productos son proteínas nucleares (14,15).

Relacionando la función de los productos de oncogenes con el mecanismo de acción de los factores de crecimiento (16) se considera que aquellos pueden estar involucrados en la transformación maligna de distintas formas: el producto de un oncogen puede ser I) un factor de crecimiento que estimula por un mecanismo autocrino la proliferación celular, II) una forma alterada en su estructura o en su número del receptor de un GF, de tal manera que este receptor esté constitutivamente activado, III) un sustrato intracelular del receptor de GFs alterado en su naturaleza

molecular o en su número produciendo esto una estimulación continua para la síntesis de DNA, IV) una proteína nuclear involucrada en la activación del DNA.

CLASIFICACION DE FACTORES DE CRECIMIENTO

El estado actual del conocimiento de factores de crecimiento polipeptídicos permite agruparlos en varias familias que se describen en la Tabla 1.

TABLA 1

A PDGF

PDGF (Factor de crecimiento de plaquetas)

ODGF (Factor de crecimiento de osteosarcoma)

GDGF (Factor de crecimiento de glioma)

B EGF

EGF (factor de crecimiento epidérmico)

C IGFs

IGF-I (Factor de crecimiento semejante a la insulina
tipo I, Somatomedina C)

IGF-II (Factor de crecimiento semejante a la insulina
tipo II, Actividad estimulante de la multiplica-
ción)

D TGF- α

TGF- α (Factor de transformación tipo alfa)

TGF- β (Factor de transformaciom tipo beta)

Otros TGFs

E FGF

aFGF (Factor de crecimiento de fibroblastos ácido)

bFGF (Factor de crecimiento de fibroblastos básico)

PDGF

ESTRUCTURA Y PRECURSOR

El PDGF es un polipéptido catiónico glicosilado de peso molecular 30-35 KDa, estable frente al calor y al ácido. Se almacena en los gránulos α de las plaquetas y constituye la actividad mitogénica más importante del suero sobre células de origen mesenquimal (17,18).

Aunque la composición de la molécula del PDGF aislada de plaquetas humanas no se conoce con exactitud, las observaciones de distintos grupos de trabajo indican que es un heterodímero formado por una cadena A de PM 14-18 KDa (la heterogeneidad en el tamaño de esta cadena refleja probablemente distinta degradación de los extremos y diferencias en la glicosilación) y una cadena B de PM 18 KDa, unidas por puentes disulfuro (19). La posibilidad de que el PDGF sea una mezcla de dos homodímeros no ha sido descartada, principalmente después del aislamiento y purificación del PDGF de plaquetas porcinas, que resultó ser un homodímero B-B (20). La cadena B se encuentra codificada en el proto-oncogen c-sis, cuyo transcripto es un mRNA de 4.2 kb (9, 10). Parte del locus del c-sis humano ha sido clonado. Este gen está localizado en el cromosoma 22 (21).

El estudio del c-sis clonado demostró la existencia de una secuencia de nucleótidos lo suficientemente larga como para codificar para una proteína de 27 KDa (241 aminoácidos) (22).

De esta forma, un dímero de cadenas pro-B sería una proteína de 54 KDa y probablemente la glicosilación de las cadenas polipeptídicas aumentaría este PM. Una de las características más interesantes de la cadena B del PDGF es su homología con la proteína p28^{ras} producto del oncogen viral v-sis del virus del sarcoma de simios (9,10).

La secuencia aminoacídica completa de la cadena A se ha deducido del cDNA clonado y en humanos el gen ha sido localizado en el cromosoma 7. Este polipéptido muestra una homología del 50% con el precursor de la cadena B (23).

SINTESIS DE PDGF Y FACTORES RELACIONADOS

El PDGF se sintetiza en los megacariocitos y se almacena en los gránulos α de las plaquetas (24).

Otras células capaces de secretar PDGF son los monocitos y los macrófagos activados. Estas células en cultivo liberan al medio factores de crecimiento para fibroblastos, fibras de músculo liso y células endoteliales. Se ha demostrado que del 60 al 70% de esta actividad mitogénica está constituida por PDGF o factores relacionados (25). A diferencia de las plaquetas los monocitos no almacenan cantidades significativas del factor (25).

Las células endoteliales en cultivo (26) secretan PDGF o

factores relacionados a pesar de que en ellas no han podido detectarse receptores para PDGF. Cultivos de células endoteliales de cordón umbilical humano y de aorta bovina expresan un mRNA de 3.5-3.7 kb que hibridiza con un "probe" para el oncogen c-sis (27).

En sangre no se han detectado cantidades mensurables de PDGF (28). Esto puede deberse a que el PDGF es rápidamente depurado del plasma o bien que las células endoteliales sintetizan bajos niveles de PDGF "in vivo". Así, las células de endotelio de aorta bovina o de cordón umbilical humano, obtenidas del tejido fresco e intacto, contienen respectivamente un 1.3 o un 10% del mRNA de 3.5-3.7 Kba respecto de las mismas células en cultivo (27).

También se han identificado en cultivos de células de músculo liso (29) moléculas semejantes al PDGF. La producción de estos factores podría estar relacionada con el estado de crecimiento dado que cultivos de células de músculo liso de aorta de ratas de 2 semanas de edad liberan cantidades significativamente mayores de PDGF que los cultivos de estas mismas células de ratas adultas. En contraste, el número de receptores para PDGF es mayor en las células adultas (29). Estos resultados sugieren una función autocrina o paracrina para el PDGF y los mitógenos relacionados en: I) el desarrollo y la regulación de la pared de los vasos, II) la migración y las respuestas mitogénicas de los com-

ponentes celulares involucrados en la reparación de heridas, III) las lesiones proliferativas de la aterosclerosis en el hombre y IV) potencialmente en diversas enfermedades como la fibrosis pulmonar, la mielofibrosis y la artritis reumatoidea (30).

En citotrofoblastos de placenta humana ha sido aislado el mRNA de 4.2 kb correspondiente al gen *c sis* y se ha demostrado que explantos de placentas sintetizan un factor de crecimiento semejante al PDGF (31). Además, líneas celulares obtenidas de placentas del tercer trimestre expresan receptores de superficie para el PDGF y responden a PDGF exógeno con un aumento en la síntesis de DNA y con la activación del oncogen *c-myc* (31). Dado que los trofoblastos son las células normales más invasivas y proliferativas que se conocen la expresión de receptores para PDGF en este tejido y la producción endógena de PDGF podría determinar una estimulación autocrina en estas células que sería la responsable del fenotipo "pseudomaligno" de las mismas (32).

EFFECTOS BIOLÓGICOS

El PDGF estimula el crecimiento en cultivo de fibroblastos, fibras de músculo liso y células de la glía; actúa también como quimiotáctico para monocitos, polimorfonucleares, fibroblastos, leucocitos y células de músculo liso (30).

PDGF tiene además efectos metabólicos sobre células en cultivo. Uno de los primeros eventos después del tratamiento de las células con el factor es el aumento de la entrada de Na^+ y la salida de H^+ (33). Segundos después de la estimulación con PDGF se produce una disminución transitoria del pH, seguida por una posterior elevación del mismo en 0.2-0.4 unidades (34). Uno de los factores considerados capaces de producir competencia en las células es la alcalinización transitoria, sin embargo, no hay evidencias que establezcan que la alcalinización producida por el PDGF sea esencial para la proliferación celular (35).

Pocos segundos después del tratamiento de las células con PDGF se observa liberación de Ca^{2+} de sus reservas intracelulares, encontrándose este fenómeno asociado con un aumento en el recambio de fosfatidilinosítoles (36,37,38). Esto hace pensar que tanto el Ca^{2+} como los fosfoinosítidos participan en la transducción de la señal de PDGF. Este factor también aumenta los niveles de ácido araquidónico, un precursor en la síntesis de prostaglandinas y leucotrienos y de diacilglicerol, un activador de la proteína quinasa C (39).

Se ha demostrado además que el PDGF aumenta el transporte de aminoácidos, la fosforilación de residuos serina en la proteína S6 ribosomal y reordenamiento en los filamentos de actina (40,41,42).

PDGF aumenta la síntesis de proteínas (40) y un hallazgo importante en favor del papel que se atribuye al PDGF en el proceso de curación de heridas es que aumenta la síntesis y

liberación de colágeno tipo V y regula la síntesis de colágeno III y IV (43).

PDGF modula los receptores de membrana de otros factores de crecimiento. Se ha observado un aumento en la expresión de los receptores de membrana para Somatomedina C (IGF-I) y un aumento en la secreción de factores semejantes a IGF-I en fibroblastos tratados con PDGF (44,45). La preincubación de fibroblastos Balb/c3T3 con PDGF modula la unión subsiguiente del factor de crecimiento epidérmico (EGF) a sus receptores, determinando una disminución en la afinidad (46). Este, es un efecto semejante al inducido por los ésteres de forbol en el receptor del EGF y sugiere que la proteína quinasa C podría ser un intermediario común en la influencia del PDGF y los ésteres de forbol sobre dicho receptor (47).

RECEPTOR

En una variedad de células de origen mesenquimal se han encontrado receptores para el PDGF (48,49,50,51). Sin embargo, las únicas células de origen epitelial que poseen receptores para el factor son los citotrofoblastos de placenta (31,32).

El receptor del PDGF es una glicoproteína integral de membrana de 185 KDa (48,50) y se ha demostrado que como resultado de la unión del factor se fosforilan residuos tirosina en la molécula de dicho receptor (51). Este receptor activado actúa a su vez como proteína quinasa tirosina específica (41,52). La actividad de tirosina quinasa es semejante a la descrita para los receptores de otros factores de crecimiento como el EGF, la insulina y el factor de crecimiento semejante a la insulina tipo I (IGF-I) (53,54,55). Todos estos receptores cuando son activados por la unión del ligando, además de autofosforilarse, fosforilan sustratos celulares; muchos de éstos también son fosforilados por las proteínas producto de oncogenes con actividad de proteína quinasas (56,57). Por ejemplo, una proteína de 36KDa, tentativamente identificada como una subunidad de la málico deshidrogenasa, puede ser un sustrato para la proteína producto del oncogen src, y para el EGF (58). Además, el EGF y el PDGF fosforilan una proteína de 39 KDa que también está fosforilada en varias células transformadas por virus (59). Otra proteína de 42 KDa, se fosforila tanto por efecto del EGF, como del PDGF y de los ésteres de forbol (60).

Investigaciones recientes se han ocupado de dos proteínas periféricas de membrana denominadas p35 y p36.

p36 se encuentra fosforilada en tirosina en muchas células transformadas por virus y en células estimuladas por factores de crecimiento y se la conoce como calpactina I. La proteína p35 a la que se denomina calpactina II es la proteína con mayor grado de fosforilación en tirosina en células malignas A 431 tratadas con EGF (61). Las lipocortinas son un tipo de proteínas inducibles por esteroides que originariamente se pensó que inhibían a la fosfolipasa A₂. Actualmente, se sabe que la lipocortina I es idéntica a calpactina II y la lipocortina II y calpactina I son altamente homólogas. Hasta el momento no se ha determinado que la fosforilación de estas dos proteínas afecte actividades celulares específicas en las células transformadas por virus o estimuladas por factores de crecimiento (62).

Además de la activación de tirosina quinasas por PDGF, este factor también induce la activación de serina/treonina quinasas cuando se una a sus receptores de superficie (59). Por ejemplo el suero y el PDGF inducen la fosforilación en residuos serina de la proteína ribosomal S6 (63).

También se ha demostrado que el PDGF activa a la proteína quinasa C (64); ésto serviría para generar segundos mensajeros y sería responsable de muchos de los eventos inducidos en las células estimuladas por PDGF, incluyendo el aumento del influjo de Na⁺, del pH intracelular y de la actividad de la bomba Na⁺-K⁺ (65,66,67). Sin embargo, estos eventos también son estimula-

dos por mitógenos que no activan a la proteína quinasa C (33,68)

La incubación de las células con el PDGF disminuye el número de receptores de superficie para el factor (69).

Se ha clonado y secuenciado el cDNA completo que codifica para el prerreceptor del PDGF (70). La secuencia aminoacídica deducida ha revelado una importante homología con el producto del oncogen v-kit y con el del oncogen c-fms, este último, sería el receptor para el factor estimulante de colonias macrofágicas (CSF-1) (70).

Esas proteínas tienen en común largas secuencias que interrumpen el dominio de tirosina quinasa (70). Además, los receptores del PDGF y del CSF-1 tienen en común una homología en la localización de los residuos cisteína extracelulares, el dominio hidrofóbico anclado a la membrana citoplasmática y el extremo carboxi-terminal intracitoplasmático (70).

El gen para el receptor del PDGF está localizado en el cromosoma 5 en el genoma humano (70).

GENES INDUCIDOS POR PDGF

Diferentes genes son inducidos en las células poco tiempo después de la estimulación con PDGF. El gen KC que aparentemente codifica para una proteína de 10 KDa (71) y el gen JE que codifican para una proteína de 19 KDa (71), son activados por PDGF. Se ha observado un aumento de 10 a 20 veces respecto del nivel basal del mRNA para JE y un aumento también, aunque menor para el mRNA del gen K (71).

Ambos genes, cuya función no se conoce, sufren solamente una activación pasajera.

Otros genes inducidos por el PDGF son el protooncogen c-myc y el protooncogen c-fos (72). Los mecanismos por los cuales estos protooncogenes inducen proliferación celular son desconocidos.

RELACION ENTRE EL PDGF, ONCOGENES Y TRANSFORMACION MALIGNA

Hemos mencionado antes la relación existente entre la cadena B del PDGF y la proteína p28^{v-sis} producto del oncogen viral v-sis (virus del sarcoma de simios) (9,10). En efecto, los 109 residuos aminoacídicos N-terminales de la cadena B son virtualmente idénticos a la secuencia deducida para el extremo carboxi-terminal de la proteína p28^{v-sis}; solamente se han encontrado tres

aminoácidos sustituidos (9,10). Dado que la secuencia deducida para el oncogen c-sis es idéntica a la de la cadena B, las sustituciones pueden representar diferencias entre el mono y el hombre o bien entre el v-sis y el c-sis (9,10).

El análisis del procesamiento intracelular de la proteína p28^{v-sis} en células de mono transformadas por el virus del sarcoma de simios (SSV) ha demostrado que este primer producto traduccional (p28^{v-sis}) se dimeriza rápidamente para dar la proteína p56^{v-sis}. Este producto se procesa posteriormente por clivaje proteolítico para dar el péptido final aparentemente estable, p24^{v-sis}, que ha perdido los extremos N-terminal y C-terminal (73). P24^{v-sis} es semejante en su estructura a un homodímero B-B del PDGF (73).

La identidad virtual entre p24^{v-sis} y la cadena B ha evidenciado que el virus del sarcoma de simios ha adquirido secuencias del DNA celular que están contenidas en el gen que codifica para la cadena B del PDGF (74). Las secuencias celulares adquiridas por el SSV han sido insertadas en el gen de la proteína de envoltura del retrovirus (env), cerca del extremo 3' del genoma viral (74). Dado que la proteína v-sis no tiene un dominio capaz de anclarse a la membrana plasmática, tiene la potencialidad de ser secretada, particularmente en las células que carecen del sistema de gránulos α para almacenarla.

Dada la homología entre la proteína p28^{v-sis} y la cadena B del PDGF, se investigó la posible actividad mitogénica de la proteína producto del v-sis. Se observó que en efecto, lisados de células

transformadas por SSV poseen actividad mitogénica para fibroblastos normales, la cual puede ser parcialmente neutralizada por anticuerpos anti-PDGF (39). Además, la mayoría de los medios de cultivo de las células transformadas por SSV contienen actividades mitogénicas semejantes al PDGF (75). Por otra parte, la habilidad de la proteína v-sis sintetizada en bacterias de competir para unirse a los receptores de PDGF es otra evidencia de similitudes funcionales entre ambas proteínas (75). Todos estos datos son consistentes con la hipótesis que postula que la proteína producto del v-sis entra en camino de secreción celular e interactúa con los receptores de PDGF en una forma autocrina, causando así, un crecimiento incontrolado de las células transformadas (39). Sin embargo, aun no se ha podido establecer que este mecanismo sea el responsable de la transformación neoplásica. Además, estudiando líneas celulares derivadas de tumores humanos que producen PDGF, y de células transformadas por el SSV se ha visto que el agregado de anticuerpos anti PDGF no bloquea la proliferación de estas células (76). Sin embargo, este hallazgo no invalida la hipótesis anterior ya que podría suceder que la proteína v-sis interactuase con los receptores recientemente sintetizados del PDGF intracelularmente y que los receptores unidos al ligando fuesen inmediatamente internalizados, no estando así accesibles para el anticuerpo. El hecho que mutantes con deleciones en el gen env, específicamente en la secuencia que codifica para el péptido señal de la proteína de envoltura, no sean transformantes (77) demuestra que la proteína v-sis debe

entrar en el camino de secreción celular para transformar. La presencia de receptores para el PDGF parece ser un requisito indispensable para la transformación de células por la proteína v-sis, dado que el SSV sólo transforma células que presenten receptores para el PDGF (células de la glia, mioblastos y fibroblastos) (76). Las células transformadas por el SSV también presentan menos receptores para el PDGF, lo cual se interpreta como un bloqueo de los receptores del PDGF por la proteína v-sis (76). De igual forma, el número de receptores en las células de tumores humanos que producen PDGF es menor que en las células tumorales que no producen PDGF o que en las células normales del mismo tipo histológico, lo que también indica un posible bloqueo o "down regulation" de los receptores (19).

Otra de las cuestiones que deben ser determinadas es el motivo por el cual siendo la estructura del PDGF tan semejante a la de la proteína v-sis esta última produce transformación y no el PDGF. En primer lugar debe mencionarse que el agregado de PDGF exógeno a fibroblastos 3T3 induce algunos de los cambios morfológicos asociados a la transformación maligna (77). Así, para explicar las diferencias en la capacidad transformante de ambas proteínas se ha postulado que el PDGF producido endógenamente es más efectivo para producir transformación que el exógeno (39). Otra explicación posible es que la producción continua de PDGF a través de todo el ciclo celular podría dar una señal distinta que aquella proporcionada por una administración exógena aguda (39).

FACTORES DE CRECIMIENTO SEMEJANTES AL PDGF

En 1980 Heldin y col (78) identificaron en el medio de cultivo de la línea de osteosarcoma U-2 OS un factor de crecimiento relacionado con el PDGF al que llamaron factor de crecimiento derivado de osteosarcoma(ODGF). Sus propiedades fisicoquímicas son semejantes a las del PDGF y tiene reacciones inmunológicas cruzadas con anticuerpos anti-PDGF.

En 1984 Nister y col (79) encontraron en el medio condicionado de células de glioma humano un factor relacionado con el ODGF y lo llamaron GDGF.

Tanto el ODGF como el PDGF tienen pesos moleculares de 31 KDA están compuestos por dos cadenas polipeptídicas del mismo PM y estructuralmente están mas relacionados con el PDGF que con la proteína v-sis.

EGF

CARACTERISTICAS GENERALES Y ACTIVIDAD BIOLOGICA

El factor de crecimiento epidérmico (EGF) fue aislado en 1962 por Cohen y col. de glándula submaxilar de ratón (80). La primera actividad biológica descrita para este factor fue la apertura precoz de los párpados y la erupción de los incisivos en ratones de 7 días que habían sido tratados diariamente con extractos de glándula submaxilar de ratón (80).

Los estudios histológicos de estos animales demostraron que las actividades inducidas en el desarrollo se correlacionaban con un aumento en la proliferación y diferenciación de células en la epidermis y por eso al péptido presente en el extracto se lo llamo factor de crecimiento epidérmico (EGF) (81).

En 1975 Cohen y Carpenter (82) aislaron EGF de orina humana, lo purificaron y secuenciaron y comprobaron la existencia de una importante homología en la secuencia aminoacídica del factor humano y de ratón y también, que ambos poseían las mismas actividades biológicas. Poco tiempo después, Gregory aisló y secuenció la urogastrona, hormona que inhibe la secreción ácida gástrica. La secuencia de la urogastrona y del EGF resultaron ser idénticas (83).

Los niveles de EGF han sido determinados en varios fluidos humanos, siendo elevados en leche, orina y saliva y bajos en suero (84,85).

A pesar de que no se conoce hasta el momento el papel fisiológico del EGF la administración de este factor a animales produce una serie de respuestas en la piel y otros órganos: 1) aumento en la proliferación y queratinización del tejido epidérmico en ratones recién nacidos (80), 2) aumento en la proliferación y diferenciación del epitelio pulmonar en fetos de cordero (81), 3) estimulación de la regeneración del epitelio de la córnea en conejo (86), 4) aumento en la actividad de la ornitina decarboxilasa en ratón (87), 5) hipertrofia e hiperplasia hepática en rata (88), 6) retardo en el desarrollo del ovario en ratón (89), 7) inhibición de la secreción ácida gástrica en perro, rata y gato (90,91).

EGF actúa como un potente mitógeno para células epiteliales y mesenquimales en cultivo (92,93). Además, ha quedado demostrada su acción sinérgica en la estimulación de la proliferación celular con otros factores de crecimiento. EGF actúa en forma sinérgica con insulina sobre células NRK-49F y AKR-2B (94,95) y con PDGF sobre células Balb/c3T3 (96).

Se ha demostrado también (97) la participación del EGF en la estimulación de la fase meiótica de la espermatogénesis en ratón.

ESTRUCTURA Y PRECURSOR

El EGF es un polipéptido compuesto por 53 residuos aminoácidos , con tres puentes disulfuro intracatenarios y un peso molecular de 6000 Da (98). Este factor se sintetiza a partir de un precursor; la secuencia nucleotídica de este último, deducida del correspondiente cDNA de una biblioteca de glándula submaxilar de ratón, predice un polipéptido de 1186-1217 aminoácidos y peso molecular 128 KDa (99). El EGF se encuentra codificado en los residuos 977-1029, próximo al extremo C-terminal (100). La proteína precursora contiene un dominio interno hidrofóbico de 20 aminoácidos entre dos regiones polares y en ella están codificados 7 péptidos relacionados con el EGF (101). El precursor podría ser una proteína integral de membrana pero se desconoce como es procesado para dar el EGF maduro.

Originariamente se pensó que el EGF tenía un expresión tisular limitada, pero recientes estudios de hibridización "in situ" han demostrado la presencia del mRNA precursor en distintos tejidos de ratas recién nacidas (101). Los túbulos distales del riñón, por ejemplo, presentan una importante expresión de este mRNA y la proteína correspondiente permanece como precursor de alto PM, no encontrándose EGF de 6 KDa (101). Además se ha demostrado la presencia de EGF de alto PM en orina y otros fluidos humanos (102,103).

PEPTIDOS RELACIONADOS CON EL EGF

El factor de transformación tipo alfa (TGF- α), un factor de crecimiento con características únicas dado que es capaz de conferir un fenotipo neoplásico a células no transformadas, presenta una homología del 40% en su secuencia aminoacídica con el EGF (104). Además, TGF- α se une a los receptores de membrana del EGF y es capaz de ejercer los mismos efectos biológicos que el EGF (105). TGF- α ha sido aislado fundamentalmente de tejidos neoplásicos y embrionarios.

Un segundo factor polipeptídico semejante al EGF fue aislado de células infectadas por el virus de vaccinia, tiene 77 residuos aminoacídicos y a semejanza del EGF se sintetiza como un precursor de alto PM (106).

RECEPTOR DEL EGF, RELACION CON ONCOGENES Y TRANSFORMACION NEOPLASICA

El receptor del EGF es una glicoproteína integral de membrana, que posee actividad intrínseca de proteína quinasa (107).

La unión del EGF a su receptor fosforila residuos tirosina en la molécula de este último, produciéndose así una importante elevación en la actividad de tirosina quinasa del receptor (108). El principal sitio de autofosforilación de este receptor es el residuo tirosina 1173, localizado cerca del extremo C-terminal (109).

Los estudios de clivaje proteolítico muestran que aproximadamente 115 KDa del receptor se encuentran localizados en la zona extracelular, encontrándose aquí el dominio de unión del EGF, altamente glicosilado (110). La mitad de los 1186 residuos aminoácidos de este receptor se encuentran en el interior de la célula. En este dominio intracelular, una banda de 250 aminoácidos presenta una importante homología con el dominio catalítico de la familia de proteínas producto de oncogenes, con actividad de tirosina quinasa (110).

Los dominios interno y externo se encuentran separados por una región de 26 aminoácidos que carece de residuos cargados y que está anclada a la membrana plasmática (110).

Se ha demostrado que la unión del EGF a su receptor en la superficie celular induce la disminución del número de receptores de membrana ("down regulation") (111).

También, se conoce actualmente que la proteína quinasa C modifica la actividad del receptor del EGF. En efecto, esta proteína quinasa fosforila al receptor en el residuo treonina 654 (112,113). Como resultado de este evento se produce una disminución de la afinidad del receptor por el EGF y de la actividad de tirosina quinasa (112,113). Los ésteres de forbol, promotores tumorales que actúan estimulando la proteína quinasa C, son capaces de producir estos mismos efectos(113). Así, se ha sugerido que la fosforilación del receptor por la proteína quinasa C podría ser un mecanismo de regulación del mismo. (113) Los residuos 551 a 1154 del receptor muestran un 90% de homología con la secuencia de la proteína gp65^{v-erbB}, producto del oncogen v-erb B del virus de la eritroblastosis de aves (AEV) (114).

La proteína producto del v-erb B es una forma truncada del receptor que carece prácticamente en su totalidad del dominio extracelular, donde se encuentra el sitio de unión del EGF, y conserva los dominios de transmembrana e intracelular (114).

Así, en el extremo N-terminal solamente permanecen 61 residuos aminoacídicos comparados con los 622 del receptor del EGF. También presenta una pequeña delección en el extremo C-terminal que involucra el principal sitio de autofosforilación del receptor (115).

La proteína producto del v-erb B está presente en las células infectadas por el virus de la eritroblastosis de aves en varias formas. "In vitro", el primer producto translacional es una proteína de 61 KDa. Esta, es glicosilada post-translacional-

mente dando un producto inmaduro de 64-68 KDa que está asociado a membrana y que aparentemente se acumula en el aparato de Golgi antes de llegar a la superficie celular (116). En el Golgi se producen posteriores modificaciones del árbol de hidratos de carbono y la proteína hallada en la superficie celular tiene un PM de 75-80 KDa(117). Células infectadas con mutantes condicionales del AEV no presentan esta proteína en su membrana a la temperatura restrictiva(117). Esto indica que la forma de membrana es importante en el proceso de transformación (117).

Una de las hipótesis para explicar la transformación inducida por AEV es que la proteína gp65^{erb-B} en ausencia del dominio regulatorio de unión del EGF actuaría como un receptor activado constitutivamente. No obstante lo cual hay varias consideraciones que deben hacerse a esta hipótesis. Una de las primeras objeciones que se hicieron derivó de la dificultad para demostrar "in vitro" la actividad de tirosina quinasa de la proteína del v-erb-B. Sin embargo, actualmente se ha demostrado la existencia de esa actividad. Además, en las células transformadas por los retrovirus de la familia src que poseen genes que codifican para tirosina quinasa, esta actividad se evidencia por el aumento de fosfotirosina celular y se han identificado proteínas foriladas en tirosina (118). En contraste, en las células transformadas por el AEV, solo se han detectado pequeños aumentos en los niveles de fosfotirosina (117). Esto podría ser suficiente para explicar la transformación si involucrase justamente un grupo de sustratos clave.

En las células transformadas por el AEV se han detectado algunas de las mismas proteínas fosforiladas en tirosina que se han identificado en las células tratadas con el EGF, entre éstas la proteína p36, una de las lipocortinas y la proteína p42 (119, 120).

RECEPTOR DEL EGF EN TUMORES HUMANOS

El receptor del EGF ha sido localizado en humanos en el cromosoma 7 (98). Varios tipos de tumores humanos han demostrado poseer anomalías en este receptor. En carcinomas epidermoides de distinto tipo, principalmente de la cabeza y el cuello y en gliomas se ha detectado amplificación del gen del receptor del EGF (115). En la línea A-431, de carcinoma epidermoide de vulva, se ha demostrado además de una amplificación de cincuenta veces de los receptores del EGF, una forma anómala del receptor que posee el dominio de unión pero carece de los dominios de transmembrana e interno (121).

El mecanismo por el cual estas alteraciones en el receptor podrían contribuir al desarrollo tumoral no se conocen.

Sin embargo, se ha postulado que la amplificación del receptor podría determinar una activación constitutiva de la tirosina quinasa asociada al mismo (115).

FACTORES DE CRECIMIENTO SEMEJANTES A LA INSULINA (IGF-I, IGF-II)

GENERALIDADES

En 1967 Temin (122) observó que la actividad mitogénica del suero sobre cultivos de fibroblastos de aves y de ratón podía ser reemplazada por insulina. Sin embargo, la concentración de ésta en suero no era suficiente para explicar el efecto mitogénico. Así, se pensó que en el suero debían existir actividades relacionadas con la insulina capaces de estimular la proliferación celular. En 1973 Dulak y Temin aislaron del medio condicionado de una línea de células de hígado de rata, BRL, un factor de crecimiento al que denominaron actividad estimulante de la multiplicación (MSA) (123). Marquard y col. encontraron que MSA era el equivalente en rata de la somatomedina A de humanos o factor de crecimiento semejante a la insulina tipo II (IGF-II). (124).

Otro polipéptido relacionado, somatomedina C o factor de crecimiento semejante a la insulina tipo I (IGF-I) fue descrito por Clemmons y col (125).

IGF-I es producido en respuesta a la hormona de crecimiento (GH) y es uno de los mitógenos más importantes del suero (126). La primera hipótesis que postulaba que IGF-I era producido en hígado por estímulo de GH y era luego secretado actualmente ha sido revisada y expandida. Estudios recientes han demostrado que IGF-I inumoreactivo está presente en una variedad de tejidos en

concentraciones muy altas y se ha localizado el mRNA correspondiente a IGF-I en una variedad de tejidos (127). Así, el IGF-I producido localmente podría ejercer funciones de estimulación paracrina o autocrina, además de su efecto endocrino como mediador de la hormona de crecimiento (127).

Se ha demostrado que IGF-II también es producido en varios tejidos, pero su función y la regulación de su producción aun deben determinarse (128). No existen evidencias de que la hormona de crecimiento estimule su secreción, dado que no se detecta aumento en las concentraciones séricas de este factor en enfermedades como la acromegalia, sin embargo hay cierta disminución de su concentración en enfermedades que involucran deficiencias en la secreción de GH (129).

Los IGFs circulan en plasma unidos en forma no covalente con proteínas transportadoras (130).

Los estudios de la síntesis y regulación de los IGFs en fibroblastos de rata indican que IGF-II sería la forma embrionaria del factor, mientras que IGF-I sería la adulta (131). En efecto, los niveles de IGF-II en suero fetal de rata son 10 a 100 veces más altos que en el suero materno y disminuyen días después del nacimiento. IGF-I exhibe un desarrollo inverso: sus niveles son bajos en el recién nacido y alcanzan el nivel adulto a las cuatro semanas (131).

Trabajos recientes han aportado evidencias en favor del rol autocrino o paracrino de los IGFs en el desarrollo fetal de la rata (131).

ESTRUCTURA Y PRECURSOR

IGF-I ha sido purificado de suero humano y se lo ha secuenciado (132). Esta compuesto por una sola cadena polipeptídica de 70 residuos aminoacídicos con 3 puentes disulfuro intracatenarios (132). Ha sido preparado en cantidades de miligramos por síntesis en fase sólida (133). En la actualidad se dispone comercialmente de IGF-I recombinante, que es idéntico al factor humano, excepto por la sustitución de metionina por isoleucina en el residuo 59. IGF-II está compuesta por 67 residuos aminoacídicos (134).

El cDNA, clonado de una biblioteca de hígado humano adulto, indica que ambos factores se sintetizan a partir de precursores de 15 a 21 KDa (134,135,136); el IGF-I tiene un precursor de 130 residuos, mientras que IGF-II tiene un precursor de 180 aminoácidos. Los genes de IGF-I e IGF-II han sido mapeados en el genoma humano; IGF-I se localiza en el cromosoma 12 e IGF-II en el 11, el mismo donde se localiza la insulina (137,138).

RECEPTORES DE IGFs Y SU RELACION CON ONCOGENES

Los receptores de superficie para el IGF-I muestran una gran homología con el receptor de la insulina. Este último es una

glicoproteína integral de membrana de peso molecular 350,000-400,000 Da, formada por dos subunidades α (120,000 Da) y dos β (90,000 Da) unidas por puentes disulfuro (139,140,141). En la subunidad α se localiza el sitio de unión de la insulina (139, 140). Cuando ésta se une al receptor de membrana se fosforilan residuos tirosina en la subunidad β y este receptor activado actúa a su vez como tirosina quinasa sobre otras proteínas celulares (139,140). Los estudios de fosforilación de péptidos intracelulares por el receptor activado indican que posee una especificidad de sustratos similar a la exhibida por otros factores de crecimiento como el EGF, y por las tirosina quinasa productos de los oncogenes de la familia src (139,140,141). La subunidad β posee además un sitio de unión de ATP (140). Se ha demostrado que las cadenas α y β derivan de un solo precursor polipeptídico glicosilado de peso molecular aparente 190,000 Da. Este precursor es transportado del retículo endoplasmático al aparato de Golgi luego es glicosilado, clivado y finalmente es transportado a la membrana plasmática (140). Como ambas subunidades del receptor están glicosiladas y la subunidad β contiene el sitio de unión del ATP, es probable que partes de ambas estén expuestas en la superficie celular y que la subunidad β atraviese la membrana plasmática.

La secuencia aminoacídica completa del precursor del receptor de la insulina humana ha sido deducida del cDNA clonado de una biblioteca de placenta humana (140). El precursor posee 1370 residuos aminoacídicos, comienza con una secuencia señal de 27

aminoácidos, sigue la subunidad α del receptor, luego una secuencia que probablemente sea el sitio de reconocimiento para las enzimas proteolíticas de procesamiento y finalmente la subunidad β conteniendo una secuencia de transmembrana de 23 aminoácidos.

La estructura primaria deducida para la cadena α carece de un dominio hidrofóbico suficientemente largo como para que pueda estar anclada a la membrana (140). Por esto, se considera que se encuentra solamente en el dominio extracelular unida a la subunidad β por puentes disulfuro.

La presencia de un dominio de transmembrana en la cadena β , análogo al del receptor para el EGF y el receptor para lipoproteína de baja densidad (LDL) (98,107,108,109), indica que el extremo N-terminal de esta subunidad está expuesto en la superficie celular, mientras que en el C-terminal se localiza en el dominio intracitoplasmático (140).

Si bien el sitio de unión de la insulina se encuentra en la cadena α del receptor, no se ha descartado que el extremo N-terminal de la cadena β esté involucrado.

La subunidad α contiene una región muy rica en residuos cisteína, similar a la existente en los receptores del EGF y de LDL (98,107,108,109).

La semejanza entre los receptores de insulina y EGF reside además de en su organización en su secuencia aminoacídica. Los primeros 444 residuos de la cadena α del receptor de la insulina presentan una homología del 37% con los primeros residuos del receptor del EGF (107,108,109). Por otra parte, también hay

homología en la secuencia de aminoácidos en la región de unión del ATP de la cadena β del receptor de insulina, la región intracitoplásmica análoga del receptor del EGF, el dominio catalítico de las proteínas producto de oncogenes de la familia src, y el producto del oncogen v-fms (107,108,109,142,143). Recientemente, se ha descrito que la homología es aun mayor con el producto del oncogen ros (140).

El receptor para IGF-I es homólogo al receptor de insulina, habiéndose detectado solo diferencias en el dominio de unión de los ligandos (140).

El receptor para el IGF-II está compuesto aparentemente de una sola cadena polipeptídica de 250,000 Da (143).

Si bien ambos factores interactúan preferentemente con su propio receptor de membrana, pueden producirse reacciones cruzadas con altas concentraciones de los ligandos (143).

La insulina también en elevadas concentraciones puede interactuar con el receptor del IGF-I, pero no del IGF-II (139).

ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE IGF-I E IGF-II

IGFs e insulina ejercen el mismo tipo de acciones biológicas, incluyendo la estimulación de la síntesis de DNA en células en cultivo, el transporte de aminoácidos y el metabolismo de la

glucosa (144,145,146). Ambos factores estimulan también la incorporación de sulfato a los proteoglicanos del cartilago (145).

Además, IGFs estimulan el crecimiento de las células de granulosa y la esteroidogénesis. IGF-I induce la proliferación de células de granulosa bovina (147). IGF-I e IGF-II estimulan la síntesis de DNA y facilitan la secreción de progesterona en células de granulosa porcina (147).

IGF-I EN CANCER DE MAMA HUMANO

Todas las líneas de cáncer de mama humano examinadas hasta el momento secretan IGF-I (148). En esas células, también han sido hallados varios mRNAs correspondientes a IGF-I (149). Cuando en el cultivo se utilizan medios que contienen rojo fenol, no se detecta inducción de la síntesis de IGF-I por estrógenos. En cambio, con medios libres de rojo fenol, el estradiol y la insulina producen un aumento de 2 a 3 veces en la secreción de IGF-I (148). Los antiestrógenos, por el contrario, inhiben la síntesis de IGF-I (148). Un hallazgo interesante es que dos líneas de cáncer de mama, que no poseen receptores para estrógenos y son altamente malignas, secretan grandes cantidades de IGF-I y responden pobremente a IGF-I exógeno (150).

Hasta el momento, los mecanismos de inducción de la síntesis y la función biológica del IGF-I en el cáncer de mama humano se desconocen. Sin embargo por las evidencias obtenidas se ha postulado que IGF-I actuaría como un mitógeno autoestimuladorio

en estas células malignas (148).

FACTORES DE CRECIMIENTO DE FIBROBLASTOS

AI SLAMI ENTO Y PURIFICACION

Los factores de crecimiento de fibroblastos ácido (aFGF) y básico (bFGF) son moléculas íntimamente relacionadas que poseen actividades biológicas semejantes. El origen científico de los FGFs data de hace 50 años. Aproximadamente en 1940 se encontró que homogenatos de cerebro tenían una potente actividad mitogénica sobre fibroblastos en cultivo. Esta actividad era extraordinariamente alta en el sistema nervioso central en comparación con una variedad de otros órganos que fueron examinados (151). En 1973 se encontró que extractos de hipófisis también tenían una importante capacidad mitogénica sobre la línea de fibroblastos Balb/c3T3 (152). Luego Gospodarowicz y col. purificaron parcialmente factores semejantes a los FGF de extractos de cerebro e hipófisis, basándose en su capacidad de estimular la proliferación de la línea Balb/c3T3 (153). Estos autores mostraron que preparaciones presumiblemente puras inducían la división de una variedad de tipos celulares de origen mesodérmico, incluyendo las células del endotelio vascular que hasta ese momento habían sido un tipo celular difícil de propagar en cultivo.

Inicialmente se pensó que solo existía una clase de FGF el que se propuso derivaba de una proteólisis parcial de la mielina (factor de crecimiento de fibroblastos básico con un punto isoelectrico de 9.6) (153).

Posteriormente, se demostró la existencia de un FGF con un punto isoeléctrico ácido en preparaciones de cerebro (154). Se estableció además que el FGF básico era distinto de la mielina.

Estudios recientes indican que los FGFs tienen una función importante en células del endotelio vascular del sistema nervioso y del tejido conectivo. Ambos factores son multifuncionales, dado que pueden tanto estimular la división celular como inducir o retrasar la diferenciación (155).

Para la purificación de los FGF básico y ácido se han seguido dos tipos de metodologías. El método de purificación parcial del FGF ácido (aFGF) de cerebro incluye fraccionamiento salino, cromatografías de intercambio catiónico y de exclusión molecular y finalmente HPLC (156). Factores semejantes al aFGFs han sido recientemente aislados y purificados por distintos laboratorios.

Lobb y col. han purificado un factor semejante al FGF al que denominaron factor de unión a la heparina tipo α . También han sido descritos un factor de crecimiento proveniente del ojo, un factor de crecimiento de células endoteliales, un factor de crecimiento derivado de cerebro, un factor de crecimiento de astrogliá y un factor de crecimiento derivado de retina (157). Todos estos mitógenos de células endoteliales obtenidos del sistema nervioso central son muy similares o idénticos al aFGF.

La purificación del FGF básico (bFGF) se ha llevado a cabo utilizando métodos semejantes a los descritos para el aFGF. La composición de este material purificado ha demostrado que no proviene de la mielina (158). Por otra parte, la amplia

distribución del bFGF así como también la gran variedad de tipos celulares sobre los que actúa han dado origen a una serie de denominaciones diferentes para este factor y existen por lo menos 16 sinónimos del bFGF (157).

El otro método de purificación de aFGF y bFGF se basa en la alta afinidad de estos factores por la heparina. El procedimiento consiste en una precipitación con sulfato de amonio, cromatografía en columnas de carboximetil-Sephadex y finalmente cromatografía de afinidad en columnas de heparina-Sepharosa. Con este último paso y dependiendo del tejido del cual se extraigan los FGF, se logra una purificación de 2000 a 5000 veces de estos factores (159).

ESTRUCTURA

bFGF está compuesto por una sola cadena polipeptídica de 146 residuos aminoácidos. Este factor también puede existir en otra forma que a la que le faltan los 15 primeros aminoácidos del extremo N-terminal y se la denomina des. 1-15 bFGF. Esta forma truncada tiene la misma actividad que la forma nativa lo cual sugiere que el extremo N-terminal no está involucrado en la unión con el receptor (160).

aFGF es un polipéptido de 140 aminoácidos que también puede existir en una forma a la que le faltan los 6 aminoácidos del extremo N-terminal: des.1-6 aFGF (161).

Existe un 55% de homología en la secuencia de ambos factores.

aFGF y bFGF poseen dos sitios potenciales de unión de heparina, uno de ellos próximo al extremo N-terminal y el otro al C-terminal (160,161).

El análisis de la estructura secundaria indica que los residuos 37 a 40 y 78 a 81, que son la secuencia inversa de la Arg-Gly-Asp-Xaa de la fibronectina, pueden encontrarse en el exterior de la proteína. De esta forma a través de estos residuos los FGF podrían unirse a los sitios de reconocimiento celular (161,162).

RECEPTORES

Todos los tipos celulares que responden a bFGF o aFGF poseen receptores de superficie para estos factores. La densidad de receptores en células diploides normales es baja (163).

En el caso de líneas celulares establecidas, como en las células BHK-21, se detecta un número mas elevado de receptores de membrana (163). Ambos mitógenos pueden desplazarse mutuamente de la unión con el receptor (164). Los estudios con reactivos de entrecruzamiento indican que ambos factores interactúan con los mismos dos componentes de membrana, uno de ellos de 145 KDa y el otro de 125 KDa (164). Cuantitativamente bFGF posee mas afinidad por la especie de 145 KDa, mientras que aFGF por la de 125 KDa (164).

Los FGFs unidos a su receptor de membrana son internalizados lentamente (163). En contraste con otros factores de crecimen-

to, aparentemente los FGFs no son degradados en la célula (163).

Tampoco se ha podido detectar la fosforilación en residuos tirosina del receptor después de la unión de estos factores (163)

Hasta el momento, no se ha examinado la fosforilación del receptor en residuos treonina o serina, que podría ser relevante para la actividad biológica de los FGFs dado que se ha demostrado que bFGF activan a la proteína quinasa C (165)

ACTIVIDADES BIOLÓGICAS

La mayoría de los estudios biológicos con FGFs han sido hechos con el bFGF. Solo últimamente se ha investigado el aFGF el que de acuerdo a lo esperado, dada la homología en la secuencia de ambos factores, tiene las mismas actividades que el bFGF. A pesar de que se ha descrito que aFGF es de 30 a 100 veces menos potente que la forma básica, probablemente esta diferencia resulta de una inactivación parcial del factor ácido (166). En presencia de heparina, que aparentemente estabiliza la conformación activa del aFGF y disminuye la Kd del receptor, la actividad del aFGF aumenta hasta 100 veces (166). De esta forma, en presencia de heparina ambos factores tienen la misma potencia.

FGFs actúan como potentes mitógenos sobre una gran variedad de tipos celulares incluyendo cultivos primarios de fibroblastos, células del endotelio vascular y de la cornea, condrocitos, osteoblastos, mioblastos, células de músculo liso y células de la glia (167,168). Hasta el momento FGFs ha sido fundamentalmente

utilizado in "vitro" para desarrollar nuevas líneas celulares.

El agregado de FGFs a cultivos de células de origen mesodérmico disminuye notablemente el tiempo de duplicación de las células (169).

FGFs también tienen efectos en la diferenciación celular. Estos factores estabilizan la expresión fenotípica de células en cultivo (170). Esta característica ha permitido el cultivo a largo plazo de tipos celulares que de otra forma hubiesen perdido sus fenotipos normales en sucesivos pasajes. En efecto, células del endotelio vascular o de la córnea cuando son cultivadas en presencia de FGFs conservan en confluencia todas las características funcionales y morfológicas del endotelio del cual provienen (170).

FGFs inducen a las células del endotelio capilar a organizarse en túbulos que se asemejan a capilares sanguíneos y pueden estimular los procesos característicos de la angiogénesis "in vivo", incluyendo la migración de las células endoteliales, y la producción del activador del plasminógeno (171).

Sobre condriocitos FGFs pueden actuar como mitógenos o como agentes de diferenciación (172).

FGFs promueven la diferenciación de preadipocitos de oveja (173).

Uno de los efectos más interesantes de los FGFs en la diferenciación celular se observa en células nerviosas. Inicialmente Guroff y col. (174) describieron que bFGF actuaba induciendo diferenciación en la línea celular de feocromocitoma de rata

PC-12. Posteriormente, se demostró que aFGF produce los mismos efectos y que esta línea posee receptores para FGFs (175).

En medios libres de suero bFGF aumenta la sobrevivencia de las neuronas (176). Estos resultados sugieren que FGFs pueden actuar como agentes neurotróficos en el sistema nervioso central.

FGFs poseen también efectos inhibitorios sobre la diferenciación celular. Así, bFGF puede retrasar la diferenciación y fusión de los mioblastos (177).

Hasta el momento hay pocos conocimientos sobre la actividad biológica de los FGFs "in vivo". Sin embargo, se conoce que aFGF y bFGF inducen la angiogénesis (178).

Por otra parte, dado el gran espectro celular sobre el que actúan, probablemente los FGFs sean factores de crecimiento que estimulen la mitosis coordinada de múltiples tipos celulares durante el desarrollo animal (157).

Existen diversas respuestas bioquímicas inducidas por FGFs en las células en cultivo. Estas, han sido estudiadas fundamentalmente con el bFGF. La estimulación de fibroblastos Swiss 3T3 quiescentes con bFGF produce la elevación de los niveles de diacilglicerol, la movilización de Ca^{2+} , y la activación de la proteína quinasa C (179). También el agregado de FGFs a cultivos de células Balb/c3T3 produce un aumento en la síntesis de proteínas, fundamentalmente proteínas de secreción (180,181).

Los FGFs inducen la expresión de dos oncogenes: c-fos y c-myc (182,183).

FGFs Y TRANSFORMACION MALIGNA

Dada las actividades biológicas de los FGFs se ha postulado que pueden estar involucrados en el proceso de crecimiento tumoral.

En efecto, si alguno de los FGFs o bien un oncogen equivalente a estos mitógenos fuese expresado en forma anormal en las células neoplásicas podría inducir la hiperplasia que generalmente se observa en los tejidos que rodean a las células tumorales, la estimulación autocrina de las células malignas, y la angiogénesis en el tumor (151,157).

FACTORES DE TRANSFORMACION

INTRODUCCION

Los factores de transformación (TGFs) constituyen un grupo de polipéptidos con características únicas dentro de los factores de crecimiento, dada su capacidad de conferir un fenotipo neoplásico a células indicadoras no transformadas. El fenotipo neoplásico se define operacionalmente por la pérdida de la inhibición por contacto, el sobrecrecimiento en monocapa, cambios característicos en la morfología celular e independencia del anclaje con la correspondiente capacidad de formar colonias en medio semisólido de agar (184).

La descripción original de los TGFs data de 1978 cuando Todaro y De Larco interesados en las propiedades que distinguen las células malignas de las normales, notaron que las células de rata o ratón transformadas por el virus del sarcoma de Moloney perdían sus receptores para el EGF (185). Observaron además que éste no era un mecanismo general de transformación, dado que no se presentaba en la mayoría de las células transformadas químicamente, ni tampoco en las transformadas por virus a DNA. Postularon así que las células transformadas por el virus del sarcoma de Moloney producían una sustancia capaz de interactuar con los receptores del EGF (185).

Estos autores aislaron del medio condicionado de fibroblastos de rata o ratón transformados por el virus del sarcoma de Moloney

un polipéptido al que denominaron factor de crecimiento del sarcoma (SGF) (186). Las propiedades descritas para este factor fueron varias: i) competía para unirse a los receptores del EGF, pero no presentaba reacciones inmunológicas cruzadas con anticuerpos anti-EGF, ii) su peso molecular era de 10 KDa y su punto isoeléctrico de 6.8, iii) producía transformación fenotípica en las células indicadoras normales NRK-49F (fibroblastos de riñón de rata), siendo este efecto reversible al retirar el SGF del medio (187).

A partir del descubrimiento del SGF, prosiguió la búsqueda de factores semejantes y poco tiempo después Ozanne y col.(188) aislaron actividades transformantes en los medios condicionados de células de rata y ratón transformadas por el virus del sarcoma de Kirsten. En 1982 Twardzik y col.(189) comprobaron que fibroblastos de embrión de rata transformados por el virus de Abelson de la leucemia murina producían y liberaban un factor de transformación. Moses y col.(190) aislaron actividades transformantes del medio condicionado de líneas celulares de ratón AKR-MCA y C3H/MCA-58 transformadas químicamente. Todaro y col.(191) demostraron la presencia de un factor transformante en el medio condicionado de líneas celulares de cánceres humanos.

En 1980 Roberts y col.(192) describieron un proceso de extracción ácido alcohólica de péptidos intracelulares modificando el método utilizado para la obtención de péptidos biológicamente activos como insulina (193). Utilizando esta técnica de extracción fueron aislados factores similares al SGF de una gran varie-

dad de células tumorales, y todas estas actividades transformantes fueron denominadas en forma general factores de transformación. Un hallazgo inesperado fue la extracción de TGFs de distintos tejidos normales de rata (194), sin embargo una de las características de estos TGFs era que su actividad en el ensayo de transformación de las células NRK-49F era potenciada por el agregado de EGF exógeno.

De acuerdo a esto, se postuló que estas actividades transformantes constituían un nuevo tipo de TGFs (195,196).

Finalmente, purificando los TGFs por cromatografía líquida de alta presión se evidenció la existencia de dos tipos de factores de transformación.

El primero de ellos llamado TGF- α no requiere el agregado de EGF en el ensayo de transformación de las células NRK-49F y es capaz de desplazar al EGF de la unión a sus receptores (197). El segundo tipo requiere la presencia de EGF para promover transformación fenotípica de las células NRK-49F y no compite por los receptores del EGF. A éste se lo denominó TGF- β (198).

Posteriormente se determinó que ni el TGF- α ni el EGF podían por sí mismos transformar a las células NRK-49F, ambos requieren la presencia de TGF- β (199). De esta forma y utilizando HPLC se demostró que en el originalmente denominado SGF estaban presentes TGF- α y TGF- β (200).

El estado actual del conocimiento de TGFs ha permitido establecer que TGF- α y TGF- β son dos entidades estructural y biológicamente diferentes (201), habiéndose encontrado también ac-

tividades transformantes que por sus características no pueden ser incluidas en ninguno de estos dos grupos (202,203,204,205).

TGF-alfa

ESTRUCTURA Y PRECURSOR

La purificación y secuenciación de TGF- α tanto humano como de rata ha establecido que está compuesto por una sola cadena polipeptídica de 50 residuos aminoácidos (PM 5.7 kDa) con tres puentes disulfuro intracatenarios en posiciones homólogas a las del EGF (104). La homología entre la secuencia del TGF- α y el EGF es de aproximadamente 40% (206). También se ha demostrado una importante homología entre EGF, TGF- α y las proteínas producto del virus vaccinia y del virus de fibroma de Shope (207,208), conservándose la posición de los tres puentes disulfuro.

El clonado de los cDNA correspondientes al TGF- α humano y de rata ha demostrado que está codificado por un mRNA de 4.3-4.8 kb (99,100,104,209). De acuerdo a esto, el TGF- α maduro se sintetiza a partir de un precursor de 160 residuos aminoácidos del cual los extremos carboxi-terminal (71 aminoácidos) y amino-terminal (39 aminoácidos) son clivados por una proteasa que corta entre residuos alanina y valina (210). De acuerdo a la secuencia deducida para el precursor, el procesamiento del mismo dejaría en el extremo C-terminal un péptido hidrofóbico, rico en residuos cisteína y por lo tanto con las características de una proteína de membrana (210). La conservación de la secuencia de este péptido entre rata y humano es altísima existiendo sólo un aminoácido sustituido, lo que sugiere una función bioló-

gica importante para esta proteína (201). En el genoma humano el TGF- α se localiza en el cromosoma 2 (211).

Han sido descritos TGFs- α de alto peso molecular (18-20 KDa) (212,191) y de acuerdo a las evidencias con que se cuenta actualmente, estos podrían originarse a partir del procesamiento parcial del precursor de 160 aa (210).

RECEPTOR

Una de las características mas interesantes del TGF- α es su capacidad para unirse a los receptores del EGF (105,213)

La interacción del TGF- α con el receptor de membrana del EGF causa los mismos efectos que este último factor, es decir, se fosforilan residuos tirosina en la molécula del receptor y éste activado actúa como tirosina quinasa (214).

Estudios realizados en varios tipos de células intactas y en preparaciones de membrana han demostrado que EGF y TGF- α purificados tienen una afinidad equivalente por el receptor (105,213) y son equipotentes en la activación de la tirosina quinasa asociada a éste (213). El TGF- α recombinante solo tiene una efectividad del 55% en los ensayos de competencia por el receptor de EGF (215).

ACTIVIDAD BIOLÓGICA

De acuerdo a lo que podría esperarse de la unión de EGF y TGF- α al mismo receptor, la mayoría de las actividades biológicas de ambos factores son idénticas. In vitro EGF y TGF- α tienen actividad mitogénica equipotente sobre cultivos de fibroblastos en monocapa (216); en las líneas celulares que requieren la acción sinérgica de TGF- α y otros factores de crecimiento para desarrollar colonias en medio semisólido, la presencia de TGF- α y EGF es equivalente (217). En dos ensayos in vivo, la estimulación de la apertura precoz de los párpados en ratones recién nacidos y la inhibición de la secreción ácida gástrica, ambos factores ejercen el mismo efecto (219). Sin embargo, en otro ensayo in vivo, se ha demostrado que el TGF- α es más potente que EGF en la estimulación del desarrollo lóbuloalveolar de la glándula mamaria de ratón (220)

Existen evidencias que indican que la actividad biológica del TGF- α podría ser superior a la del EGF en : i) la inducción de la angiogénesis en un modelo experimental de hamster (221) ii) la estimulación de la liberación de calcio de huesos de fetos (222) iii) el aumento de la actividad osteoclástica (223) y iv) la reparación de heridas de tejido epitelial (224). No se descarta sin embargo, que esta mayor actividad pueda deberse a diferente estabilidad de ambos factores, diferencias en sus propiedades farmacocinéticas, o bien a la existencia de un receptor con mayor

afinidad por el TGF- α .

Respecto del papel fisiológico del TGF- α , su aislamiento de embriones de rata y ratón de distinta edad gestacional, de placenta humana y de tejidos fetales ovinos indica que podría tener una participación en el desarrollo embrionario normal (184,204,-225). Además, trabajos recientes describen: i) la secreción de TGF- α por células normales de hipófisis bovina en cultivo (226), ii) la expresión de TGF- α en queratinocitos normales, lo que también es una evidencia de una función fisiológica del TGF- α (227).

RELACION ENTRE TGF- α , TRANSFORMACION MALIGNA Y ONCOGENES

El hallazgo de TGF- α en una gran variedad de líneas celulares tumorales, células transformadas por virus y tumores primarios (228,229). ha sido considerado como una evidencia de la participación de este factor en el proceso de transformación neoplásica.

Se ha postulado que el TGF- α puede actuar como un factor autocrino positivo en las células malignas, contribuyendo a la proliferación sin control de las mismas (2,4).

Derynk y col. (228) han demostrado la presencia del mRNA correspondiente al TGF- α en una variedad de tumores primarios humanos, particularmente en carcinomas. Muchos de los tumores que presentaban este mRNA, expresaron también altos niveles del

mRNA del receptor del EGF.

Resultados semejantes han sido obtenidos recientemente con tumores de mama humanos, en los cuales se ha detectado tanto la presencia de TGF- α como de receptores para EGF (229)

Solo recientemente se ha podido demostrar una relación entre TGF- α y oncogenes. En efecto Cutry y col. (230) hallaron que TGF- α y EGF inducen la expresión de c-myc y c-fos en las células C3H 10T1/2. El tratamiento de estas células con ambos mitógenos produce un aumento de 8 veces en los niveles de mRNA de c-myc y de 12 a 14 veces en los de c-fos.

Finzi y col. (231) para investigar las propiedades transformantes de TGF- α trabajaron con plásmidos que contenían la secuencia completa que codifica para el TGF- α humano bajo el control transcripcional de un promotor viral. Cuando se transfectaron células NIH 3T3 con los plásmidos contruidos de la manera descrita, éstos no fueron capaces de promover transformación morfológica en las células. Por el contrario, la transfección con dos oncogenes virales v-erb B y v-sis indujo el desarrollo de focos de transformación en cultivos de células NIH 3T3. Las células transfectadas secretaban grandes cantidades de TGF- α , presentaban "down regulation" de los receptores del EGF y su crecimiento era inhibido por anticuerpos anti TGF- α . Todos estos resultados indican que TGF- α es un agente promotor del crecimiento de las células NIH 3T3, pero no actúa como un oncogen cuando está sobreexpresado en estas células.

La transfección de la línea de células de epitelio intestinal

de rata con el oncogen H-ras produce la transformación neoplásica de la misma y la sobreexpresión del mRNA de TGF- α (232).

Otro hallazgo reciente es que en la línea celular de cáncer de mama humano MCF-7 TGF- α induce la activación del protooncogen c-fos (233)

TGF- β

ESTRUCTURA

Dentro de los factores de crecimiento el TGF- β es sin duda uno de los mas interesantes por ser un regulador multifuncional de la proliferación celular. En efecto, dependiendo del tipo celular sobre el que actúe, las condiciones de cultivo y los otros factores de crecimiento presentes en el medio, puede estimular la proliferación celular o inhibirla (1,2,4,6,8).

TGF- β ha sido aislado de numerosos tejidos normales y neoplásicos y se lo ha purificado de varias fuentes: plaquetas humanas (234), placenta humana (235), riñón bovino (236) células de rata transformadas por el virus de sarcoma de felinos (237), células murinas transformadas L-929 (238), plaquetas porcinas (239), y huesos bovinos (240). Las plaquetas constituyen la fuente de extracción mas importante de TGF- β , sin embargo el mayor reservorio de TGF- β en el organismo son los huesos.

La composición de la molécula del TGF- β aislada de cualquiera de estas fuentes es la misma: dos cadenas polipeptídicas de 112 residuos aminoacídicos y PM 12 KDA unidas por puentes disulfuro formando un homodímero de 23-25 KDa (234,235,236,237,-238,239,240).

La secuencia aminoacídica del extremo N-terminal (30 aminoácidos) del TGF- β humano (241), bovino (240), murino (242) y de rata

es idéntica (237). La secuencia aminoacídica total, deducida del cDNA del TGF- β bovino y humano es idéntica, mientras que el TGF- β murino difiere en un aminoácido en la posición 75 (241,242).

Hasta 1987 ésta era la única forma de la molécula del TGF- β conocida, en ese año Cheifetz y col. (239) aislaron de plaquetas porcinas una nueva forma homodimérica del TGF- β , a la que llamaron TGF- β 2 y una forma heterodimérica TGF β 1.2. Al TGF- β originalmente aislado de plaquetas lo denominaron TGF- β 1. Seyedin y col. (240) también encontraron TGF- β 2 y TGF- β 1.2 en huesos bovinos. El descubrimiento de estos nuevos TGFs se produjo utilizando un paso más en el procedimiento habitual de purificación.

El TGF- β de plaquetas porcinas, obtenido de la segunda columna de cromatografía líquida de alta presión en fase reversa, muestra una sola banda en los geles teñidos con plata. Sin embargo cuando este material se purifica utilizando una columna de Synchropac C-4 se obtiene la separación de los tres tipos de TGF- β (239).

Al comparar los 22 aminoácidos del extremo N-terminal del TGF- β 1 y TGF- β 2 solamente se observó un 59% de homología en la secuencia aminoacídica. Hasta el momento no se conoce la secuencia del extremo C-terminal del péptido. Anticuerpos contra los aminoácidos 64-91 del extremo C-terminal del TGF- β 1 humano reconocen igualmente TGF- β 1 humano y bovino, pero no reconocen TGF- β 2 en los "inmunoblots" (239). A pesar de estas diferencias, las semejanzas entre TGF- β 1 y TGF- β 2 son numerosas.

Ambos tienen un peso molecular de 25 KDa, y son homodímeros de

sus respectivas cadenas, que están unidas por puentes disulfuro (239). Sorprendentemente, muchas de las actividades biológicas de ambos factores son idénticas. Estas actividades incluyen la inducción de la formación de colonias, en medio semisólido, de las células NRK-49F y AKR-2B, la inhibición del crecimiento de células epiteliales y de la adipogénesis y la inducción del fenotipo condrogénico (239,243,244,245,246). Evidencias recientes indican diferencias entre TGF- β 1 y TGF- β 2 en la regulación de la hemopoyesis (247,248). En efecto, TGF- β 1 es un potente inhibidor de la proliferación de los progenitores hemopoyéticos, no habiéndose determinado esta actividad para TGF- β 2 (248).

Massagué y col. han demostrado la existencia en varias líneas celulares de receptores con distinta afinidad por TGF- β 1 y TGF- β 2 (249). De acuerdo a estos hallazgos Massagué ha sugerido que una de las formas de regular la respuesta de las células al TGF- β podría ser a través de la presencia de múltiples formas del factor y de receptores con afinidades diferenciales.

PRECURSOR

El cDNA correspondiente al TGF- β 1 se aisló de una biblioteca de genes de placenta humana (241). En el genoma humano el TGF- β se localiza en el brazo largo del cromosoma 19 (4). Los estudios de hibridización han demostrado que el mRNA del TGF- β

tiene aproximadamente 2.5 Kba. La señal transcripcional comienza 840 pares de bases mas allá del extremo 5' y la lectura comprende 1173 nucleótidos. El precursor codificado posee 390 aminoácidos y el péptido maduro esta codificado en el extremo C-terminal (241).

El cDNA del precursor del TGF- β murino también ha sido aislado (242) a partir de una biblioteca de cDNA, derivado de mRNA de una línea de monocitos murina, tratada con ésteres de forbol.

La secuencia aminoacídica deducida indica que el TGF- β 1 murino, de la misma forma que el humano, se sintetiza como un precursor de 390 aminoácidos correspondiendo los 112 aa del extremo C-terminal al péptido maduro. Dos áreas del precursor muestran un altísimo grado de homología con la forma humana. Una de esas regiones corresponde al péptido maduro, mientras que la otra corresponde al extremo N-terminal del precursor, sugiriendo una función biológica para esta zona (242).

El gen que codifica para el TGF- β 2 no ha sido clonado.

En los estudios de hibridización utilizando sondas de cDNA se ha demostrado que en varios tejidos tanto normales como neoplásicos se expresa un mRNA de 2.5 Kba (228,241). En 1987 Derynk y col.(228) aislaron RNA de tejidos tumorales y de los tejidos normales que rodean al tumor y observaron un aumento en los niveles de mRNA de TGF- β en las células malignas. Resultados similares fueron obtenidos trabajando con líneas de fibroblastos y con estas mismas células transformadas por retrovirus (242). La activación de linfocitos humanos de sangre periférica, conduce

también al aumento de los niveles de mRNA de TGF- β (241).

RELACION ENTRE TGF- β Y OTROS FACTORES DE CRECIMIENTO Y DIFERENCIACION CELULAR.

Recientemente, varios hallazgos han evidenciado la existencia de una serie de factores polipéptidos estructuralmente y funcionalmente relacionados con el TGF- β . Estos son, en mamíferos, las inhibinas y activinas (250), y la sustancia inhibitoria de Muller (MIS) (251) y en *Drosophila* los productos correspondientes al complejo génico decapentapléjico (DPP-C) (252). El análisis de los cDNA de estos polipéptidos indica que se sintetizan como precursores de alto peso molecular, existiendo una importante homología en el extremo C-terminal de todos ellos. Es este extremo el que se cliva para dar la forma madura del factor (250,251,252,253). Una de las características más interesantes es la conservación de múltiples residuos cisteína involucrados en la formación de puentes disulfuro intra e intercatenarios. Varios miembros de esta familia de polipéptidos participarían aparentemente en procesos de reparación tisular y en la embriogénesis.

Los productos del gen Decapentapléjico de *Drosophila* participan en eventos críticos del desarrollo embrionario como la especificación dorsoventral y la morfogénesis de los discos imaginales (252).

La secuencia aminoacídica deducida para los productos del gen

DPP-C muestra un 36% de homología con la del TGF- β 1 y de igual forma que en este factor la forma madura del polipéptido se supone que es un dímero unido por puentes disulfuro que actúa en forma autocrina o paracrina (252).

La sustancia inhibitoria de Müller (MIS), que se localiza en testículos de mamíferos, causa la regresión de los ductos de Müller durante el desarrollo embrionario del tracto reproductivo de mamíferos. MIS es un homodímero compuesto por dos cadenas de 70-72 KDa unidas por puentes disulfuro con homología en su extremo C-terminal con el TGF- β (251). A diferencia de los otros miembros de esta familia de polipéptidos el precursor del MIS no es clivado para dar el péptido maduro (253).

Las inhibinas y activinas están involucradas en la regulación de la secreción en la hipófisis de hormona foliculo estimulante (FSH). Las inhibinas, que se encuentran en ovario y testículo, son dos proteínas heterodiméricas (PM 32KDa) formadas por una subunidad α y dos tipos de subunidad β : β A y β B (250,253). Ambas proteínas suprimen la secreción de FSH en la hipófisis.

Las activinas, también de origen gonadal, son dímeros compuestos de cadenas β A y β B que estimulan la secreción de FSH en la hipófisis (250,253).

No se conoce aun el modo de acción de inhibinas y activinas aunque su naturaleza antagonista sugiere la posibilidad de que los dímeros α - β y β - β compartan un receptor de superficie que reconozca a subunidad β . De esta forma solo los dímeros β - β serian capaces de desencadenar los eventos posteriores a la unión

con el receptor, tal vez interactuando con dos moléculas de receptor al mismo tiempo. Otra posibilidad es que activinas e inhibinas interactúen con distintos receptores de superficie que actúen en forma antagónica sobre idénticos sustratos celulares (253). El TGF- β es capaz de ejercer los mismos efectos que las activinas sobre células de hipófisis, lo que podría explicarse considerando que TGF- β es un homodímero β - β y por esto podría interactuar con el receptor de las activinas (253). Sin embargo, un resultado sorprendente es que las activinas e inhibinas no tienen afinidad por el receptor del TGF- β (253).

La familia de polipéptidos relacionados con el TGF- β es un complejo grupo de factores con características completamente diferentes a las de otros grupos. Padgett y col. (252) han sugerido que dada la homología existente entre los productos del DPP-C en *Drosophila* y el TGF- β e inhibinas y activinas en mamíferos al menos dos proteínas relacionadas con el TGF- β existían en el momento de la divergencia entre artrópodos y vertebrados.

RECEPTORES

Se han detectado receptores de membrana, a los cuales el TGF- β se une en forma específica y saturable, en una gran variedad de células de origen epitelial y mesenquimal (239,249).

El estudio de los parámetros de unión del TGF- β a su receptor y de las concentraciones de TGF- β que producen respuestas bioló-

gicas ha demostrado que que para una máxima respuesta sólo se requiere una ocupación de 10 a 20% de los receptores (249).

Los receptores del TGF- β presentan varias particularidades. En primer lugar dependiendo del tipo celular o bien no están sujetos a "down regulation" (249,254), o sólo son regulados en un 50 a 70% por altas concentraciones del ligando (255), por transformación química (256) o en células transformadas por virus, que secretan altas concentraciones de TGF- β (237). Por otra parte el tratamiento de las células con ciertos agentes que influyen los efectos biológicos del TGF- β , como los ésteres del forbol, el ácido retinoico u otros factores de crecimiento, no afectan la unión del TGF- β a sus receptores (257).

Todas las células examinadas hasta el momento, excepto seis líneas celulares derivadas de retinoblastomas, presentan receptores para el TGF- β . El análisis de la unión del TGF- β a sus receptores en células normales de origen fibroblástico, epitelial, endotelial o hemopoyético, en células tumorales, células transformadas por RNA o DNA virus y células transformadas por carcinógenos químicos ha demostrado que todas poseen receptores, variando el número desde 600/célula hasta 80.000/célula (258). Una de las características del receptor del TGF- β es que no presenta actividad de tirosina quinasa (237,258) Esto lo diferencia de los receptores para otros GFs como EGF, PDGF IGF-I e insulina.

Sin duda, la amplia distribución del receptor del TGF- β , su resistencia a la modulación así como también el alto grado de

conservación evolutiva del factor sugieren un papel fisiológico peculiar para TGF- β .

ESTRUCTURA DEL RECEPTOR

Utilizando el reactivo de entrecruzamiento disuccinimidil suberato Massagué y col. (249) aislaron de células tanto epiteliales como mesenquimales el primer tipo de receptor descrito para el TGF- β . Este, es un complejo glicosilado de peso molecular 565-600 KDa formado por dos subunidades de 280-330 KDa.

Otras formas del receptor de TGF- β han sido identificadas también por el uso de reactivos de entrecruzamiento. Especies de 85 y 65 KDa han sido aisladas en la mayoría de las células examinadas (239). Los dominios de unión de las especies de 280 y 65 KDa son similares, pero el dominio de la especie de 85 KDa es distinto del anterior (239).

El hallazgo de distintas formas de TGF- β hizo necesario examinar posibles diferencias en la unión de TGF- β 1 y TGF- β 2 a los receptores.

El análisis de Scatchard de la unión del TGF- β 1 y TGF- β 2 a las células NRK-49F y a la línea A549 de carcinoma humano de pulmón demuestran que hay menos receptores para TGF- β 2 en ambas líneas, pero que ambos ligandos se unen con la misma afinidad (239). Las experiencias en que se utilizan los TGFs- β 1 y 2 fríos para competir con los TGF- β 1 y 2 marcados con 125 I en estas dos líneas celulares, sugieren que las células NRK poseen sitios específicos

para TGF- β 2, que no pueden unir TGF- β 1 y las células A549 poseen sitios específicos de unión del TGF- β 1 (239).

Los estudios con reactivos de entrecruzamiento de la unión de TGF- β 1 y 2 a los receptores de membrana han dado resultados discrepantes. Cheifetz y col. (239) han descrito que TGF- β 1 y 2 se unen con igual afinidad a la especie de 280 KDa, pero que TGF- β 1 tiene mayor afinidad por las especies de 65 y 85 KDa.

Sin embargo, Segarini y col. (259) proponen la existencia de dos especies distintas de 280 KDa una de las cuales tiene la misma afinidad por TGF β 1 y 2 y otra con mayor afinidad por TGF- β 2.

EFFECTOS BIOLÓGICOS

Dada la característica del TGF- β de actuar como regulador multifuncional de la proliferación celular sus efectos biológicos "in vitro" pueden dividirse en I) Estimulación de la proliferación II) Inhibición de la proliferación III) Efectos regulatorios

I) Efectos estimulatorios.

En forma general puede considerarse que el TGF- β estimula la proliferación de células de origen mesenquimal. Sin embargo, tal como hemos mencionado anteriormente, los efectos del TGF- β sobre la proliferación celular dependen además del tipo celular de las condiciones del cultivo y de los otros factores de crecimiento que actúan en forma conjunta con TGF- β .

TGF- β estimula el desarrollo de colonias de los fibroblastos NRK-49F en medio semisólido de agar (194). Actualmente se conoce que para inducir el fenotipo transformado en esta línea celular es necesaria la presencia de PDGF, EGF e IGF-II juntamente con TGF- β (199). TGF- β es capaz de promover el desarrollo de colonias de los fibroblastos de embrión de ratón AKR-2B en ausencia de cualquier otro factor de crecimiento (260). TGF- β estimula también el crecimiento en medio semisólido de fibroblastos de piel humana (261) y conjuntamente con IGF-II es capaz de promover el fenotipo neoplásico en células Balb/c3T3 (261)

Cuando se realizan las experiencias en monocapa, los efectos del TGF- β son diferentes. Así, TGF- β inhibe la estimulación de la síntesis de DNA inducida por EGF en células NRK-49F (262).

El efecto de este factor sobre las células AKR-2B en monocapa es particularmente interesante. En los experimentos iniciales, se observó que i) TGF β no tenía efecto mitogénico sobre células AKR-2B ii) TGF- β inhibía la síntesis de DNA inducida por EGF e insulina (263). Sin embargo, hallazgos posteriores demostraron que TGF- β induce en las células AKR-2B la síntesis de DNA a las 24 horas de incubación (264)

Esta prolongada fase prereplicativa es única del TGF- β , dado que otros mitógenos como PDGF, EGF o FGF estimulan la síntesis de DNA a las 12-14 horas de incubación. Esto llevó a postular que la acción de TGF β sobre AKR-2B sería indirecta. En efecto Leof y col. (265) demostraron que la incubación de las células AKR-2B con TGF- β induce en primer término un aumento en la expresión del

mRNA correspondiente al c-sis, seguida por el correspondiente aumento en el medio de cultivo de la concentración de una proteína semejante al PDGF. Finalmente, se observa una elevación en la expresión de los mRNA correspondientes a los protooncogenes c-myc y c-fos, cuya expresión tal como hemos mencionado anteriormente, está regulada por el PDGF. De acuerdo a estos resultados, se ha propuesto que el efecto mitogénico del TGF- β sobre AKR-2B está mediado por la inducción del c-sis y por la acción autocrina de PDGF.

Experiencias realizadas con fibroblastos de Fisher 3T3 transfectados con el c-myc han demostrado que el efecto del TGF- β sobre la proliferación celular depende de los otros GFs presentes (262). TGF- β promueve el desarrollo de colonias, en medio semi-sólido, de estas células actuando en forma sinérgica con PDGF. En cambio, en estas mismas condiciones de cultivo inhibe la estimulación producida por EGF.

En fibroblastos de embriones humanos el efecto de TGF- β depende del desarrollo de las células (201,253). TGF β estimula la síntesis de DNA en fibroblastos obtenidos de embriones de poca edad gestacional pero inhibe la proliferación de fibroblastos de embriones de mayor edad gestacional.

TGF- β actúa como un potente mitógeno sobre osteoblastos en cultivo (266). Estas células también sintetizan el factor, lo que sugiere una probable estimulación autocrina de TGF- β en el hueso.

Recientemente se ha demostrado que TGF- β tiene actividad

mitogénica sobre las células de Schwann del sistema nervioso periférico (201).

II) Inhibición de la proliferación

Tal como mencionamos anteriormente, en forma general puede considerarse que TGF- β estimula la proliferación de células de origen mesenquimal e inhibe a las células de origen epitelial o neuroectodérmico. El TGF- β actúa como un potente inhibidor de la proliferación de células epiteliales normales y de ciertas células epiteliales tumorales (263,264).

La primera evidencia del efecto inhibitorio sobre la proliferación celular del TGF- β se obtuvo con estudios en la línea BSC-1 de células de riñón de mono (263). En el medio condicionado de esta línea Holley y col. (263) describieron una sustancia inhibitoria, demostrándose posteriormente que se trataba del TGF- β o un péptido directamente relacionado con éste.

El TGF- β inhibe la proliferación de células epiteliales de bronquios (267), hígado (268), piel (269) e intestino (246). Se conoce actualmente que las células neoplásicas de piel, bronquios e hígado han perdido la sensibilidad al TGF- β (268,269). En la línea celular Mv1Lu de epitelio pulmonar normal TGF- β 1 y TGF- β 2 son equipotentes en la inhibición de la incorporación de (3 H)timidina (239). En las células del epitelio renal el TGF- β inhibe la estimulación mitogénica de la insulina y la hidrocortisona, pero no bloquea la síntesis de proteínas inducida por estos

factores, con lo cual se produce la estabilización del estado diferenciado e hipertrofia celular (201).

Entre las células de origen mesenquimal sobre las cuales el TGF- β tiene efectos inhibitorios se encuentran los linfocitos B y T, que además de sintetizar TGF- β tienen receptores para el factor y las células del endotelio vascular (270). Se ha sugerido que sobre linfocitos el TGF- β actúa como un regulador auto-crino negativo inhibiendo la proliferación clonal excesiva y la síntesis de inmunoglobulinas. De igual manera, el efecto antiproliferativo del TGF- β sobre el endotelio vascular puede determinar una regeneración ordenada de los capilares en los sitios donde se produce injuria vascular.

Sobre células neoplásicas, también se han descrito efectos antiproliferativos del TGF- β . Roberts ha descrito que TGF- β inhibe el desarrollo de colonias en medio semisólido de agar de líneas celulares tumorales provenientes de carcinomas, sarcomas y melanomas (262).

Las células A549 de un carcinoma humano de pulmón son extremadamente sensibles a la inhibición del TGF- β . Su crecimiento independiente del anclaje es completamente bloqueado por el factor y en cultivos en monocapa TGF- β aumenta el tiempo de duplicación de las células (262). Un hallazgo sumamente interesante es que éstas secretan TGF- β en una forma inactiva. Se ha sugerido por lo tanto que la incapacidad de activar al TGF- β de su estado latente es una de las causas de la proliferación incontrolada de estas células malignas

Las células MCF-7 de cáncer de mama humano, que responden a estrógenos, secretan TGF- β biológicamente activo (148). El tratamiento de estas células con concentraciones de antiestrógenos que inhiben la proliferación celular, produce un aumento de 8 a 27 veces de la secreción de TGF- β activo y a su vez los estrógenos inhiben la síntesis de TGF- β (148,233,271). De acuerdo a estos hallazgos se considera que TGF- β actúa como un regulador autocrino negativo cuya síntesis es controlada hormonalmente. Knabbe y col. (272) han sugerido que uno de los mecanismos por los cuales los antiestrógenos controlan la secreción de TGF- β es a través de la activación de la forma latente del TGF- β .

III) Efectos regulatorios

El TGF- β posee una gran cantidad de efectos sobre células de distinto origen, que no están relacionados con el control de la proliferación.

Frecuentemente, produce profundas alteraciones en la expresión de fenotipos específicos en células con capacidad de diferenciación. En fibroblastos 3T3-L1 inhibe la diferenciación adipogénica, inducida por insulina y dexametasona, sin afectar el perfil de síntesis de DNA (273). También es un potente inhibidor de la diferenciación de mioblastos de rata bloqueando la fusión de los mioblastos para formar miotúbulos y la elevación de la creatina quinasa (274).

Por otra parte TGF- β induce la diferenciación epidermoide de las células del epitelio bronquial humano causando i) aumento del área celular, ii) elevación de la actividad extracelular del

activador del plasminógeno, iii) inhibición irreversible de la síntesis del DNA y iv) disminución de la velocidad de crecimiento clonal (275).

Se ha demostrado actualmente que dos factores inductores de cartilago CIF-I y CIF-II aislados de hueso bovino desmineralizado son idénticos respectivamente al TGF- β 1 y TGF- β 2 (240). La actividad biológica descrita para estos factores es la inducción del fenotipo de condrocitos en cultivos primarios de células mesenquimales de fetos de rata. Este fenotipo se evidencia "in vitro" por la producción de proteoglicanos específicos de cartilago y de colágeno tipo II.

En ciertas células tanto mesenquimales como epiteliales cuya proliferación y diferenciación regula, el TGF- β produce una elevación de la síntesis de fibronectina, de varios tipos de colágeno (principalmente del tipo I), de proteoglicanos y de otras proteínas de la matriz extracelular (276,277,278). También, induce la síntesis de receptores de superficie específicos para estos componentes de la matriz extracelular (276,277,278).

Otro efecto biológico del TGF- β es la inducción de la síntesis, en varios tipos celulares, de inhibidores del activador del plasminógeno (PAIs) (279). Se ha sugerido que esto tendría como objeto la estabilización de las proteínas de la matriz extracelular sintetizadas en respuesta al TGF- β .

En células de granulosa en ovario y en células adrenocorticales, TGF- β modula diversas funciones diferenciales. Así, en células de granulosa TGF- β potencia el efecto de la FSH en la

estimulación de la secreción de estrógenos (280). En células de la corteza adrenal TGF- β ejerce un efecto antagónico con ACTH en la inducción de la síntesis de cortisol (281).

MECANISMOS DE ACCION

El mecanismo de acción a nivel molecular del TGF- β no se conoce. Sin embargo, hay ciertos efectos específicos del factor que probablemente están directamente relacionados con su modo de acción. TGF- β modula los receptores de superficie para una serie de factores de crecimiento; en células NRK-49F Assoian y col. (282) han descrito que TGF- β produce un aumento del número de los receptores de baja afinidad del EGF, mientras que los receptores de alta afinidad sufren una disminución transitoria en su número, seguida por una prolongada elevación. Este efecto bifuncional del TGF- β a nivel bioquímico se correlaciona con la acción del factor sobre el crecimiento de las células. En células de granulosa de rata TGF- β también produce un aumento de la síntesis de los receptores para EGF (280).

En linfocitos T el factor bloquea la capacidad de la interleukina 2 (IL-2) de "upregular" sus propios receptores y el receptor de la transferrina (283). En células de granulosa el TGF- β , dependiendo de las concentraciones de este péptido y de FSH, puede aumentar o disminuir los efectos de FSH sobre los receptores de la hormona luteinizante (LH) (280).

Estudios realizados por Like y Massagué (284) han demostrado que TGF- β inhibe la proliferación celular actuando a un nivel distante de los receptores para factores mitogénicos. Estos mismos autores observaron que el TGF- β no produce alteraciones en los primeros eventos de la transducción de la señal de los mitógenos.

TGF- β LATENTE

Desde 1984 se conoce que en los medios condicionados de distintas líneas celulares y de cultivos primarios está presente TGF- β en una forma inactiva. La acidificación de estos medios a pH 3 produce la activación del factor (201).

Otras formas de activación son la alcalinización, los agentes desnaturizantes como la urea o ebullición durante 3 minutos (201). Este comportamiento sugiere que el TGF- β liberado de estas células estaba complejado con una proteína transportadora y que el complejo no podía reasociarse después de la desnaturalización. Las condiciones no enzimáticas empleadas para la activación, hacen improbable que el mecanismo involucre el clivaje del precursor del TGF- β .

Distintos estudios utilizando anticuerpos contra el extremo N-terminal del precursor del TGF- β y realizando cromatografías en geles con SDS en condiciones desnaturizantes de la forma latente del factor, han sugerido que el TGF- β inactivo es un complejo entre una molécula del factor maduro, dos moléculas del extremo

N-terminal del precursor y dos moléculas de un componente de PM 75 KDa que no ha sido identificado (258).

Recientemente, se ha determinado que el TGF- β también puede ser activado por clivaje proteolítico, lo que podría indicar que éste es un posible medio de activación "in vivo" (285).

Además, se ha demostrado que el TGF- β latente no se une a los receptores de TGF- β ni es reconocido por anticuerpos anti-TGF β (258,284). De acuerdo a lo mencionado anteriormente acerca de la escasa regulación del TGF- β a nivel de sus receptores, se piensa que el mecanismo regulatorio más importante en el control de la acción de este factor es la activación de su forma latente.

De acuerdo a los datos obtenidos tanto en los ensayos en medio semisólido de agar como en los de unión a sus receptores, el TGF- β en suero también se encuentra en forma latente (258).

Se conoce actualmente que la proteína transportadora del factor en suero es la α 2macroglobulina (258).

EFFECTOS IN VIVO DEL TGF- β

En experiencias llevadas a cabo con cámaras de metal implantadas subcutáneamente en ratas, se demostró que TGF- β acelera la acumulación de DNA, colágeno y proteínas en el interior de la cámara. Alrededor de la misma se observó una marcada reacción fibrótica (286). Recientemente, se ha demostrado que la inyección subcutánea de TGF- β en ratones recién nacidos causa induc-

ción de la angiogénesis y activación de los fibroblastos para la producción de colágeno en el sitio de la inyección (277). Además, basándose en los hallazgos mencionados anteriormente se han realizado experiencias que han demostrado que TGF- β puede acelerar la cicatrización de heridas incisionales en ratas (277).

TGF- β Y TRANSFORMACION MALIGNA.

Si bien no se ha determinado hasta el momento cuál es la función del TGF- β en el proceso de transformación neoplásica, los distintos grupos de investigadores coinciden en atribuir a este factor un papel fundamental en el proceso que conduce hacia la malignización celular.

En efecto Lippman y col (148) han establecido que en el caso de los tumores de mama humanos la falta de respuesta de las células malignas a la regulación negativa del TGF- β sería la causa de la proliferación sin control de las mismas. Además, han demostrado que los antiestrógenos inducen la síntesis del TGF- β mientras que por el contrario, los estrógenos inhiben la síntesis del factor.

Harris y col. (287) han obtenido resultados semejantes estudiando la transformación de las células del epitelio bronquial, demostrando que la insensibilización de las células al control del TGF β desencadenaría la transformación maligna.

Finalmente, se ha establecido recientemente que las líneas

celulares derivadas de retinoblastomas no responden al TGF- β , mientras que el factor inhibe la proliferación de las células normales de retina (287).

OTROS FACTORES DE TRANSFORMACION

Se han identificado factores de transformación con propiedades diferentes a las de TGF- α y TGF- β . Van Zoelen y col. (288) hallaron en el medio condicionado de la línea de neuroblastoma de ratón NEURO-2A una actividad transformante que estimulaba la formación de colonias de las células NRK-49F en ausencia de EGF o TGF- α exógenos, no era potenciada por el agregado de EGF, no competía por los receptores del EGF y tenía además actividad mitogénica sobre células 3T3. Moses y col. (203) en el medio condicionado de células transformadas químicamente (AKR-MCA y C3H/MCA-58) encontraron una actividad transformante que estimuló a las células AKR-2B y NRK-49F a desarrollar colonias en agar en ausencia de otros factores exógenos, no compitió por los receptores del EGF y presentó actividad mitogénica sobre AKR-2B. Este mismo grupo (204) en embriones de ratón de 17 días determinó la presencia de un TGF que indujo transformación fenotípica de las células NRK-49F, AKR-2B y NR6 (una línea que no posee receptores para EGF), no compitió por los receptores de EGF y actuó

como mitógeno para AKR-2B. Halper y Moses (202) han descrito factores de transformación extraídos de tejido epitelial capaces de estimular el desarrollo de colonias de las células SW-13 (adenocarcinoma de corteza adrenal). Este factor también fue encontrado en el medio condicionado de SW-13, lo que indica una posible autoestimulación en estas células malignas. Hirai y col. (289) aislaron de células de rata transformadas por el virus del sarcoma de aves un TGF lábil en medio ácido capaz de inducir la formación de colonias de células Balb/c3T3 y lo denominaron TGF- β 2.

ADENOCARCINOMA DE MAMA MURINO

La primera descripción de tumores en ratón fue realizada por Crisp en 1854 en animales salvajes (citado por Dunn) (290).

Los factores esenciales involucrados en la génesis de los tumores espontáneos de mama en el ratón son la herencia, la estimulación hormonal de las glándulas mamarias y una partícula viral, transmitida por vía de la leche materna denominada virus de tumor de mama de ratón (MMTV) (291).

La relación entre las hormonas y los tumores de mama de ratón fue sugerida en un principio por Lathrop y Loeb en 1916 (292) quienes demostraron que los cambios hormonales de la preñez conducían al desarrollo de neoplasias en ratones. Estos autores demostraron que hembras con crías eran más susceptibles que las vírgenes a desarrollar tumores de mama y que la ovariectomía reduciría la incidencia de los mismos.

Con la disponibilidad de esteroides aislados químicamente, se demostró en 1933 (293) que los estrógenos inducían cáncer de mama en ratones machos.

En 1939, Loeb y Kirtz (294) observaron que el injerto de hipófisis en los mismos ratones incrementaba la incidencia de tumores de mama. Un estudio posterior de Yanai y Nagasawa (295) sostiene que la prolactina es la hormona secretada por estos injertos y la responsable de la tumorigénesis mamaria murina.

Sin embargo, aunque los estadios del desarrollo de la tumorigénesis mamaria en ratón parecen ser marcadamente influidos por los niveles de prolactina, los tumores mamarios espontáneos se hacen virtualmente independientes de la prolactina en la mayoría de las cepas (296). Parecería que al menos en ciertas cepas las neoplasias mamarias espontáneas evolucionan en forma gradual pero consistente de etapas en las que responden al estímulo de la prolactina a estadios independientes de la misma, lo que es mucho mas común en esta especie que en la rata. En esta última se le ha asignado a la prolactina un importante rol en la inducción de los tumores de mama. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre en ratones, donde los tumores establecidos son prolactina independientes, no solo la génesis de los tumores espontáneos de rata depende significativamente de los niveles de prolactina, si no que se observó que en algunos casos el tratamiento con alcaloides del ergot (supresores de prolactina), a ratas portadoras del tumor, reducía notablemente el tamaño tumoral (297).

Se suponía por lo tanto que la prolactina era fundamental en la tumorigénesis mamaria de roedores en general. Lo avalaba el hecho de que la hipofisectomía sobre todo a muy corta edad, en la mayoría de los casos previene totalmente el desarrollo de tumores mamarios espontáneos (297). Sin embargo, es difícil pensar que la prolactina actúe en la ausencia de estrógenos ya que ratas o ratones ovariectomizados a corta edad desarrollan menos tumores mamarios y si son ovariectomizados y adrenalectomizados raramente desarrollan estas neoplasias (298). Además, donde se vió que la

prolactina acentuaba la tumorigénesis mamaria en hembras deficientes de hormonas sexuales los trabajos se realizaron a una edad tal que los animales ya tenían un gran número de displacias mamarias y por lo tanto , la prolactina podría promover el crecimiento de células ya transformadas. Así es que no se ha demostrado hasta ahora que las hormonas hipofisiarias puedan iniciar la inducción temprana de tumores mamarios en animales libres de hormonas esteroides sexuales.

En ratas y ratones se demostró que los estrógenos estimulan la síntesis y secreción de prolactina. En cambio, la progesterona demostró ser menos efectiva en este aspecto (299). Sin embargo, ciertos progestágenos sintéticos resultaron ser mucho mas activos en la estimulación del crecimiento mamario que el benzoato de estradiol y/o la prolactina estimulada por el benzoato de estradiol, a pesar de que aquellos tuvieran un menor efecto sobre los niveles de prolactina. Por lo tanto, dado que la prolactina es luteotrófica, el efecto de la misma podría estar mediado por la progesterona (300). Algunos trabajos sugieren que el rol luteotrófico de la prolactina sería complementario al de la progesterona (y progestágenos sintéticos) y actuaría sólo en forma permisiva (301). Existen también otras evidencias que indicarían que la progesterona podría desempeñar un papel importante en el desarrollo de las neoplasias mamarias. Por ejemplo, se ha demostrado que la administración de progestágenos podría tanto aumentar como disminuir la incidencia de tumores mamarios

inducidos por carcinógenos químicos dependiendo del momento y duración del tratamiento con respecto de la administración del carcinógeno (302). En ratas Manni y col. (303), utilizando un modelo dependiente de tumor de mama inducido por uretano, demostraron que concentraciones bajas de progesterona y de R5020 tenían un efecto estimulador del crecimiento in vitro, mientras que altas concentraciones tenían el efecto inverso, sugiriendo que los progestágenos podrían tener un efecto dual. En ratones se han caracterizado los tumores de mama dependientes de la preñez en la cepa GR y se ha demostrado que el crecimiento se puede mantener si se administran estrógenos y progesterona. Existe además un modelo murino, desarrollado por Watson y col. (304). El tumor original se presentó en un ratón C57BL/DBA2F1 tratado con uretano que llevaba una hipófisis implantada en la cápsula renal. En este modelo, denominado MXT, se demostró que pequeñas cantidades de progesterona aumentaban la proliferación de las células tumorales.

INDUCCION DE ADENOCARCINOMAS DE MAMA EN RATONES POR ACETATO DE MEDROXIPROGESTERONA

El acetato de medroxiprogesterona (MPA) es un progestágeno sintético derivado del pregnano (17 alfa-acetoxiprogesterona).

En general, los progestágenos no son solamente específicos para los receptores de progesterona, si no que son capaces de

unirse a receptores de andrógenos, estrógenos y glucocorticoides, aunque con menor afinidad que al receptor de progesterona.

La actividad antiestrogénica de los derivados del pregnano es bien conocida, en particular para el MPA (305). Por lo tanto, los derivados del pregnano son muy parecidos a la progesterona en cuanto a su actividad antiestrogénica, a pesar de lo cual también se ha reportado que el MPA administrado en grandes concentraciones podría tener propiedades estrogénicas (300).

El MPA puede también actuar como la testosterona ya que ambos por ejemplo, aumentan la síntesis del EGF en ratones hembras y machos castrados. De los progestágenos estudiados el MPA es el que demostró tener la mayor actividad androgénica (306).

Entre los usos clínicos del MPA se encuentran 1) tratamiento de la amenorrea secundaria y la metrorragia uterina disfuncional, 2) tratamiento de endometriosis y carcinomas endometriales recurrentes, 3) como anticonceptivo, 4) tratamiento de dismenorrea, tensión premenstrual, infertilidad luteal, pubertad precoz, 5) aditamento en la terapia cíclica con estrógenos, 6) terapia en carcinomas de mama, endometrio, testículo, ovario y riñón (307, 308).

Durante los últimos años se han usado dosis altas de MPA para el tratamiento de tumores de mama y otras neoplasias hormonodependientes ya que los resultados obtenidos fueron mejores que con dosis bajas, obteniéndose mas de un 30-40 % de respuesta en pacientes con tumores de mama avanzados (309). Además, se vio que existe una relación directa entre el contenido de receptores

de estrógenos y la magnitud de la respuesta a la terapia (310).

Se proponen cuatro posibilidades para explicar la actividad terapéutica del MPA sobre el tumor de mama avanzado en mujeres (311):

1) Efecto anticelular directo:

Se asume por analogía con los carcinomas endometriales, que el MPA tiene la capacidad de reducir el índice mitótico y/o inhibir la síntesis de ácidos nucleicos (312). En carcinomas endometriales se observó que el MPA lesionaba estructuras cromosómicas produciendo fragmentaciones y pulverizaciones (313).

2) Interacción con hormonas circulantes:

La acción antiestrogénica del MPA tiene lugar 1) bloqueando la secreción de gonadotrofinas, b) bajando las concentraciones de estradiol intracelular, c) reduciendo la transformación de andrógenos a estrógenos en el hígado.

La acción antiandrogénica se produce de dos maneras: i) disminuyendo los niveles de testosterona por la reducción de la LH circulante (actividad mediada por la hipófisis) ii) incrementando la metabolización de la testosterona en el hígado.

3) Interacción con los receptores de estrógenos y progesterona.

In vitro se observó que a) inhibe mas del 80 % del receptor del 17- β -estradiol; b) inhibe la síntesis del receptor de progesterona. Finalmente se sugirió la interacción aunque con menor

afinidad de los receptores de andrógenos y corticoides.

4) Bloqueo de la hipófisis.

Parecería que la actividad del MPA sobre la hipófisis tiene lugar a través de la inhibición de gonadotrofinas, adenocorticotrofina y cortisol, también es probable que tenga un efecto sobre la secreción de prolactina.

Como conclusión puede postularse un mecanismo dual para la actividad antitumoral del MPA sobre el tumor mamario:

i) Aditivo: efecto anticelular directo, interacción con los receptores hormonales, interferencia con las hormonas circulantes.

ii) Ablativo: privación indirecta de estrógenos, a través de la interferencia con el eje hipotalámico-hipofisiario.

En animales, existen muy pocos estudios de la carcinogenicidad del MPA. En uno de ellos 33 hembras Marsh fueron tratadas con dos dosis de 5 mg de MPA y seguidas durante 20 meses. No se observó incremento en el número de tumores con respecto a los controles (314). Además, Nagasawa y col. (315) comprobaron que el MPA disminuye la formación de lesiones hiperplásicas lobulilares en ratones de la cepa SHN; la exposición a la hormona fue de menos de 2 meses.

El hallazgo que el MPA induce adenocarcinomas de mama en ratones hembras BALB/c, el modelo estudiado en este trabajo, fue

casual.

Dado que había muchas evidencias que indicaban que los progestágenos podrían tener un efecto anti-inflamatorio y sobre todo anti-fibrotico se decidió investigar si el MPA podría inhibir el desarrollo de fibrosarcomas inducidos por la implantación subcutánea de un cilindro de vidrio. Se observó efectivamente que en los ratones tratados con MPA, ya sea en el flanco contralateral al cuerpo extraño o in situ, se desarrollaban menos fibrosarcomas que en los controles sin tratar, pero inesperadamente se observó que en las pocas hembras inoculadas con MPA aparecieron adenocarcinomas de mama (316).

OBJETIVOS

Los objetivos de este trabajo fueron:

- 1) El aislamiento de factores de transformación de neoplasias malignas humanas de distinto origen embrionario y tipo histológico.
- 2) La purificación de los TGFs aislados.
- 3) La caracterización biológica de los TGFs
- 4) El aislamiento de TGFs de tumores inducidos por acetato de medroxiprogesterona en hembras vírgenes de la cepa Balb/c.
- 5) La purificación de los TGFs aislados.
- 6) La caracterización biológica de los TGFs
- 7) El estudio de la síntesis de EGF e IGF-I en las células de los distintos tipos de tumores experimentales.
- 8) La determinación de la influencia del acetato de medroxiprogesterona en la síntesis de EGF e IGF-I.

- 9) El estudio de la presencia de receptores para EGF e IGF-I en estos tumores.

- 10) La caracterización estructural de los receptores para EGF e IGF-I presentes en las células de los tumores experimentales.

- 11) El estudio de la relación entre la presencia de receptores para estrógenos y progesterona y receptores para EGF e IGF-I en los tumores inducidos por medroxiprogesterona.

MATERIALES Y METODOS

METODOS GENERALES

1) TUMORES HUMANOS

Las neoplasias malignas humanas se obtuvieron por cirugía. Las piezas quirúrgicas se transportaron en hielo seco y se mantuvieron a -70 °C hasta el momento de su utilización.

2) TUMORES EXPERIMENTALES

A) Inducción de adenocarcinomas de mama por MPA

Se utilizaron ratones hembras de la cepa BALB/c de dos meses de edad obtenidos del bioterio de la Sección Leucemia Experimental del Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina. Estos ratones se alimentaron con dieta balanceada de Cargill y agua "ad libitum" y se subdividieron en dos grupos: i) 40 ratones fueron inoculados con 40 mg de MPA depot (Farlutale 500, Farmitalia) subcutáneo cada 2 meses durante 1 año, ii) 42 ratones fueron inoculados de la misma manera con el excipiente de la hormona. Los animales fueron controlados semanalmente, cuando los tumores comenzaban a aparecer los ratones eran separados y sacrificados cuando el tumor tenía aproximadamente 1 cm³. Se consideró arbitrariamente como fecha aparente

de aparición de un tumor la fecha en la cual el tumor era palpable. Muestras de algunos tumores fueron conservadas a -70°C y otras transplantadas en ratones singeneicos. En todos los casos se realizaron autopsias completas.

Para calcular el porcentaje de incidencia tumoral teniendo en cuenta el riesgo de desarrollar tumor que tuvieron los animales que murieron durante el transcurso del experimento, se utilizó el siguiente método (316): Se dividió el tiempo que duró la experiencia en intervalos iguales de 10 semanas cada uno. Dentro de cada intervalo se calculó el número de animales expuestos a riesgo (n^*) mediante la fórmula:

$$n^* = n - 0.5(z + w)$$

donde n es el número de animales vivos al principio del intervalo, z el número de animales que mueren durante el intervalo y w el número de animales que se retiran del experimento por algún motivo especial. La incidencia de tumores en cada intervalo es la relación entre los animales portadores de tumor y el n^* . Como es una incidencia acumulativa a cada porcentaje se le suma el porcentaje obtenido en el intervalo anterior

B) Estudios morfológicos e inmunohistoquímicos

En todos los casos muestras de los tumores de mama y de otros órganos fueron fijadas en etanol 95% e incluidas en parafina. Los cortes obtenidos fueron coloreados con hematoxilina-eosina y PAS para fines diagnósticos. En algunos de los cortes

histológicos de los tumores de mama se investigó la presencia de citoqueratina, vimentina y desmina mediante la técnica ABC de Hsu y col. (317). Los antisueros monoclonales (vimentina) y policlonales (citoqueratina y desmina) fueron obtenidos de Dako Immunoglobulins Inc. (Chemetron Latinoamericana). El kit ABC de ratón fue obtenido de Vector Laboratories (Burlingame CA).

C) Transplantes singeneicos de los adenocarcinomas de mama inducidos por MPA

Cinco tumores de mama inducidos por MPA que habían sido transplantados en ratones hembras BALB/c y que habían crecido después de varios meses de su inoculación (4 a 12 meses) fueron elegidos para el estudio de la hormonodependencia. Uno de ellos, dio origen a dos líneas tumorales ya que se había transplantado a dos animales y en cada uno tuvo un comportamiento diferente. Los tumores pertenecientes a estas dos líneas fueron los estudiados en este trabajo. Los tumores fueron transplantados en cada caso en 4 ratones hembras tratados con 40 mg de MPA depot y en 4 hembras sin tratar. A partir de estos pasajes se hicieron otros y así sucesivamente.

Se controlaron los tumores cada 3 días y se los midió con un calibre. Se consideró la latencia de aparición la fecha en la cual se hacían palpables.

3) CUANTIFICACION DE PROTEINAS

Se utilizó el método de Bradford (318). Se disolvieron 25 mg de Coomassie Brilliant Blue en 12.5 ml de etanol 95 % y se añadieron 25 ml de ácido fosfórico 85 % (p/v). Se diluyó la solución resultante a un volumen final de 250 ml. Las concentraciones en el reactivo fueron: Coomassie Brilliant Blue 0.01%, etanol 4.7 % y ácido fosfórico 8.5 % (p/v). Se usó como patrón una solución de albúmina sérica bovina de 0.5 mg/ml calibrada espectrofotométricamente considerando $A_{280} 1\% = 6.6$. Se efectuaron las lecturas a 595 nm y a temperatura ambiente.

En otras experiencias se utilizó el método de Lowry (319)

4) EXTRACCION ACIDO-ALCOHOLICA DE FACTORES DE CRECIMIENTO Y TRANSFORMACION

Se utilizó la técnica de Roberts (192,194). Los tejidos se homogeneizaron con 4 ml/g de una solución compuesta por 375 ml de etanol 95% v/v, 7.5 ml de ácido clorhídrico (c), 33 mg de fenilmetilsulfonil fluoruro y 1.9 mg de pepstatin A. Posteriormente se adicionó agua destilada (4-6 ml/g de tejido). Se disgregó el tejido y se agitó la mezcla suavemente durante una noche a 4 °C. Se centrifugó a 20,000 g durante 30 minutos y el precipitado resultante se extrajo durante 4 horas a 4 °C con una solución de 375 ml de etanol 95 %, 105 ml de agua destilada y 7.5 ml de ácido clorhídrico (c).

Se unieron ambos sobrenadantes y se ajustó el pH a 5.2 con hidróxido de amonio concentrado. Se agregó 1 ml de "buffer" acetato de amonio 2M, pH 5.3 cada 85 ml de extracto. Se agregaron 2 volúmenes de etanol anhidro y 4 volúmenes de eter frío libre de peróxidos.

Se mantuvo una noche a -20°C . El precipitado resultante se centrifugó o se recogió por filtración y se redisolvió luego en ácido acético 1 M (3-4 ml/g de tejido). El extracto obtenido se dializó durante una noche a 4°C con ácido acético 0.17 M y se liofilizó.

5) TRATAMIENTOS FISICO-QUIMICOS DE LOS EXTRACTOS CRUDOS

Se utilizaron alícuotas de 1 mg de proteína de los extractos crudos las que se disolvieron en 1 ml de Dulbecco PBS, pH 7.2.

Una de las alícuotas se calentó a 56°C durante 30 minutos. Otra fue tratada con ditiotreitól (0.065 M ditiotreitól, 0.1 M NH_4HCO_3 en PBS, pH 7.2) durante 1 hora a temperatura ambiente.

Para determinar los efectos de la tripsina una alícuota se incubó con 50 ug/ml de esta sustancia (Tripsina Cristalina tipo 3, Worthington Biochemicals) por 2 horas a 37°C . La reacción se detuvo agregando 100 ug/ml de inhibidor de tripsina de soja (SIGMA). Como control se preincubaron 100 ug de inhibidor de tripsina de soja con 50 ug de tripsina a temperatura ambiente durante 2 horas y luego se agregó la muestra durante 2 horas a 37°C .

°C. Después de cada uno de estos tratamientos se llevó cada alicuota a un volumen de 4 ml con PBS se dializó contra ácido acético 1 % y se liofilizó.

6) CULTIVOS CELULARES

Se utilizó la línea celular NRK-49F de fibroblastos normales de riñón de rata (American Type Culture Collection N° 1570)

Las células se mantuvieron en medio Mc Coy's 5A con el agregado de 10 % de suero fetal bovino (SFB) (GIBCO o FLOW). Se congelaron ampollas de los distintos repiques y todos los experimentos se llevaron a cabo dentro de los 10-14 pasajes del "stock" congelado. Las células se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera humidificada de 5 % de CO₂ y 95 % de aire.

7) ENSAYOS DE ACTIVIDAD TRANSFORMANTE EN MEDIO SEMISOLIDO DE AGAR

Los ensayos se realizaron utilizando como indicadora la línea celular NRK-49F. Se utilizaron cajas de Petri de 35 mm (Falcon N°3001) preparando una capa inferior de 1 ml de agar al 0.5 % (Bacto Agar, Difco) en medio Mc Coy's 5A con 10 % de SFB. Después de la solidificación de esta capa se coloca una capa superior de 1 ml que contiene agar al 0.3 % en medio Mc Coy's 5A

con 10 % de SFB y 5×10^3 células NRK-49F y las cantidades apropiadas de los factores de crecimiento y transformación a ensayar.

En los ensayos donde se probó potenciación de la actividad transformante por el EGF se colocaron en la capa superior las concentraciones de EGF indicadas en cada caso. De la misma forma, para estudiar el bloqueo de la actividad biológica por anticuerpos específicos, éstos fueron agregados en la capa superior junto con el TGF en estudio.

8) ENSAYOS DE ACTIVIDAD MITOGENICA/EFFECTOS SOBRE LA SINTESIS DE DNA INDUCIDA POR EGF E INSULINA EN LAS CELULAS NRK-49F

Se describe aquí el ensayo en las condiciones óptimas de trabajo determinadas en la Sección DESARROLLO DE METODOS EXPERIMENTALES PARA LA CARACTERIZACION DE TGFs (2 A).

Se sembraron 200 μ l de una suspensión de 10^6 células NRK-49F/ml en medio Mc Coy's 5A con 10% de SFB en cada hoyo de una microplaca de cultivo de 6.4 mm de diámetro/hoyo. Después de 24 horas de incubación a 37 °C en una atmósfera humidificada de 5% CO₂ y 95% de aire, se arrestó el crecimiento celular reemplazando el medio por 200 μ l de Mc Coy's 5A con 0.5% de SFB y se incubó durante 72 horas al cabo de las cuales se agregó el TGF a estudiar disuelto en 50 μ l de Mc Coy's 5A con 0.5% de SFB. Cuando se estudio el efecto de los TGFs sobre la síntesis de DNA inducida por EGF e insulina en las células NRK, se agregaron 5

ug/ml de insulina y 10 ng/ml de EGF, junto con los TGFs. Después de 8 horas se agregaron 20 ul de (³H)timidina (1 uCi/ml, 20 Ci/mmol, New England Nuclear) durante 16 horas. Luego las células se tripsinizaron y se recogieron en papeles Whatman GF/A utilizando un cosechador de células. Los papeles se colocaron en viales con líquido de centelleo y se determinó la radioactividad en un contador de centelleo líquido Packard 3002. Todos los ensayos se realizaron por cuadruplicado.

9) CROMATOGRAFIA DE EXCLUSION MOLECULAR

Se utilizaron columnas de Bio-Gel P-60 equilibradas con ácido acético 1 M.

En el caso de la purificación de los TGFs de los tumores humanos, los extractos ácido-alcohólicos liofilizados se disolvieron en 5 ml de ácido acético 1 M y se centrifugaron a 10,000 g durante 30 min. Los sobrenadantes se sembraron en una columna de 2.6 X 60 cm y fueron eluidos a una velocidad de 20 ml/hora a temperatura ambiente. Se juntaron fracciones de 4.3 ml y se determinó la absorbancia a 280 nm de cada una. Se liofilizaron alícuotas de las fracciones para determinar transformación en medio semisólido de agar, potenciación de la actividad transformante por EGF, competición por los receptores del EGF, actividad mitogénica sobre células NRK-49F en monocapa y efectos sobre la síntesis de DNA inducida por EGF e insulina en estas células.

La purificación de los extractos crudos de los tumores experimentales se realizó en idénticas condiciones, modificándose solo la velocidad de elución que fue de 16 ml/hora y en este caso las fracciones fueron de 3 ml.

10) CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA PRESION (HPLC)

Los TGFs aislados de los tumores experimentales y el TGF- β aislado de plaquetas humanas fueron purificados por cromatografía líquida de alta presión.

En el caso del TGF- β de plaquetas humanas las fracciones 66-76 de la columna de Bio-Gel P-60 fueron unidas y liofilizadas. Se sembró 1/4 parte de este "pool" de proteínas (2 mg) en una columna de interacción hidrofóbica TSK Phenyl 5 PW (Pharmacia-LKB) equilibrada con acetato de amonio 1.5 M. La muestra se disolvió en 1 ml de "buffer" acetato de amonio 1.5 M, pH 5.3 y se eluyó utilizando un gradiente lineal entre 1.5 M y 0.02 M de acetato de amonio a una velocidad de 1.5 ml/min durante 27 minutos y a temperatura ambiente. La absorbancia del efluente fue monitoreada continuamente a 280 nm.

Se colectaron fracciones de 3 ml y 1/10 parte de cada una fue liofilizada para determinar actividad transformante en presencia de EGF.

En las neoplasias experimentales se purificaron, utilizando esta metodología, las fracciones que presentaron actividad trans-

formante en el paso anterior de purificación en columnas de Bio-Gel P-60.

Cinco mg de proteína del "pool" de fracciones correspondientes a cada uno de los TGFs aislados y purificados de los tumores se disolvieron en 2 ml de acetato de amonio 1.5 M ,pH 5.3 y se sembraron en una columna de las mismas características que la usada para el TGF β de plaquetas. Se trabajó además en idénticas condiciones que las descritas para el TGF β .

11) TRATAMIENTO DE LOS TEJIDOS PARA LOS ESTUDIOS DE RECEPTORES HORMONALES

Todos los procedimientos se realizaron a 0-4 °C. Las muestras congeladas fueron pesadas, trituradas y llevadas a un volumen de 1:4 con un "Buffer" 20 mM Tris ClH, pH 7.4 conteniendo 1.5 mM EDTA, 0.25 mM DTT, 20 mM molibdato de sodio y 10% v/v de glicerol. Se homogeneizó con un homogeneizador Ultraturrax (IKA Instruments) durante 15 segundos con intervalos de enfriamiento de 1 minuto en hielo. El homogenato se centrifugó a 800 g durante 15 minutos y el sobrenadante resultante se centrifugó luego a 12,000 g 30 minutos . Finalmente este último sobrenadante se centrifugó a 105,000 g en una ultracentrifuga Beckman (L2-65B). La fracción sobrenadante se utilizó para los estudios de receptores de esteroides.

12) PREPARACIONES DE MEMBRANA PARA EL ESTUDIO DE RECEPTORES DE FACTORES DE CRECIMIENTO

- A) Obtención de receptores para EGF de membranas plásmáticas de placentas humanas a término.

El tejido libre del corion, amnios, cordón y grandes vasos fué homogeneizado 1/10 (p/v) en "buffer" Tris 25 mM, pH 7.4, conteniendo sacarosa 0.25 M, benzamidina 10 mM y fenilmetilsulfonilfluoruro 1 mM. Se utilizó un homogeneizador Ultraturrax (IKA Instruments). Se realizó una primera centrifugación de este homogenato a 600 g durante 10 minutos y el sobrenadante se centrifugó nuevamente a 10,000 g 30 minutos. Este último sobrenadante se llevó a una concentración de 0.1 M ClNa y 20 mM SO₄Mg y se centrifugó a 48,000 g por 40 min en una ultracentrífuga Beckman (L2 65B). El precipitado resultante se resuspendió en PBS Dulbecco pH 7.4 (5-10 mg proteína/ml) y se utilizó como fuente de receptores para EGF.

- B) Tratamiento de los tejidos tumorales para la obtención de receptores para IGF-I y EGF

- I) Obtención de membranas para la determinación de receptores totales.

Esta técnica está basada en lo descrito por Calvo y col. (320) para la obtención de receptores de hormona luteinizante

En este procedimiento el tratamiento de los tejidos con un "buffer" de pH 3 permite la disociación del factor de crecimiento endógeno de los receptores de membrana. Los tumores se removieron de los animales y fueron procesados inmediatamente. Todos los procedimientos se llevaron a cabo en frío.

Los tejidos tumorales se homogeneizaron en relación 1/4 (p/v) (Ultraturrax) con 3 pulsos de 30 segundos, utilizando un "buffer" glicina 50 mM, ClNa 100 mM, pH 3 con fenilmetilsulfonilfluoruro 0.5 mM, ZPCK (N-CBZ-L-fenilalanina clorometil cetona) 0.025 mM, TPCK (N-Tosil-L-fenilalanina clorometil cetona) 0.025 mM y TLCK (N_ε-p-Tosil-L-lisina clorometil cetona) 0.025 mM. Este homogenato se filtró por membrana de Nitex y se centrifugó a 13,000 g durante 30 min. El pellet resultante se resuspendió en el volumen original de "buffer" Tris 10 mM pH 7.4 conteniendo sacarosa 0.25 M, EDTA 1 mM, PMSF 0.5mM, ZPCK 0.025M, TPCK 0.025 mM y TLCK 0.025 mM y se centrifugó a 800 g durante 10 minutos. Este pellet se resuspendió en el volumen original del "buffer" anterior y se centrifugó a 800 g 10 minutos. Los sobrenadantes resultantes de las dos últimas centrifugaciones se unieron y se centrifugaron a 1000 g 15 minutos. El sobrenadante se centrifugó finalmente a 13,500 g durante 45 minutos. El precipitado o el sobrenadante obtenidos de esta última centrifugación se trataron de diversas formas:

i) para ciertos ensayos de caracterización de receptores,

mediante en empleo de reactivos de entrecruzamiento, se resuspendió el precipitado en PBS Dulbecco en una concentración de proteína de 10 mg /ml.

ii) para los ensayos radioligando-receptor y otras experiencias de caracterización de receptores el sobrenadante se llevó a una concentración de 0.1 M ClNa y 20 mM de SO₄Mg y se centrifugó a 100,000 g durante 1 hora. El precipitado resultante se resuspendió en PBS Dulbecco en una concentración de proteína de 10 mg/ml.

II) Obtención de preparados de membrana libres de proteína transportadora de IGF-I.

Los tejidos tumorales se homogeneizaron en relación 1/4 (p/v) en "buffer" glicina 50 mM, ClNa 100 mM, pH 3 con los inhibidores de proteólisis descritos en B) en un homogeneizador Ultraturrax con 3 pulsos de 30 segundos. Este homogenato se filtro por membrana de Nitex y se centrifugó a 105,000 g por 30 minutos. El precipitado se resuspendió en el volumen original en "buffer" sacarosa 0.25 M, Tris 10 mM, pH 7.4 con inhibidores de proteólisis y se centrifugó a 5000 g durante 10 minutos. El precipitado resultante se resuspendió en el "buffer" sacarosa 0.25 M, Tris 10 mM y se centrifugó en las condiciones anteriores. Los sobrenadantes de las dos últimas centrifugaciones se diluyeron 1/2 con "buffer" Tris 25 mM, ClMg₂ 10 mM pH 7.4 y se centrifugaron a 105,000 g durante 1 hora. A este preparado se lo

denominó fracción microsomal. Esta fracción microsomal se resuspendió en "buffer" Tris 25 mM, ClMg₂ 10 mM y se incubó durante 1 noche a 4 °C con agitación. Luego se centrifugó a 105,000 g durante 45 minutos utilizándose esta fracción microsomal lavada para los ensayos radioligando-receptor de IGF-I y para caracterización del receptor de IGF-I.

En todos los casos para establecer la concentración de proteína en los preparados de membrana, se solubilizaron alícuotas de las suspensiones de membrana en NaOH 0.5 M a 90 °C durante 30 minutos y luego se determinó la concentración proteica de acuerdo al método de Lowry (319).

13) ESTUDIOS DE RECEPTORES PARA HORMONAS ESTEROIDEAS

Reactivos: (2,4,6,7,-³H) Estradiol (85 Ci/mmol) y (17 - methyl-³H)R5020 (87 Ci/mmol) y R5020 no radioactivo fueron obtenidos de New England Nuclear Corp., Boston, MA. Los esteroides no marcados [diethylbestrol (DES), cortisol, dihidrotestosterona (DHT)] fueron obtenidos de SIGMA. La prolactina humana fue una donación del National Hormone and Pituitary Program, NIAMNN (NIH-h-PRL-VL53). Ultragel ACA-54 se obtuvo de LKB, Bromma.

A) Medición de receptores para estrógenos y progesterona

Este método está basado en el priginal descrito por Korenman y Dukes (321) que ha sido recientemente modificado por Calandra y col. (322).

Se incubaron alícuotas de 100 μ l de citosol con una serie de concentraciones de (3 H)estradiol (0.2-30 nM) o (3 H)R5020 (0.2-30 nM), con o sin un exceso de 100 veces en molaridad de DES o R5020. La unión inespecífica del estradiol y el R5020 a la globulina transportadora de hormonas sexuales o a la transportadora de cortisol fue eliminada mediante el agregado de un exceso de 200 veces en molaridad de DHT y cortisol respectivamente. Para analizar los datos se utilizaron gráficos de Scatchard (323). En algunos casos, dado el pequeño tamaño de la muestra tumoral el ensayo fue realizado con una concentración única de saturación. Tanto para estrógenos como para R5020 los resultados se expresaron en fmoles/mg de proteína.

14) ESTUDIOS DE RECEPTORES PARA EGF E IGF-I

A) Marcación y purificación del EGF.

mEGF (Collaborative Research, receptor grade) fue marcado mediante la adición consecutiva de alícuotas de 5 μ l de

una solución diluída (0.006%) de cloramina T a 10 ul de "buffer" fosfato pH 7.4 conteniendo 1 mCi de Na¹²⁵I (Carrier Free, New England) y 5 ug de EGF. La iodación se detuvo cuando la actividad específica estimada por precipitación con TCA fue de aproximadamente 150 uCi/ug. La mezcla de reacción se transfirió a una columna de Sephadex G-25 de 0.9X10 cm, equilibrada previamente con PBS conteniendo 0.2% de albúmina sérica bovina. La actividad específica final fue determinada por estudios de auto-desplazamiento (320) y la Máxima Capacidad de Unión utilizando la preparación de membranas de placentas humanas a término descrita en 12) A.

B) Marcación y purificación de IGF-I

IGF-I (Bachem Inc.) fue marcado y purificado utilizando el mismo procedimiento que el descrito para el EGF. La actividad específica final fue determinada por análisis de autodesplazamiento y la Máxima Capacidad de Unión utilizando los preparados de membranas de los tumores experimentales inducidos con MPA.

C) Ensayos de radioligando-receptor para EGF e IGF-I

I) Estudios de competencia de los TGFs aislados de los tumores humanos y experimentales por los receptores del EGF aislados de membranas de placentas humanas.

Seis ug de proteína de los preparados de membranas de placentas humanas se incubaron a temperatura ambiente con 0.04 pmoles de ^{125}I -mEGF y cantidades crecientes de mEGF o de cada uno de los TGFs aislados y purificados de los tumores, en un volumen final de 0.2 ml de "buffer" PBS Dulbecco con 2 % de albúmina sérica bovina. El tiempo de incubación fue de 2 horas al cabo de las cuales la hormona unida fue separada por filtración en filtros HAWP (Millipore). La radioactividad retenida fue contada en un espectrómetro γ . La unión inespecífica fue aquella que ocurrió en presencia de un exceso de 500 ng de EGF.

II) Estudios de unión de EGF a sus receptores en los tumores experimentales.

Los estudios de unión del EGF a sus receptores de membrana, en los distintos tumores, se llevaron a cabo en buffer PBS Dulbecco , pH 7.4 conteniendo 2 % de albúmina sérica bovina. El volumen final de incubación fue de 250 ul. Se incubaron 100 ug de proteína de los preparados de membrana con ^{125}I -mEGF (27-1500 pM) 2 horas a temperatura ambiente, o en otras experiencias una noche a 4 °C. La hormona unida fue separada por filtración en filtros HAWP y la radioactividad retenida contada en un espectrómetro γ . Se consideró unión inespecífica la que ocurrió en presencia de un exceso de 500 ng de EGF.

Todas las determinaciones se realizaron por triplicado y los

datos de la unión del EGF a su receptor fueron analizados utilizando el método de Scatchard (323).

Otras experiencias fueron realizadas en condiciones de saturación utilizando 2 nM ^{125}I -EGF.

III) Estudios de unión del IGF-I a sus receptores en los tumores experimentales.

La metodología fue idéntica a la descrita para EGF, incubándose 100 ug de proteína de los preparados de membrana con ^{125}I IGF-I (33-1000 pM) en un volumen final de 250 ul de buffer Tris 25 mM, ClMg 10 mM, pH 7.4. Nuevamente la unión inespecífica fue determinada en presencia de un exceso de 500 ng de IGF-I. La hormona unida fue separada por filtración en filtros HAWP. Los ensayos se realizaron por triplicado y los datos se analizaron según el método de Scatchard (323).

Otras experiencias fueron realizadas en condiciones de saturación utilizando 1.58 nM ^{125}I -IGF.

15) ESTABILIZACION COVALENTE DE LOS COMPLEJOS HORMONA RECEPTOR. ESTUDIOS CON REACTIVOS DE ENTRECruzAMIENTO.

Para la caracterización de los receptores de EGF e IGF1 en los tejidos tumorales se utilizaron los preparados de membrana obtenidos según las técnicas descritas en 12.B.I. y II.

Se incubaron alícuotas de 200 a 1000 ug de proteína de mem-

brana con 1.50 nM 125 I EGF o 1.12 nM 125 I IGF-I en presencia y ausencia de 500 ng de EGF o de IGF-I, en buffer PBS Dulbecco pH 7.4, conteniendo 2 % de albúmina sérica bovina para el EGF y en "buffer" Tris 25 mM, ClMg 10 mM, pH 7.4 para el IGF-I. Se incubó durante una noche a 4 °C. Luego, se diluyeron las muestras con PBS Dulbecco y se centrifugaron a 12,000 g durante 2 minutos. El precipitado resultante se resuspendió en 1000 ul del mismo buffer, y se centrifugó en las condiciones anteriores para lograr una completa eliminación de los GFs marcados no unidos. El precipitado resultante se resuspendió en 195 ul de PBS Dulbecco y se agregaron 5 ul de disuccinimidil suberato (DSS) (Pierce) en dimetilsulfóxido, siendo la concentración del DSS en la mezcla de reacción de 0.2 mM. Se incubó durante 15 min a 0 °C al cabo de los cuales se detuvo la reacción por dilución con buffer Tris 1M, EDTA 1 mM, pH 7.4. Se dejó la mezcla de reacción durante 5 minutos con este buffer y luego se centrifugó a 12,000 g por 2 minutos.

Con el precipitado resultante se realizó la electroforesis.

16) ELECTROFORESIS Y AUTORADIOGRAFIA

Las muestras tratadas como se describió en 15) se disolvieron en 50 ul de buffer Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 6.8 con 5 % de β -mercaptoetanol y 2 % de dodecilsulfato de sodio (SDS) y se calentaron a 100 °C durante 3 minutos. Se centrifugó a 12,000 g

4 minutos para eliminar el material insoluble y se agregó azul de bromofenol (0.005 %).

Se realizó la electroforesis de las muestras en geles de poliacrilamida al 7.5% con SDS (SDS-PAGE) utilizando el sistema discontinuo de Laemmli (325). Después de la electroforesis, los geles se fijaron y se tiñeron las proteínas con Coomassie Blue R250 (Bio-Rad) al 0.1 % en metanol 40 % y ácido acético 10 %. Luego se destiñieron se secaron los geles y se realizó la autoradiografía a - 70 °C durante los tiempos indicados en cada experiencia utilizando películas Kodax XAR-5 y pantallas amplificadoras Dupont.

Los marcadores de PM fueron miosina (cadena H) PM 200,000; fosforilasa B PM 97,400; albúmina sérica bovina PM 68,000; quimotripsinógeno PM 25,7000; β -lactoglobulina PM 18,400; lisozima PM 14,300 (Bethesda Research Laboratories).

17) RADIOINMUNOANALISIS DE EGF

El volumen de incubación de 0.5 ml se compuso de 200 ul de EGF standard o de las muestras a analizar, 100 ul de anti-mEGF de conejo apropiadamente diluido (1:100,000 dilucion final), 100 ul de suero normal de conejo al 3 % y 20,000 dpm de 125 I-mEGF en 100 ul de "buffer" PBS. Las muestras se incubaron a 4 °C durante 2 días y luego se agregó el segundo anticuerpo (anti conejo IgG) y se incubó durante otras 12 horas.

Se centrifugó, se descartaron los sobrenadantes y se contaron los precipitados en un espectrometro γ . Los standards se ensayaron por triplicado en dos diluciones. El límite de detección de este ensayo fue de 32 pg.

18) RADIOINMUNOANALISIS DE IGF-I

El volumen de incubación de 0.4 ml consistió en 200 ul de IGF-I standard o las muestras a analizar, 100 ul de anti IGF-I de conejo apropiadamente diluido (1:5000, dilución final) suero normal de conejo al 3 % y 20,000 dpm de ^{125}I IGF-I en 100 ul de "buffer" PBS. Las muestras se incubaron a 4 °C por dos días y luego del agregado de 100 ul de suero normal de conejo al 3% ,se agregó el segundo anticuerpo (anti-conejo IgG) y se incubaron los tubos durante 12 horas. Después de centrifugar se descartaron los sobrenadantes y los precipitados se contaron en un espectrometro γ

Los standards se ensayaron por triplicado en dos diluciones. El límite de detección de este ensayo fue de 19.5 pg.

19) DETERMINACION DE LA PRESENCIA DE LA PROTEINA TRANSPORTADORA DE IGF-I

Se incubó 1/15 parte de las fracciones colectadas en las cromatografías en Bio-Gel P-60, de cada uno de los tumores, con 20,000 dpm de ^{125}I -IGF-I durante 16 horas a 4 °C. Luego, se separó la hormona libre de la unida mediante en agregado de 0.5 ml de Norit A al 2.5 % con 2 % de HSA.

DESARROLLO DE METODOS EXPERIMENTALES PARA LA CARACTERIZACION BIOLOGICA DE TGFS

Para realizar la caracterización de los TGFS aislados de las neoplasias malignas fue necesario en primer lugar desarrollar la metodología específica para la caracterización biológica de los factores de transformación.

De acuerdo a lo mencionado en la introducción, los TGF- α y TGF- β difieren tanto en su estructura química como en sus propiedades biológicas y reconocen además sus propios receptores de membrana (239)

Por lo tanto, para clasificar a los TGFS debe determinarse i) su efecto sobre cultivos de células NRK-49F en monocapa ii) sus acciones sinérgicas o antagónicas sobre la estimulación de la síntesis de DNA inducida en estas células por otros GFs como insulina y EGF iii) la competencia por los receptores de EGF.

Se ensayaron en primer lugar las condiciones de máxima estimulación mitogénica de las células NRK-49F

A) Actividad mitogénica de EGF e insulina sobre células NRK-49F. Ensayos de incorporación de (^3H) timidina.

I) Efecto de distintas concentraciones de EGF e insuli

En la Fig.1 se observa el efecto de distintas concentraciones de EGF e insulina, ensayadas separadamente o en combinación, sobre la estimulación de la síntesis de DNA en células NRK-49F quiescentes. En las condiciones del ensayo, se observó que la insulina en concentraciones de 0.5 ug/ml, 1 ug/ml, y 5 ug/ml no es mitogénica, en cambio el EGF a partir de concentraciones de 4 ng/ml (0.60 nM) ejerce efecto estimulante alcanzándose el máximo de actividad con el agregado de 10 ng/ml (1.50 nM). La mayor estimulación de la síntesis de DNA se observa utilizando 5 ug/ml de insulina con 10 ng/ml de EGF. El suero fetal bovino al 10% presenta máximo efecto mitogénico.

II) Efecto de variaciones en las concentraciones celulares.

Se sembraron en medio Mc Coy's 5A con 10 % de SFB 200 ul de dos suspensiones celulares, una de 5×10^4 células/ml y otra de 10^5 células/ml durante 24 horas; luego, fueron arrestadas por 72 horas en medio con SFB al 0.5% al cabo de las cuales se agregaron las concentraciones de EGF y EGF+insulina que producen estimulación mitogénica. En la Fig 2 se observa que se obtiene una mayor incorporación de (3 H)timidina con la suspensión de 10^5 células/ml.

III) Efecto del tiempo de incubación de las células con (3 H)timidina.

Se sembraron en cada hoyo de una microplaca de cultivo 200 μ l de una suspensión de 10^5 células NRK-49F/ml (Fig 3) y de una suspensión de 5×10^4 células/ml (Fig 4). Se arrestó su crecimiento en medio con 0.5% de SFB, estimulándolas luego con los mitógenos EGF y EGF+insulina y agregando 1 μ Ci de (3 H)timidina durante 2, 16 y 24 horas. Los resultados obtenidos demuestran que para ambas concentraciones celulares la incorporación es muy baja a las 2 horas. Por el contrario hay una elevada incorporación con 16 y 24 horas. Al estimular a las células con las concentraciones de EGF e insulina de máxima actividad mitogénica y con SFB al 10% se observa un pequeño aumento de la incorporación con 24 horas de incubación respecto de 16 horas, sin embargo con las otras concentraciones de los mitógenos la incorporación es semejante para 16 y 24 horas.

IV) Efecto de la modificación del tiempo de arresto de las células en medio con SFB al 0.5%.

En otras experiencias se modificó el tiempo de arresto en Mc Coy's 5a con 0.5% de SFB de las suspensiones de 10^5 células/ml (Fig 5) y 5×10^4 células/ml (Fig 6). Para ambas concentraciones celulares se observó que con 48 horas de arresto la incorporación de (3 H)timidina de los controles era muy elevada, siendo en la suspensión de 5×10^4 células/ml igual a la obtenida con EGF 0.90 nM.

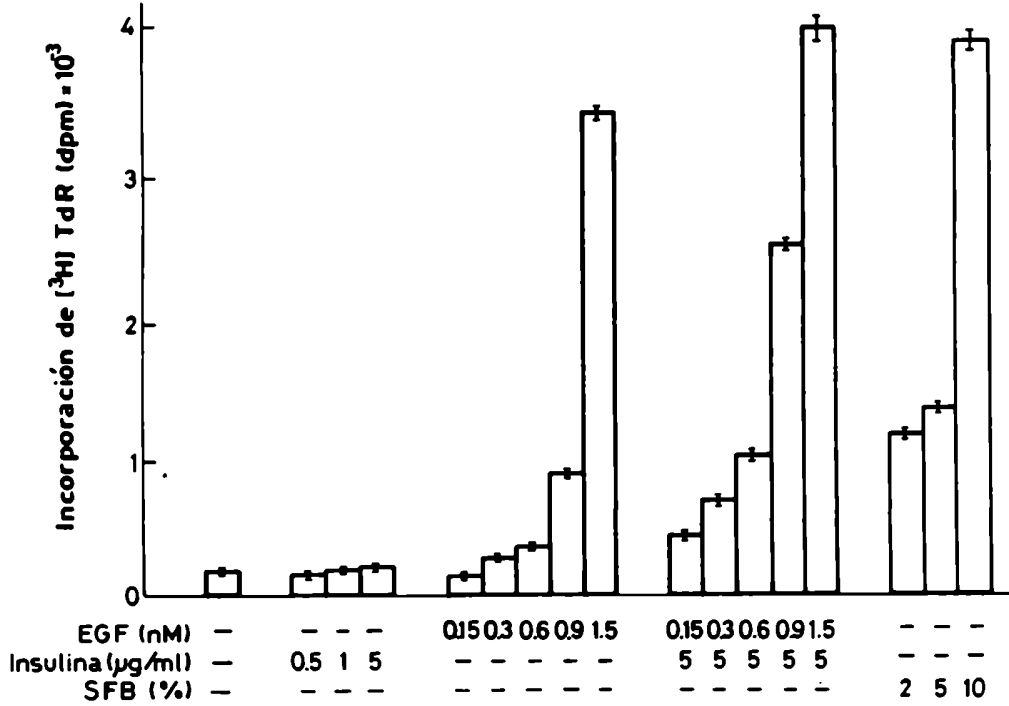
V) Efecto de la modificación del tiempo de incubación de las células con los mitógenos.

En la Fig 7 se muestran los resultados obtenidos sembrando 200 μ l de una suspensión de 10^6 células NRK-49F/ml, arrestándolas durante 72 horas e incubando durante 24 y 48 horas con EGF y EGF+insulina. La (3 H)timidina se agregó durante las 16 o 24 horas finales del cultivo. Para todas las concentraciones de los mitógenos, se observa que cuando las células se exponen a 1 μ Ci de (3 H)timidina durante 16 horas, la incorporación es mayor en la incubación de 24 horas con los mitógenos. Por el contrario, incubando las células los mismos tiempos con los mitógenos pero agregando (3 H)timidina durante las últimas 24 horas del cultivo, la incorporación es mayor con 48 horas de incubación.

En la Fig 8 se muestra que trabajando en las mismas condiciones con una suspensión de 5×10^4 células/ml se obtuvieron resultados semejantes.

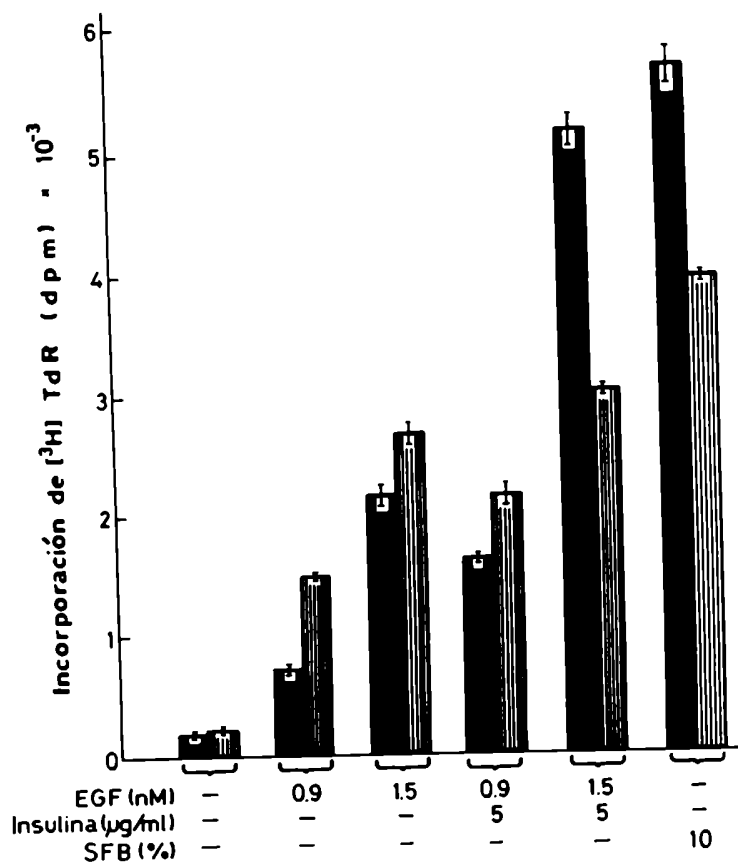
De acuerdo a estos resultados se estableció que las condiciones óptimas del ensayo se encontraban i) trabajando con una suspensión de 10^6 células/ml, ii) incubando durante 24 horas con SFB al 10%, iii) arrestando el crecimiento celular por 72 horas en medio con SFB al 0.5%, iv) realizando luego el agregado de los factores a estudiar y 8 horas más tarde la (3 H)timidina durante 16 horas.

FIGURA 1



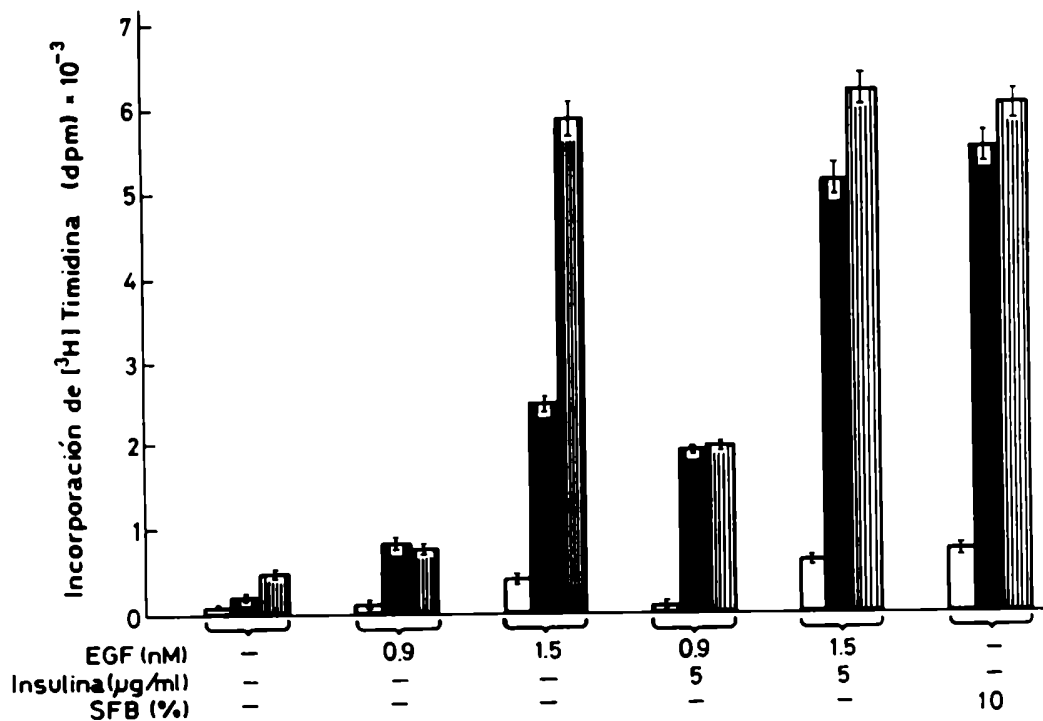
Estimulación de la síntesis de DNA en células NRK-49F. Se sembraron 2×10^4 células NRK-49F en cada hoyo de una microplaca de 1.6 mm de diámetro/hoyo y se incubaron durante 24 horas en Mc Coy's 5A con 10% de SFB. Luego se arresto el crecimiento durante 72 horas en este medio con 0.5% de SFB, al cabo de las cuales se agregaron los mitógenos. A las 16 horas se agregó 1 uCi de (³H) timidina y se continuó la incubación por 8 horas. Las células se cosecharon de acuerdo a lo descrito en "Materiales y Métodos".

FIGURA 2



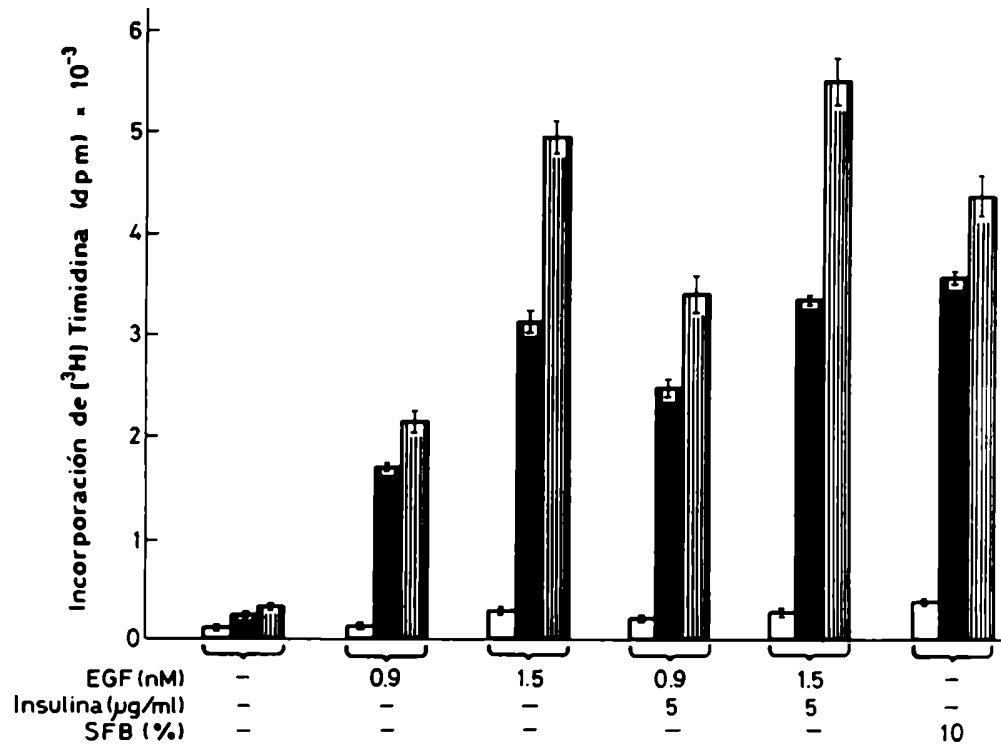
Las condiciones de cultivo fueron las mismas que las descritas en la Figura 1 y se estudió el efecto de trabajar con distintas concentraciones celulares. En cada hoyo de la placa de cultivo se sembraron 200 µl de una suspensión de 10^5 células/ml (barras negras) o de 5×10^4 células/ml (barras rayadas).

FIGURA 3



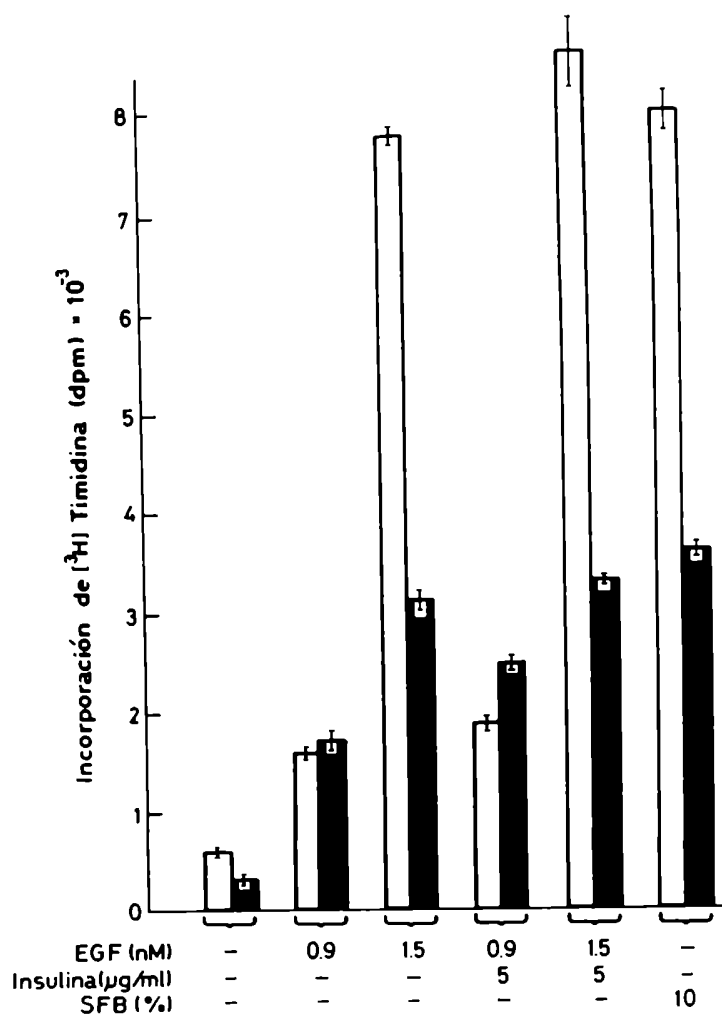
Estimulación mitogénica de las células NRK-49F variando el tiempo de incubación con (³H)timidina. En cada hoyo de la microplaca de cultivo se sembraron 200 µl de una suspensión de 10⁵ células NRK-49F/ ml, se arretaron durante 72 horas y luego se agregaron los mitógenos. El tiempo de incubación con (³H)timidina fue de 2 horas (barras blancas), 16 horas (barras negras) y 24 horas (barras rayadas).

FIGURA 4



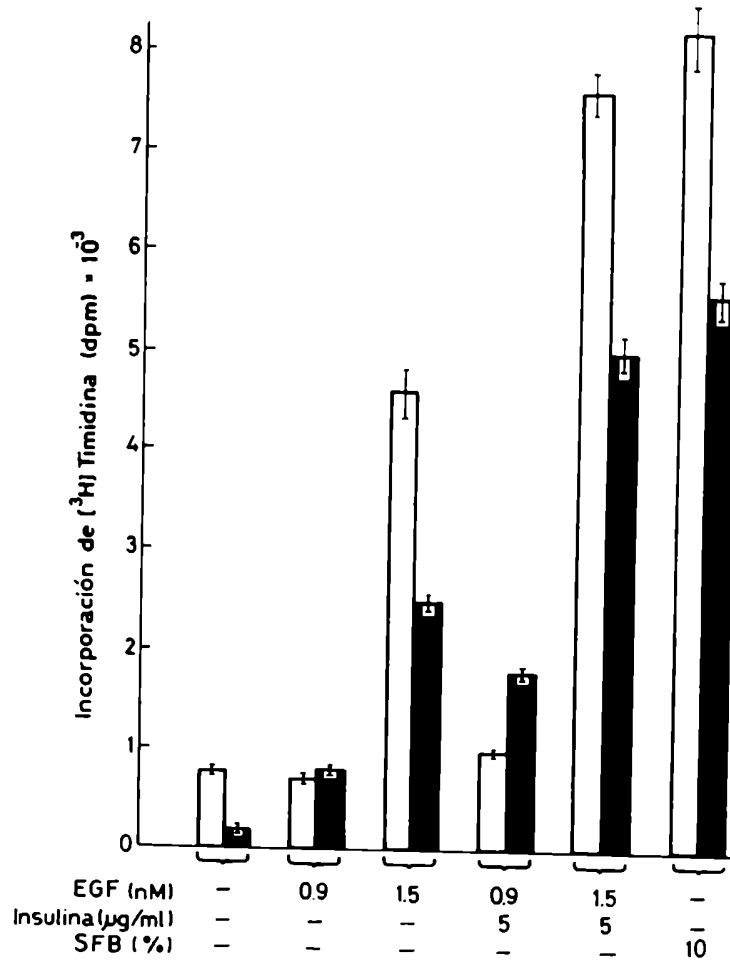
Las condiciones experimentales fueron las descritas en Fig 3, sembrándose 200 μl de una suspensión de 5×10^4 células NRK-49F en cada hoyo de la microplaca de cultivo e incubando con ^3H timidina 2 horas (barras blancas), 16 horas (barras negras) y 24 horas (barras rayadas).

FIGURA 5



Se sembraron 200 µl de una suspensión de 10⁶ células NRK-49F en cada hoyo de una microplaca de cultivo y se incubaron durante 24 horas en medio Mc Coy's 5A con 10% de SFB. Luego se arrestó el crecimiento durante 48 horas (barras blancas) o 72 horas (barras negras) en Mc Coy's 5A con 0.5% de SFB. Los mitógenos se agregaron 24 horas y la timidina 16.

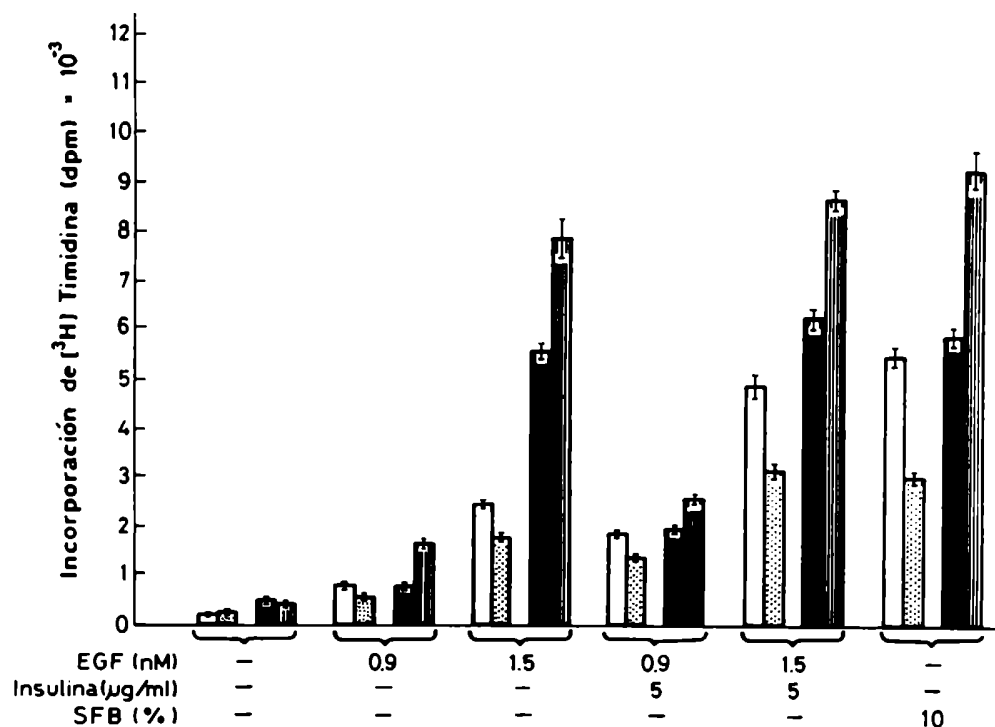
FIGURA 6



Las condiciones de trabajo fueron las mismas que las descritas en Fig 5, sembrándose 200 µl de una suspensión de 5X10⁴ células NRK-49F en cada hoyo de la microplaca.

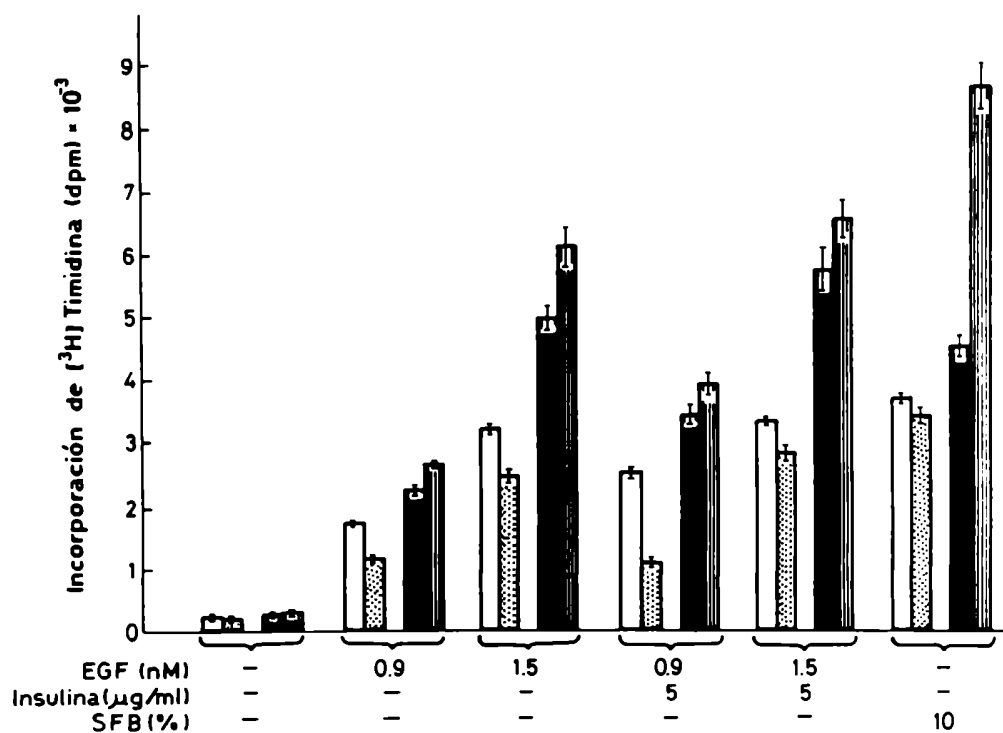
Barras blancas 48 horas; barras negras 72 horas.

FIGURA 7



Se sembraron 200 ul de una suspensión de 10⁵ células NRK-49F/ml en cada hoyo de la microplaca de cultivo y los mitógenos y la timidina se agregaron de la siguiente forma: 24 horas los mitógenos y 16 la timidina (barras blancas), 48 horas los mitógenos y 16 la timidina (barras punteadas), 24 horas los mitógenos y 24 la timidina (barras negras), 48 horas los mitógenos y 24 la timidina (barras rayadas).

FIGURA 8



Las condiciones de trabajo fueron las mismas que en la Fig 7 utilizándose una suspensión de 5×10^4 células/ml.

Barras blancas: 24 horas los mitógenos y 16 la timidina; barras punteadas: 48 horas los mitógenos y 16 la timidina; barras negras 24 horas los mitógenos y 24 la timidina; barras rayadas 48 horas los mitógenos y 24 la timidina.

B) Ensayo de radioligando-receptor para EGF

Fue necesario desarrollar este método experimental para completar la caracterización biológica de los TGFs.

I) Marcación y purificación del EGF.

Los resultados de la marcación y purificación del EGF se muestran en la Fig 9. En las condiciones de trabajo el 94.5% del ^{125}I fue incorporado al EGF. Utilizando receptores extraídos de membranas de placentas humanas la Máxima Capacidad de Unión del ^{125}I -EGF fue de 70% (320).

II) Caracterización de receptores para EGF de membrana plasmáticas de placentas humanas a término.

Las características del receptor para EGF extraídos de placentas humanas se observan en las Figs 10 y 11. La unión del EGF a este receptor es saturable, presenta alta afinidad ($K_a=0.8 \times 10^{-9} \text{ M}^{-1}$), siendo $Q=17522 \text{ fmoles/mg}$.

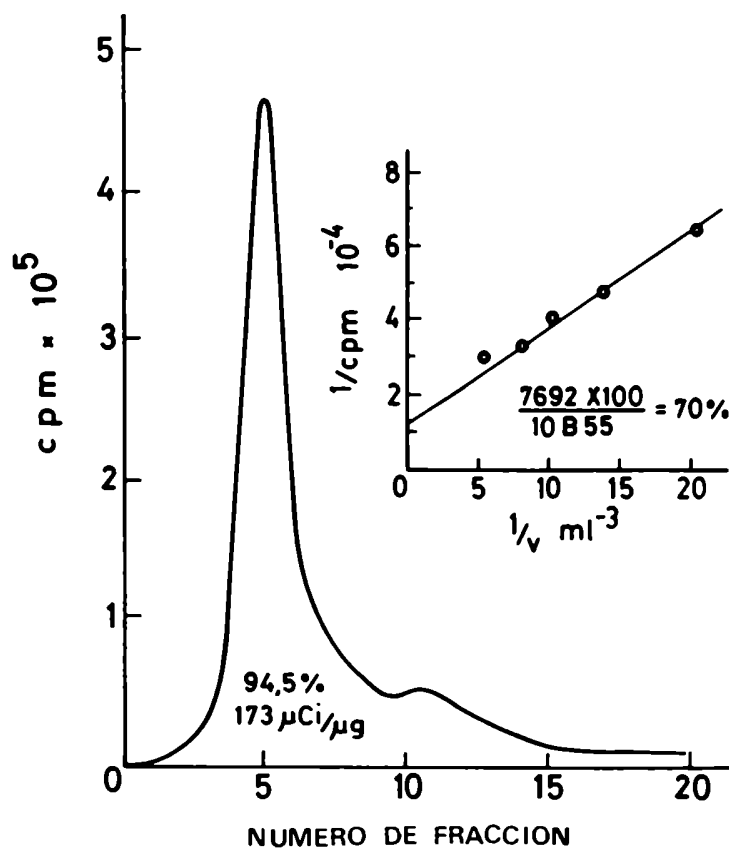
III) Ensayo radioligando-receptor para EGF.

En la Fig 12 se muestran los resultados del ensayo de radiodesplazamiento de ^{125}I -EGF utilizando membranas de placenta. La unión inespecífica determinada en presencia de 0.3 uM EGF fue inferior al 1%.

EGF y TGF- α muestran similares potencias de desplazamiento con 50% de unión en una concentración de 3.88 nM. Insulina, TGF- β , hCG y prolactina no compiten por la unión al receptor.

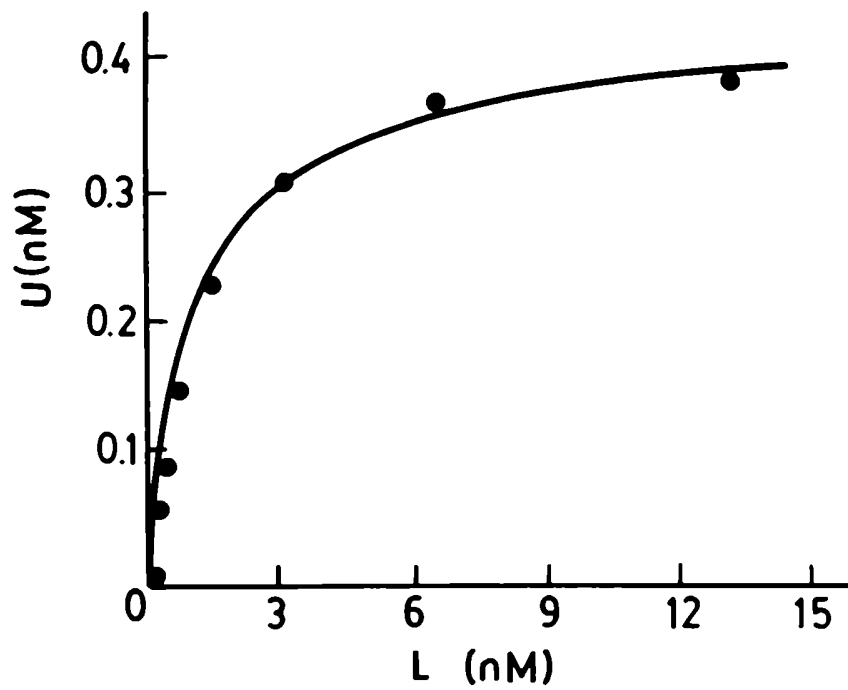
Los coeficientes de variación intra e interensayos fueron del 9% y 13%. La sensibilidad fue de 0.3 ± 0.06 nM (n=10) y la pendiente de B/B_0 vs log (EGF) fue igual a -2.21 con $r^2=0.996$ (Fig 13).

FIGURA 9



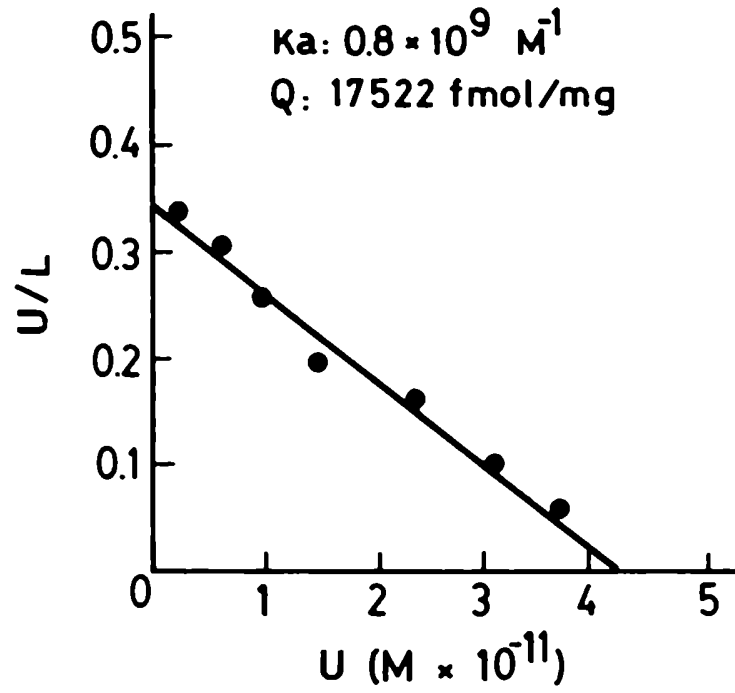
EGF altamente purificado fue marcado y purificado según lo descrito en "Materiales y Métodos". La actividad específica final fue determinada por el ensayo de autodesplazamiento (320) y la máxima capacidad de unión utilizando membranas de placentas humanas.

FIGURA 10



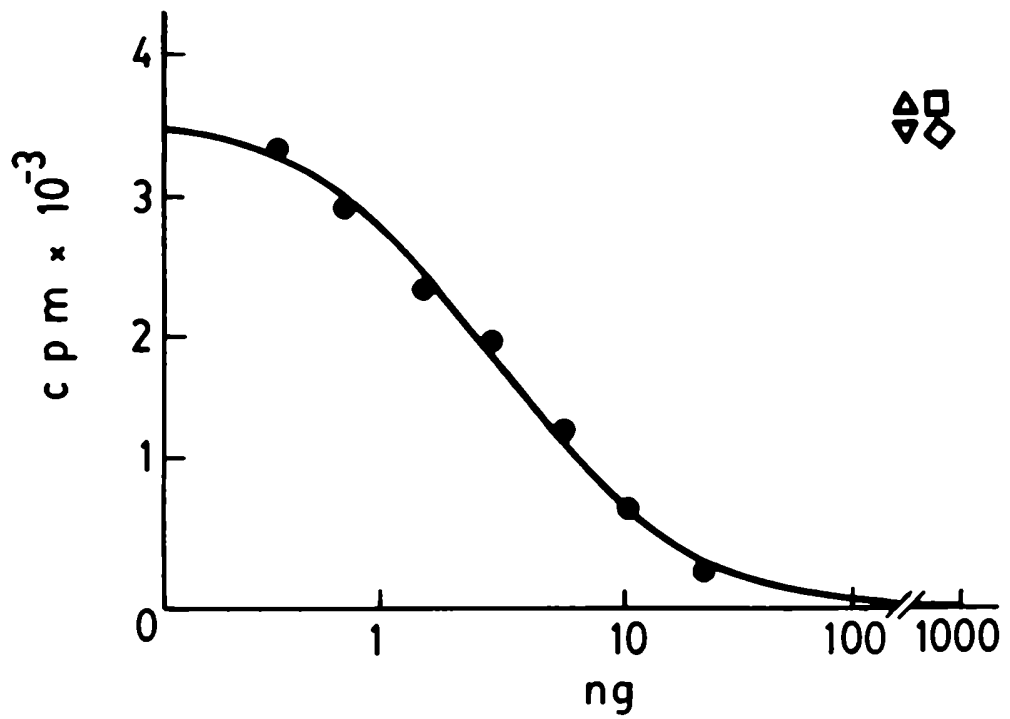
Unión del EGF a membranas de placentas humanas. Las condiciones de trabajo fueron las descritas en "Materiales y Métodos". La unión inespecífica determinada en presencia de 0.3 μ M EGF fue inferior al 1%.

FIGURA 11



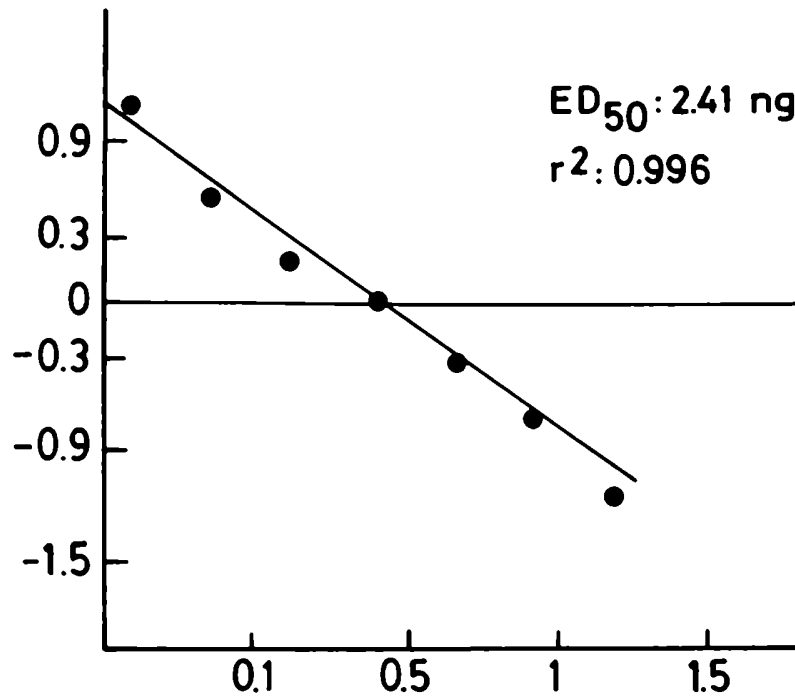
Análisis de Scatchard (323) de la unión del EGF a membranas de placentas humanas.

FIGURA 12



Radiodesplazamiento del ^{125}I -EGF utilizando receptores de membranas de placentas humanas. EGF (●); Insulina (Δ); Prolactina (▽); hCG (□); $\text{TGF-}\beta$ (◇).

FIGURA 13



Representación "logit" del ensayo radioligando-receptor para EGF en membranas de placenta presentado en la Fig 12.

$$y = \frac{a-d}{1 + (X/c)^b} + d \quad \text{en función del log de X}$$

a= respuesta para dosis 0; b= pendiente; d= respuesta a dosis infinita (asíntota a las absisas); c= ED₅₀: dosis efectiva para la respuesta 50%.

C) Aislamiento y purificación de TGF- β de plaquetas humanas.

De acuerdo con lo expuesto en la Introducción, para inducir transformación fenotípica en las células NRK-49F es necesaria la presencia, en el ensayo en medio con 10% de suero, de TGF- α y TGF- β . Por esto, se desarrolló un método de extracción y purificación de TGF- β , con el fin de i) contar con las cantidades necesarias del factor para los ensayos de identificación de TGF- α en medio semisólido y ii) disponer de TGF- β puro que permitiese comparar el comportamiento biológico e inmunológico de los factores aislados de las distintas neoplasias con el del TGF- β .

En este trabajo se describe un método de purificación original, utilizando cromatografía líquida de alta presión en columna de interacción hidrofóbica TSK Phenyl 5PW.

Se realizó la extracción ácido-alcohólica de 100 g de plaquetas lavadas. El rendimiento de la misma fue de 140 mg de proteína/100 g de plaquetas. En este extracto crudo se determinó la presencia de actividades transformantes de las células NRK-49F.

En la fig 14 se muestran las colonias desarrolladas por estas células al estimularlas con cantidades crecientes de proteínas del extracto, en presencia (2 ng/ml) y ausencia de EGF.

De acuerdo a los resultados, la actividad transformante presente en las plaquetas es de tipo β , dado que no se observa estimulación en ausencia de EGF. Tampoco se detectó competencia

por los receptores del EGF de membranas de placenta humana, utilizando cantidades de proteína del extracto de hasta 1000 ug.

El extracto crudo fue purificado por cromatografía de exclusión molecular sembrándose 140 mg de proteína en una columna de Bio-Gel P-60 equilibrada y eluida con ácido acético 1 M. La absorbancia a 280 nm de las fracciones se muestra en la Fig 15. Se tomaron alícuotas de 1/6 de cada fracción y se determinó la presencia de actividad transformante mediante el ensayo de formación de colonias de las células NRK-49F en presencia de 2 ng/ml de EGF.

En la Fig 15 se observa que el TGF- β eluye en las fracciones 66-76, con un peso molecular aparente de 13.5 KDa. Dado que el PM descrito para el TGF- β es de 25 KDa, estos resultados confirman una elución aberrante del factor, debida probablemente a interacciones con el Bio-Gel.

Las fracciones 66-76 fueron unidas y liofilizadas. Se purificó 1/4 parte de este "pool" de proteínas (2 mg) por cromatografía líquida de alta presión en columna de interacción hidrofóbica TSK Phenyl 5PW, eluyéndose con un gradiente lineal de acetato de amonio. En la Fig 16 se muestra la absorbancia a 280 nm de las fracciones y el perfil de elución del TGF- β . Un solo pico de TGF- β eluye a aproximadamente a una concentración de acetato de amonio 0.138 M.

En la Tabla 1 se muestra la purificación del TGF- β por los distintos procedimientos utilizados. Se definió una unidad de actividad como el número de colonias de células NRK-49F/ug de

proteína en presencia de 2 ng/ml de EGF.

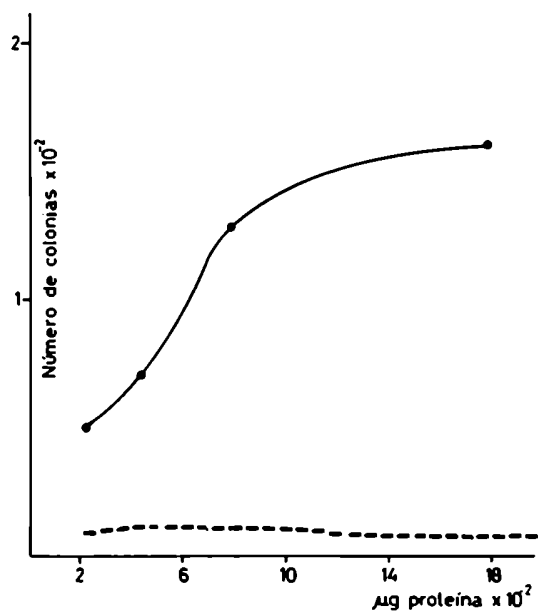
TABLA 1

Purificación de TGF- β de plaquetas humanas

	Actividad (Unidades)	Purificación (Nº de veces)	Recuperación (%)
Extracto ácido- alcohólico	0.094		100
Cromatografía en Bio-Gel P-60	9.82	100	73 (100) ^a
HPLC en columna TSK phenyl 5PW	560,000	57,000	22 (30) ^a

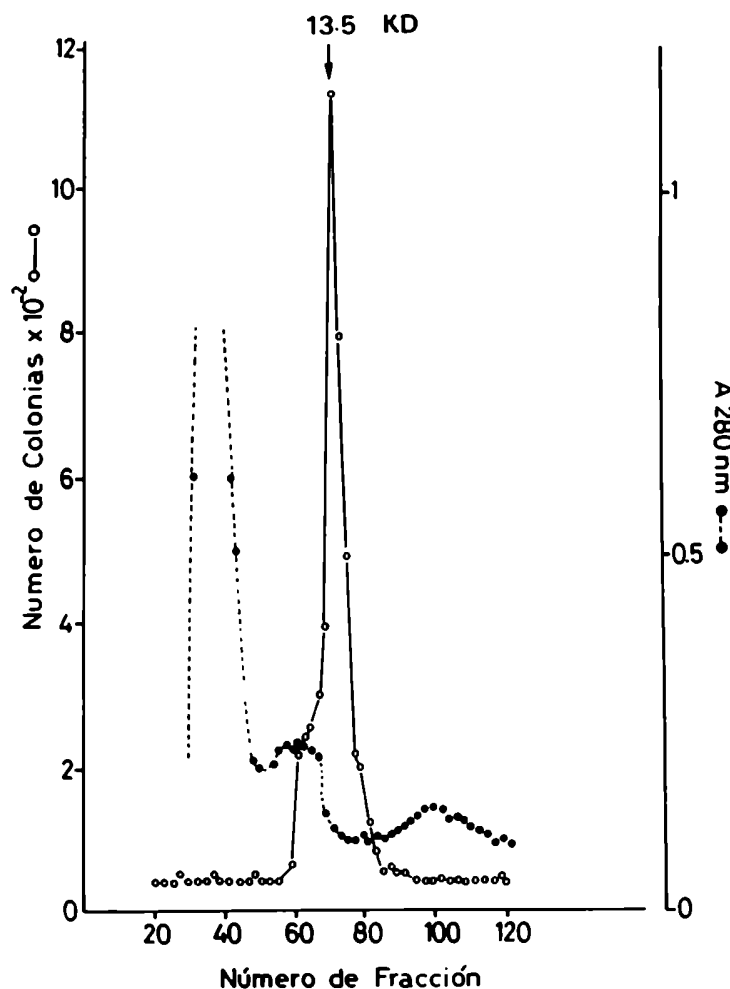
a: recuperación respecto de la purificación en columna de Bio-Gel P-60.

FIGURA 14



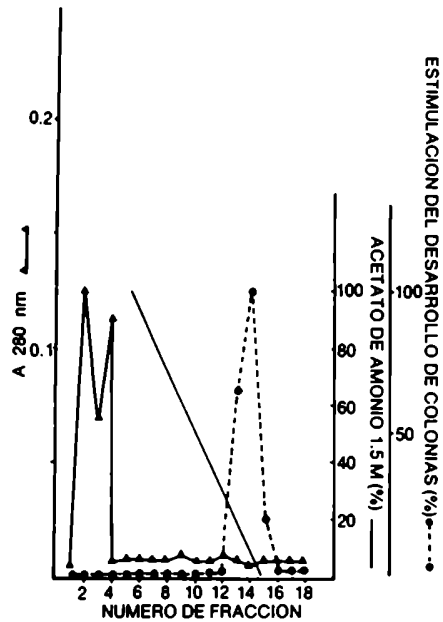
Colonias de células NRK-49F al estimularlas con cantidades crecientes de proteína del extracto ácido alcohólico.
—+EGF (2 ng/ml);--EGF.

FIGURA 15



Purificación del extracto ácido-alcohólico por cromatografía de exclusión molecular en columna de Bio-Gel P-60 equilibrada y eluida con ácido acético 1 M. Se sembraron 140 mg de proteína, la velocidad de elución fue de 17 ml/hora y se colectaron fracciones de 3ml. Se tomaron alícuotas de 1/6 de cada fracción y se determinó la presencia de actividad transformante mediante el ensayo de formación de colonias de las células NRK-49F en presencia de ng/ml de EGF.

FIGURA 16



Purificación del TGF- β por cromatografía líquida de alta presión en columna de interacción hidrofóbica TSK phenyl 5PW. Se sembró 1/4 parte del "pool" de proteínas de las fracciones 66-76. La muestra se disolvió en 1 ml de buffer acetato de amonio 1.5 M, pH 5.3 y se eluyó utilizando un gradiente lineal de entre 1.5 M y 0.02 M de acetato de amonio a una velocidad de 1.5 ml/min durante 30 min. Se colectaron fracciones de 3 ml y 1/10 parte de cada una se liofilizó para determinar actividad transformante.

RESULTADOS

I- AISLAMIENTO, PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE FACTORES DE TRANSFORMACION EN NEOPLASIAS MALIGNAS HUMANAS

1) AISLAMIENTO DE FACTORES DE TRANSFORMACION DE NEOPLASIAS MALIGNAS HUMANAS.

A) Determinación de actividad transformante de los extractos ácido-alcohólicos de las neoplasias.

El primer propósito de este trabajo fue el estudio de tumores sólidos malignos humanos de distinto tipo histológico y origen embrionario, para determinar la presencia de factores de transformación. El ojetivo fue establecer si las diferencias en el tipo tumoral (histología y origen embrionario de la estirpe celular maligna) implicaban variaciones en la presencia de TGFs intracelulares.

Para esto, se realizó la extracción ácido-alcohólica en 7 tumores malignos humanos. El peso de cada muestra y el rendimiento en proteínas de la extracción figuran en la Tabla 2.

Se probó la capacidad de los extractos crudos de promover crecimiento, en medio semisólido de agar, de las células normales de riñon de rata NRK-49F. Utilizando en los ensayos concentraciones de proteína de 100 a 1000 ug/ml, 6 de los tumores estudiados mostraron presencia de TGFs . En la Tabla 3 se muestra el número de colonias desarrolladas al incubar las células NRK-49F con aproximadamente 1000 ug de proteína de los extractos

crudos. En la Figura 17 A y B se observa que la respuesta de las células depende de la concentración de proteína, siendo máxima cuando se utilizan 1000 ug/ml. También se produce un aumento del tamaño de las colonias con mayores concentraciones de proteína. En la Figura 18 A, B, se observan las colonias de las células NRK-49F después de 7 días de incubación con 1000ug/ml de proteína de los extractos de los tumores 4 (carcinoma epidermoide de pulmón) y 6 (rabdomiosarcoma de pectoral). Los ensayos fueron realizados por duplicado, encontrándose DS dentro del 15% en todas las experiencias. No se observó el desarrollo de colonias en los controles. La baja actividad transformante mostrada por el espécimen 5 (liposarcoma) se repitió en dos experiencias separadas.

TABLA 2

Rendimiento de la extracción ácido-alcohólica

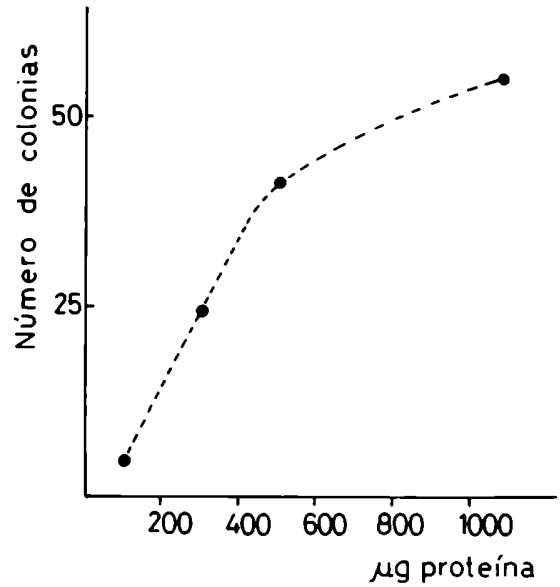
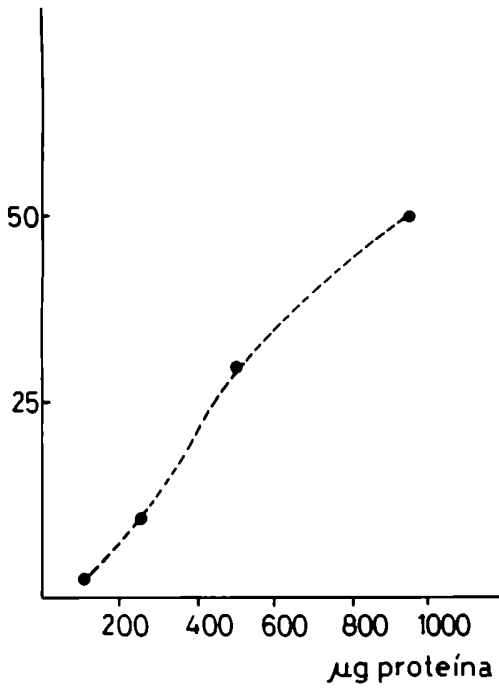
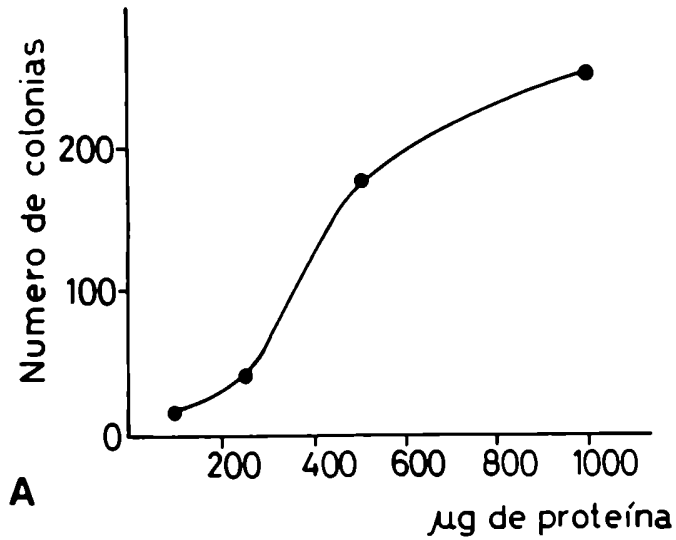
Espécimen	Tumor	Peso(g)	Rendimiento en proteínas (mg/g de tejido)
1	Adenocarcinoma, mama	5	2.1
2	Adenocarcinoma, mama	4.5	0.48
3	Adenocarcinoma, mama	3	1.94
4	Carcinoma epidermoide de pulmón	32	9.99
5	Liposarcoma, axila	38	8.42
6	Rabdomiosarcoma, pectoral	10	3.85
7	Carcinoma, colon	2.5	5.69

TABLA 3

Estimulación de la formación de colonias de las células NRK-49F

Espécimen	Tumor	Concentración de proteína (ug/ml)	Nº de colonias
1	Adenocarcinoma, mama	1000	256
2	Adenocarcinoma, mama	1091	54
3	Adenocarcinoma, mama	968	50
4	Carcinoma epidermoide de pulmon	1020	201
5	Liposarcoma, axila	1000	0
6	Rabdomiosarcoma, pectoral	1000	128
7	Carcinoma, colon	1000	137

FIGURA 17 A

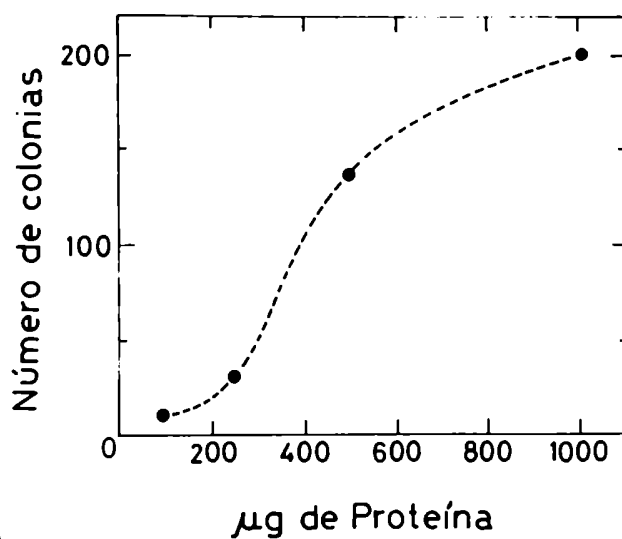


B

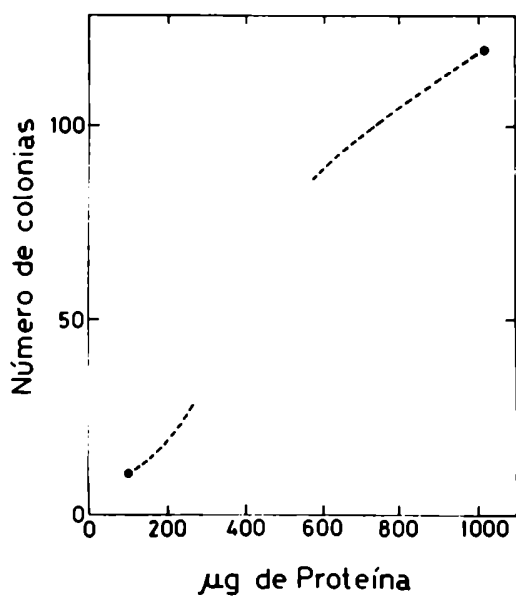
C

Curva de dilucion de la estimulación del desarrollo de colonias de las células NRK-49F por los extractos ácido-alcohólicos de los especímenes 1 (A), 2 (B) y 3 (C). Se consideraron positivas las colonias formadas por mas de 10 células después de 7 días de incubación.

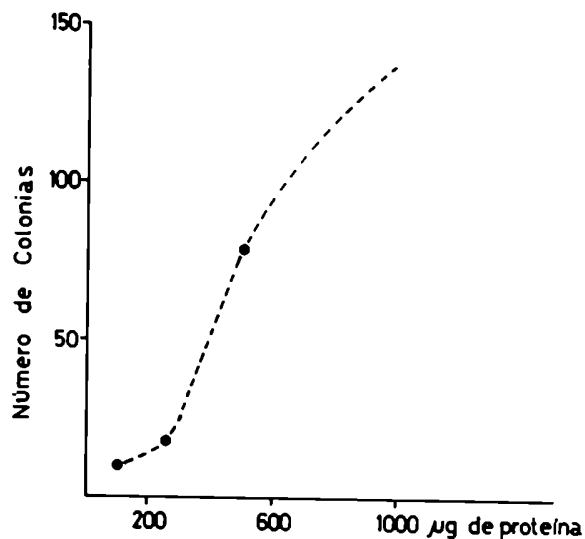
FIGURA 17 B



A



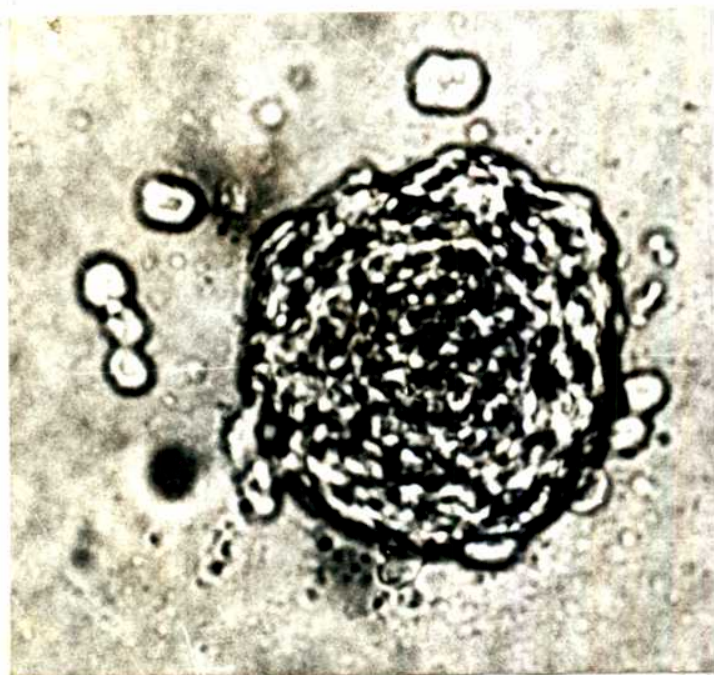
B



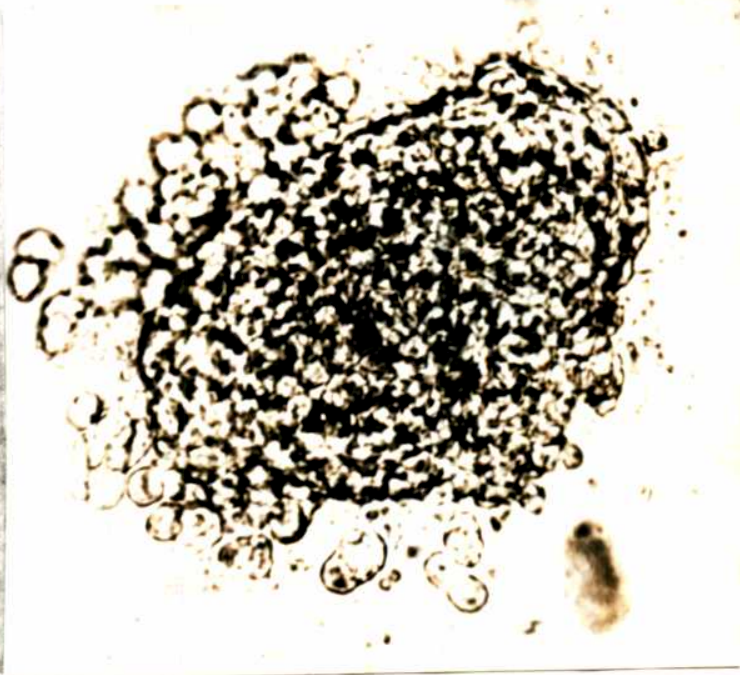
C

Curva de dilución de la estimulación del desarrollo de colonias de los extractos de los especímenes 4 (A), 6 (B) y 7 (C).

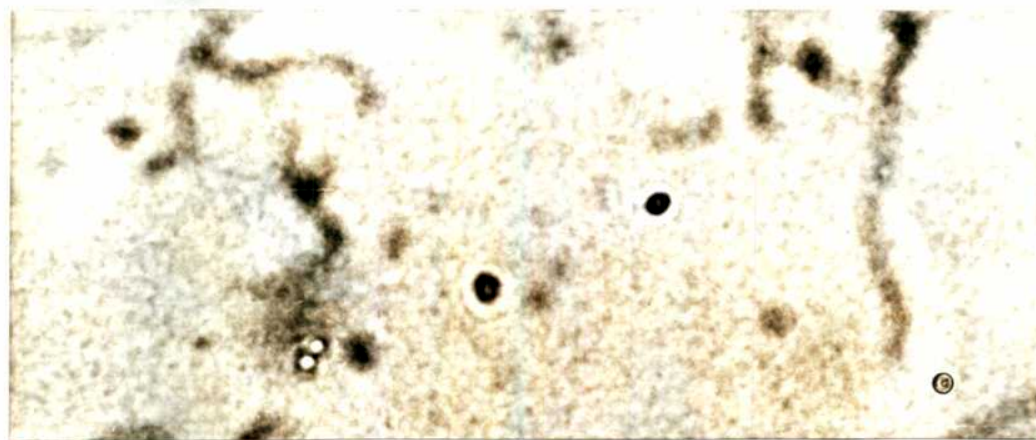
FIGURA 18



A



B



C

Colonias de células NRK-49F estimuladas con 1000 ug de proteína de los extractos ácido-alcohólicos de los tumores 4 (carcinoma epidermoide de pulmón) (A) y 6 (rabdomyosarcoma de pectoral) (B). En C se muestran los controles de células NRK-49F.

B) Tratamientos físico-químicos de los extractos crudos

Con el objeto de estudiar la naturaleza de las actividades transformantes presentes en los extractos se realizaron los tratamientos descritos en la Tabla 4. Los TGFs aislados fueron estables frente al calor y en medio ácido, pero resultaron inactivados por la tripsina. Esta inactivación se evita en parte cuando la tripsina se preincuba con el inhibidor de tripsina de soja. Los TGFs también fueron inactivados por el ditiotreitol. De acuerdo a los resultados obtenidos se evidencia que las actividades transformantes son polipeptidos estables frente al calor que presentan puentes disulfuro cuya integridad es necesaria para el mantenimiento de la actividad biológica.

TABLA 4

Características de los TGFs presentes en los extractos crudos

Tratamiento	Número de colonias					
	Especimen					
	1	2	3	4	6	7
Control	250	54	50	201	118	137
Tripsina (50 ug/ml 2h a 37 °C)	4	0	0	3	0	2
Tripsina (50 ug/ml) + Inhibidor de Tripsina de soja (100 ug/ml) 2h a 37°C	123	27	32	83	56	98
Ditiotreitol (0.065 M en NH ₄ HCO ₃ 0.1 M 1h a 22 °C)	3	0	0	7	0	0
Calor (56 °C 30 min)	200	48	36	180	79	109

Se trataron alícuotas conteniendo 1 mg de proteína de los extractos crudos como se describe en Materiales y Métodos y luego se probó su capacidad transformante sobre células NRK-49F.

2) PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE TGFs DE NEOPLASIAS MALIGNAS HUMANAS.

A) Purificación de los extractos ácido-alcohólicos de las neoplasias malignas por Cromatografía de Exclusión Molecular.

Los extractos crudos de los tumores malignos estudiados en los cuales se contó con suficiente material, fueron purificados a fin de realizar luego la caracterización biológica de las actividades transformantes presentes en ellos. De esta forma, se completo el estudio de TGFs en neoplasias malignas humanas, dado que los resultados obtenidos en esta parte del trabajo permitieron comparar los TGFs presentes en tumores de distinto tipo histológico y origen embrionario.

Así, los extractos de los especímenes 4 (carcinoma epidermoide de pulmón) y 6 (rabdomyosarcoma de pectoral) fueron purificados por cromatografía de exclusión molecular en una columna de Bio-Gel P-60 de 2.6X60 cm, equilibrada y eluida con ácido acético 1M. La velocidad de elución fué de 20 ml/hora y se colectaron fracciones de 4.3 ml. Se determinó la absorbancia a 280 nm y la concentración de proteínas de cada fracción. Se liofilizaron alícuotas de 1/8 de fracción para estudiar actividad transformante de las células NRK-49F y competencia por los receptores de EGF de placentas humanas y de 1/40 de fracción para determinar actividad mitogénica sobre NRK-49F.

En la Fig 19 se observa que al purificar 50 mg de proteína del extracto ácido-alcohólico del carcinoma de pulmón, se detectaron cinco picos de actividad transformante. Todos ellos eluyeron después del pico de proteína. La actividad transformante de mayor potencia presentó un peso molecular aparente de aproximadamente 48,000 Da (Pico I), y los otros TGFs tuvieron pesos moleculares de 36,000 Da (Pico II), 9,000 Da (Pico III), 6,000 Da (Pico IV) y 4,000 Da (Pico V) (Fig 20).

Cuando se purificaron 19 mg de proteína del extracto del rhabdomiosarcoma de pectoral se obtuvieron cuatro picos de actividad transformante (Fig 21). Los pesos moleculares fueron de 31,000 Da (Pico I), 20,000 Da (Pico II), 6,000 Da (Pico III) y 4000 Da (Pico IV) (Fig 22).

El agregado de EGF (2 ng/ml) en el ensayo en medio semi-sólido de agar no potenció la actividad transformante de ninguno de los TGFs aislados de estas neoplasias malignas.

B) Caracterización de los TGFs purificados

I) Ensayos de union al receptor del EGF

Las alícuotas descritas, de las fracciones obtenidas de la columna de Bio-Gel P-60, fueron ensayadas para determinar si presentaban competencia con ^{125}I -EGF para unirse a los receptores de membrana aislados de placentas humanas. Los Picos I, II y III del carcinoma de pulmón no mostraron competencia por el

receptor del EGF, mientras que los Picos IV y V mostraron respectivamente 46% y 61% de inhibición de la unión del ^{125}I -EGF a su receptor (Fig 19).

Se obtuvieron resultados semejantes con el rhabdomiosarcoma. Los Picos I y II no exhibieron competencia por el receptor del EGF, el Pico III mostró un 25% de inhibición de la unión del EGF y el Pico IV mostró un 24% de inhibición (Fig 21).

En ninguna de las fracciones obtenidas de la purificación de estos tumores se detectó presencia de EGF utilizándose para ello el radioinmunoensayo específico.

II) Ensayos de actividad mitogénica y efectos en la síntesis de DNA inducida por EGF e insulina en cultivos en monocapa de las células NRK-49F.

Se ensayó la actividad mitogénica de los TGFs purificados del carcinoma de pulmón y del rhabdomiosarcoma en cultivos subconfluentes de células NRK-49F arrestadas por 72 horas en medio con 0.5% de SFB. Se utilizaron las alícuotas mencionadas anteriormente de los picos de la cromatografía en Bio-Gel P-60. En la Fig 23 se muestra que los Picos I, II, III del carcinoma de pulmón no tuvieron actividad mitogénica sobre los fibroblastos NRK durante las 24 horas siguientes a la estimulación. El Pico IV fue un potente estimulante de la síntesis de DNA y el Pico V también exhibió actividad mitogénica, aunque en menor grado. En el caso del rhabdomiosarcoma los Picos I y II no

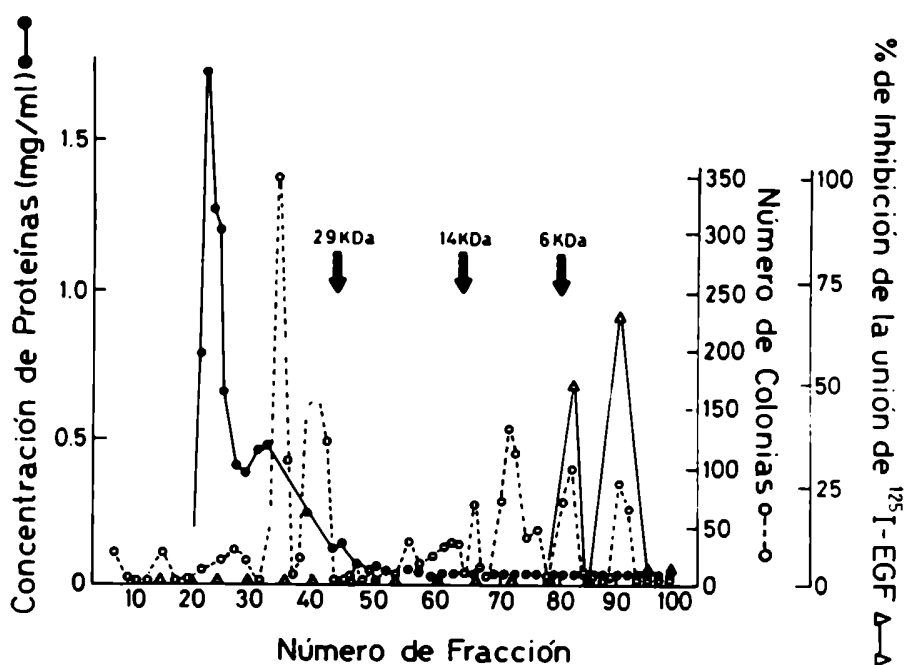
estimularon la síntesis de DNA en células NRK mientras que los Picos III y IV se mostraron como potentes mitógenos para estas células (Fig 24).

De acuerdo a lo descrito en los métodos experimentales desarrollados (Sec 2.A I) el EGF en concentración de 10 ng/ml (1.5 nM) y la insulina en una concentración de 5 ug/ml inducen una máxima estimulación mitogénica de las células NRK-49F. En este estudio se agregaron junto con las concentraciones referidas de EGF e insulina alícuotas de los picos de actividad transformante.

Los Picos I, II, y III del carcinoma de pulmón inhibieron la síntesis de DNA inducida por EGF e insulina, disminuyendo esta inhibición a medida que aumenta la dilución de la fracción. Los Picos IV y V no mostraron inhibición de la síntesis de DNA inducida por EGF e insulina, ni potenciaron la actividad mitogénica de estos dos GFs (Fig 23).

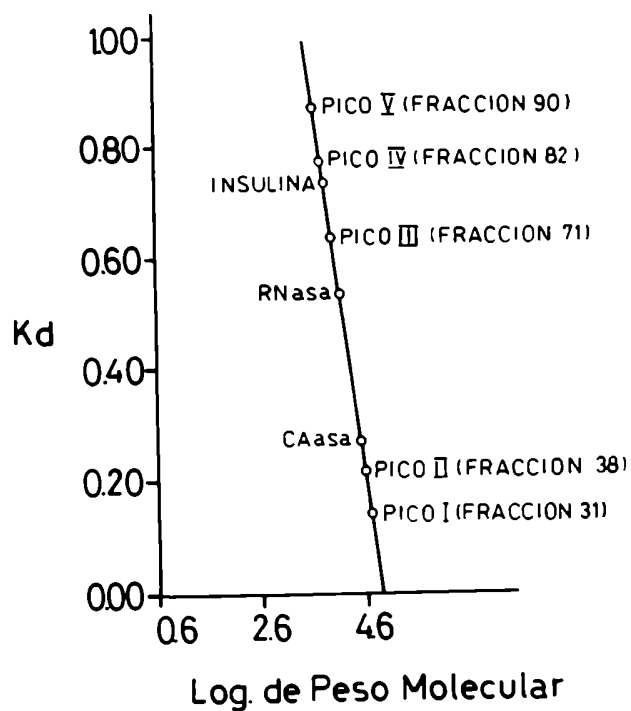
Los resultados obtenidos con los TGFs del rhabdomyosarcoma se muestran en la Fig 24. Los Picos I y II inhibieron la síntesis de DNA inducida por EGF e insulina, mientras que los Picos III y IV no mostraron efectos inhibitorios ni actuaron en forma sinérgica para la inducción de la síntesis de DNA por EGF e insulina.

FIGURA 19



Cromatografía en columna de Bio-Gel P-60 de 50 mg de proteína del extracto ácido-alcohólico del carcinoma epidermoide de pulmón. Se colectaron fracciones de 4 ml y se determinó la concentración de proteína utilizando el método de Bradford (318). Se utilizaron alícuotas de 1/8 de las fracciones para determinar presencia de TGFs y competencia por los receptores del EGF de membranas de placentas. Los marcadores de peso molecular fueron anhidrasa carbónica (29 KDa), RNasa (14 KDa) e insulina (6 KDa).

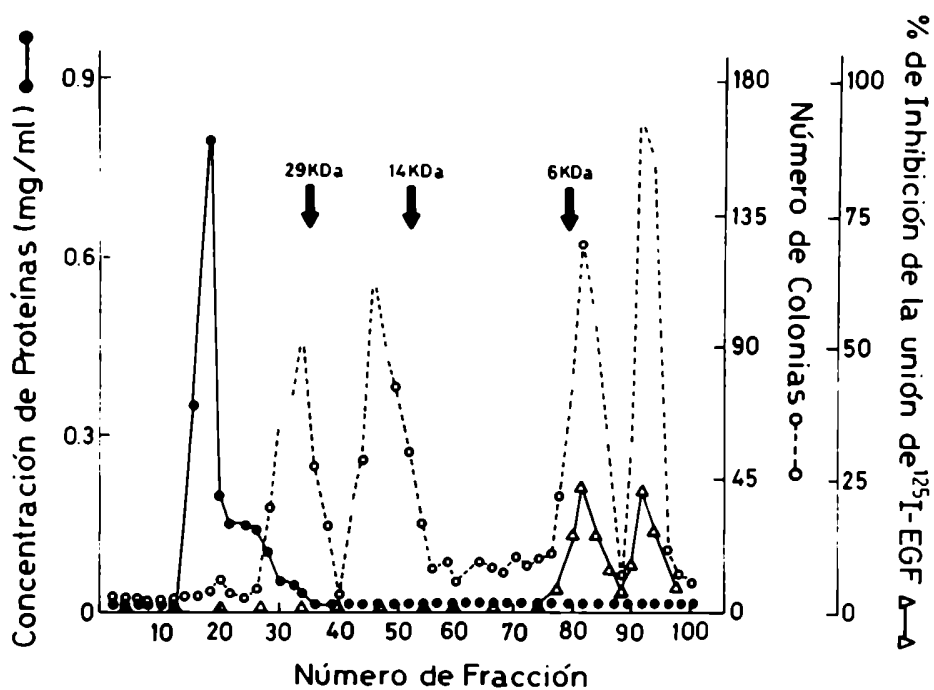
FIGURA 20



Insulina	PM 6KDa
RNasa	PM 14KDa
CAasa	PM 29KDa
Pico I	PM 48KDa
PicoII	PM 36KDa
PicoIII	PM 9 KDa
Pico IV	PM 6 KDa
Pico V	PM 4 KDa

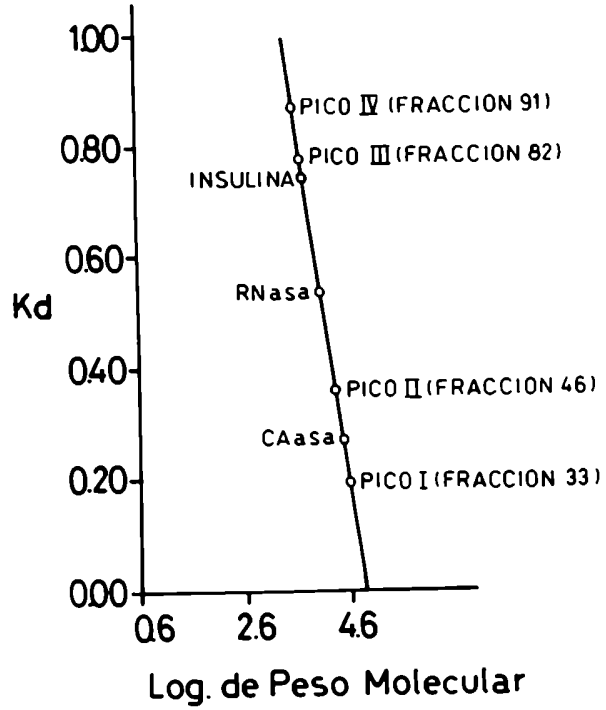
Determinación de los PM de los TGFs purificados del carcinoma epidermoide de pulmón. Los marcadores fueron anhidrasa carbonica (29 KDa), RNasa (14 KDa) e insulina (6 KDa).

FIGURA 21



Cromatografía en columna de Bio-Gel P-60 de 19 mg de proteína del extracto ácido-alcohólico del rhabdomiosarcoma de pectoral. Se utilizaron las mismas condiciones experimentales que las descritas en la Fig. 19.

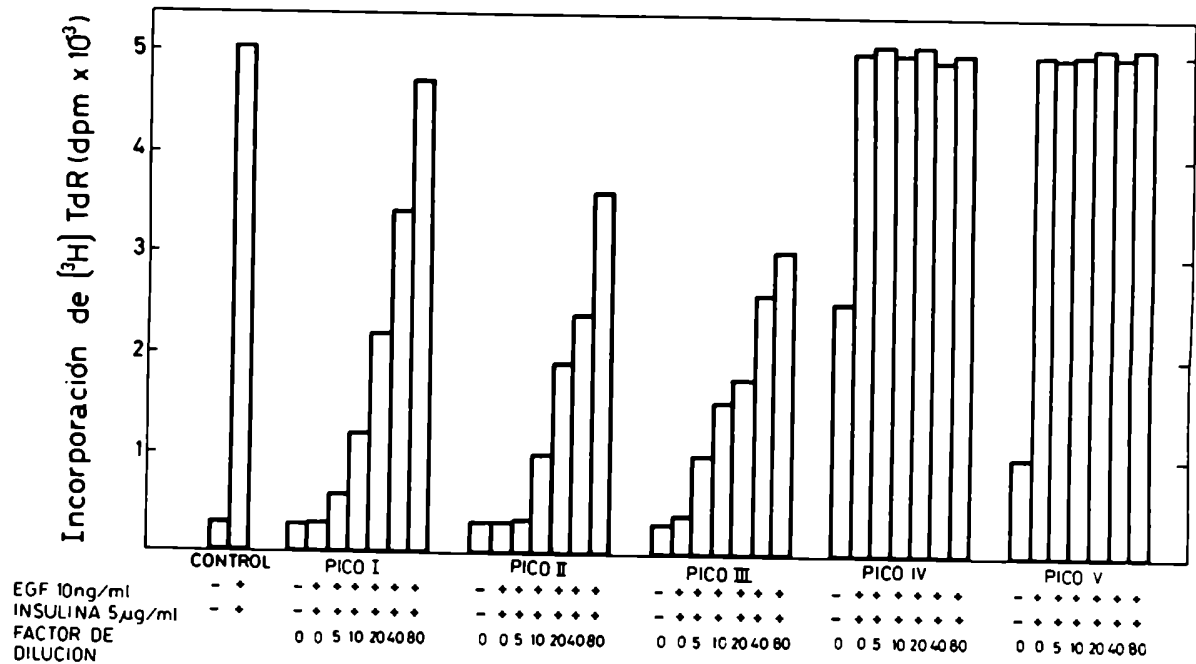
FIGURA 22



Insulina	PM 6 KDa
RNasa	PM 14 KDa
CAasa	PM 29 KDa
Pico I	PM 31 KDa
Pico II	PM 20 KDa
Pico III	PM 6 KDa
Pico IV	PM 4 KDa

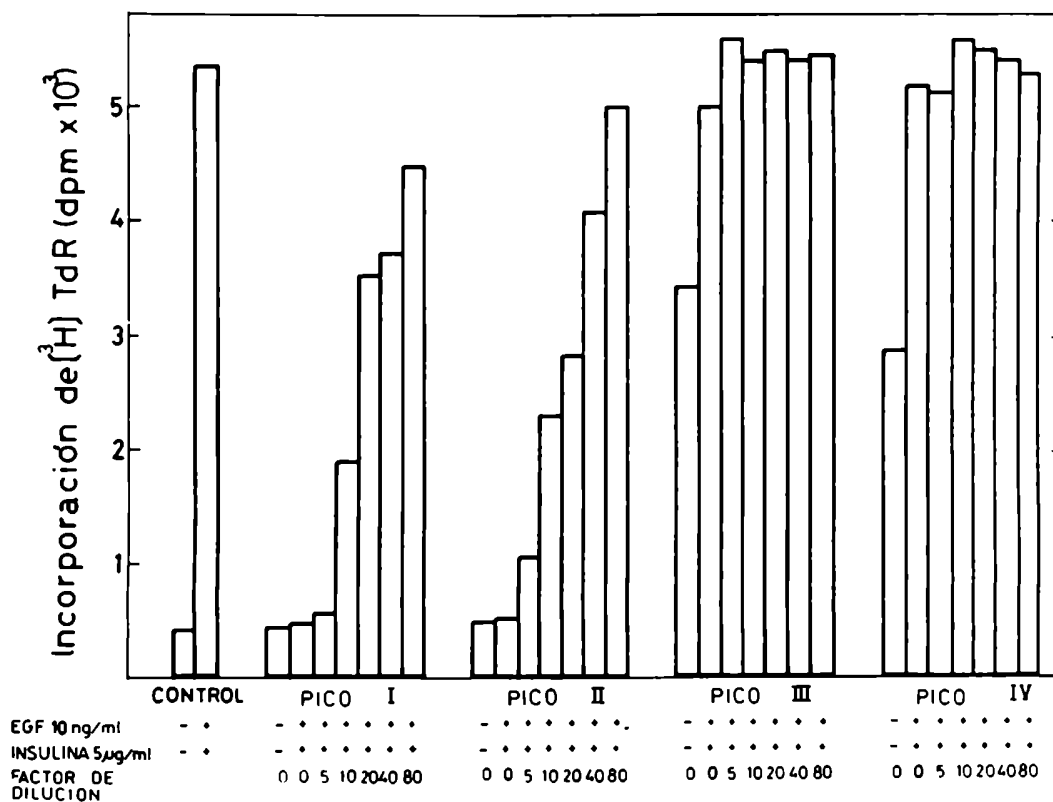
Determinación de los PM de las actividades transformantes purificadas del rabadomiosarcoma de pectoral. Los marcadores fueron los mismos que en la Fig 20.

FIGURA 23



Ensayos de actividad mitogénica/inhibición de la síntesis de DNA inducida por EGF e insulina en las células NRK-49F de los TGFs del carcinoma de pulmón. Se sembraron en cada hoyo de una microplaca de cultivo 20.000 células NRK-49F en 200 ul de Mc Coy's 5A con 10% de SFB. Después de 24 horas de incubación se arrestó el crecimiento cambiando el medio por Mc Coy's 5A con 0.5% de SFB. Tres días después se agregaron 1/40 parte de cada fracción con actividad transformante y las diluciones indicadas de estas fracciones. Cuando se estudiaron los efectos de los TGFs sobre la estimulación mitogénica se agregaron EGF (10 ng/ml) e insulina (5 ug/ml) juntamente con los factores. Después de 8 horas se añadieron 20 ul de (³H)timidina (1uCi/ml, 20 Ci/mmol) durante 16 horas. Luego se tripsinizaron las células y la radioactividad nuclear se determinó como se describió en "Materiales y Métodos". Los ensayos se realizaron por cuadruplicado y la DS estuvo dentro del 10% para todos ellos.

FIGURA 24



Ensayos de actividad mitogénica/inhibición de la síntesis de DNA inducida por EGF e insulina en células NRK, de los TGFs aislados del rhabdiosarcoma de pectoral. Las condiciones experimentales fueron las descritas en la Fig 23. Los datos representan la media de 4 determinaciones, encontrándose DS dentro del 10%.

II- AISLAMIENTO, PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE FACTORES DE CRECIMIENTO Y TRANSFORMACION EN TUMORES DE MAMA INDUCIDOS POR ACETATO DE MEDROXIPROGESTERONA EN HEMBRAS BALB/c.
ESTUDIO DE RECEPTORES PARA EGF E IGF-I EN LAS CELULAS TUMORALES.

En la segunda parte de este trabajo se utilizó un modelo de carcinogénesis experimental, desarrollado por Lanari y col.(316): tumores de mama inducidos por acetato de medroxiprogesterona (MPA) en hembras vírgenes de la cepa BALB/c.

Para una mayor comprensión de la relación entre GFs y desarrollo neoplásico resulta importante contar con un modelo de tumorigénesis en ratón dado que i) el tumor se localiza en un área circunscripta bajo la piel y puede ser fácilmente reconocido, medido cuantitativamente y removido "in toto" para realizar los estudios, ii) la existencia de cepas endocriadas de ratones con incidencia reproducible de neoplasias mamarias proporciona una herramienta fundamental para la investigación de factores etiológicos en la génesis de las mismas.

Este sistema de carcinogénesis hormonal presenta además la ventaja de permitir estudiar la relación entre a) GFs y hormonodependencia del crecimiento tumoral y b) presencia de receptores para hormonas y para GFs.

A) INDUCCION DE ADENOCARCINOMAS DE MAMA POR MPA

1) INCIDENCIA

La administración prolongada de MPA a 40 hembras Balb/c produjo la aparición de adenocarcinomas de mama en 16 de ellas. Considerando el riesgo de desarrollar un tumor que tienen los animales que mueren antes de finalizar el experimento se llega a una incidencia acumulada del 89% (Fig 25). Ninguno de los 60 ratones machos inoculados de la misma manera desarrolló adenocarcinomas de mama, ni tampoco las 42 hembras vírgenes utilizadas como control.

Las hembras tratadas con MPA presentaron frecuentemente lesiones preneoplásicas en las glándulas mamarias. La mayoría de estas lesiones fueron del tipo ductal (DH) y sólo en tres casos fueron hiperplásicas alveolares (HAN). Las primeras eran estructuras ductales dilatadas revestidas de epitelio cilíndrico tendiendo a la estratificación con anomalías nucleares (Fig 26). La hiperplasia atípica intraductal se caracterizó por el crecimiento papilar con diversos grados de atipia (Fig 27)

Los adenocarcinomas de mama fueron del tipo B de la clasificación de Dunn (326), habiéndose detectado un solo caso de adenocantoma y un carcinoma en el cual el área epitelial mostraba cierta diferenciación escamosa.

La mayoría de los adenocarcinomas fueron tumores infiltrantes quísticos formados por células cilíndricas atípicas con

tendencia variable a formar espacios glandulares (Fig 28 y 29). Las lesiones de tipo HAN observadas estuvieron siempre asociadas con tumores de mama mas indiferenciados, compuestos de masas basófilas de células atípicas que no mostraban tendencia a dejar espacios glandulares (Fig 30). Las células tumorales fueron positivas para queratina (Fig 31) y negativas para desmina y vimentina.

2) TRANSPLANTES SINGENEICOS DE LOS ADENOCARCINOMAS

El transplante de 5 tumores de mama inducidos por MPA a ratones singeneicos dio lugar al establecimiento de 6 líneas tumorales, dado que un tumor primario originó dos líneas diferentes. En este trabajo se estudiaron las líneas surgidas de este único tumor primario.

En la Fig 32 se observan los patrones de crecimiento tumoral de las dos líneas. En una de ellas, los tumores alcanzaron un gran tamaño dos meses después de su implantación, ya sea en presencia o en ausencia de la hormona, a esta línea la denominamos hormonoindependiente (HI). En el otro patrón de crecimiento tumoral, las neoplasias se desarrollaron muy poco en los ratones no tratados, aún 6 meses después del inóculo tumoral; en estos casos hubo una diferencia muy significativa tanto en la latencia como en los tamaños de los tumores. A esta línea se la llamó hormonodependiente. El análisis de los factores de crecimiento y

transformación se realizó en los tumores de la línea hormonoindependiente (HI), en los tumores hormonodependientes tratados con MPA (HD₂) y hormonodependientes desarrollados en ausencia de la hormona (HD₁).

FIGURA 25

Incidencia de adenocarcinomas de mama en hembras BALB/c
tratadas con MPA

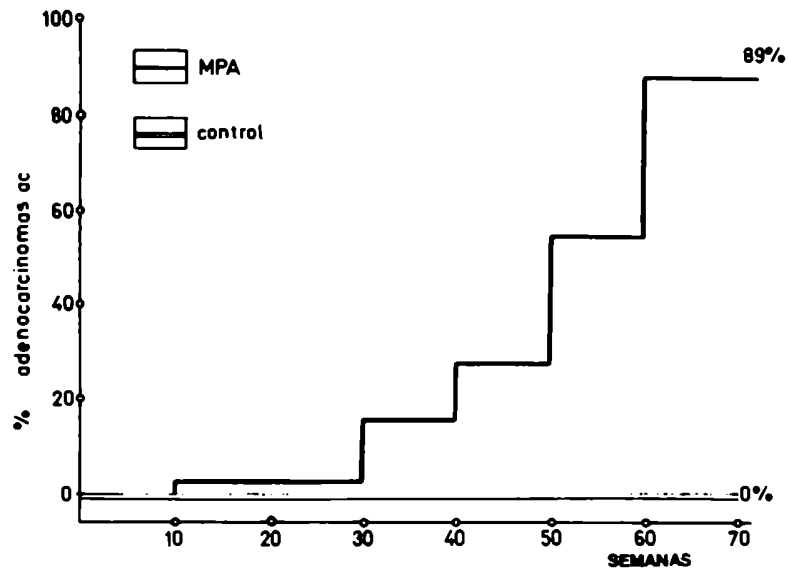
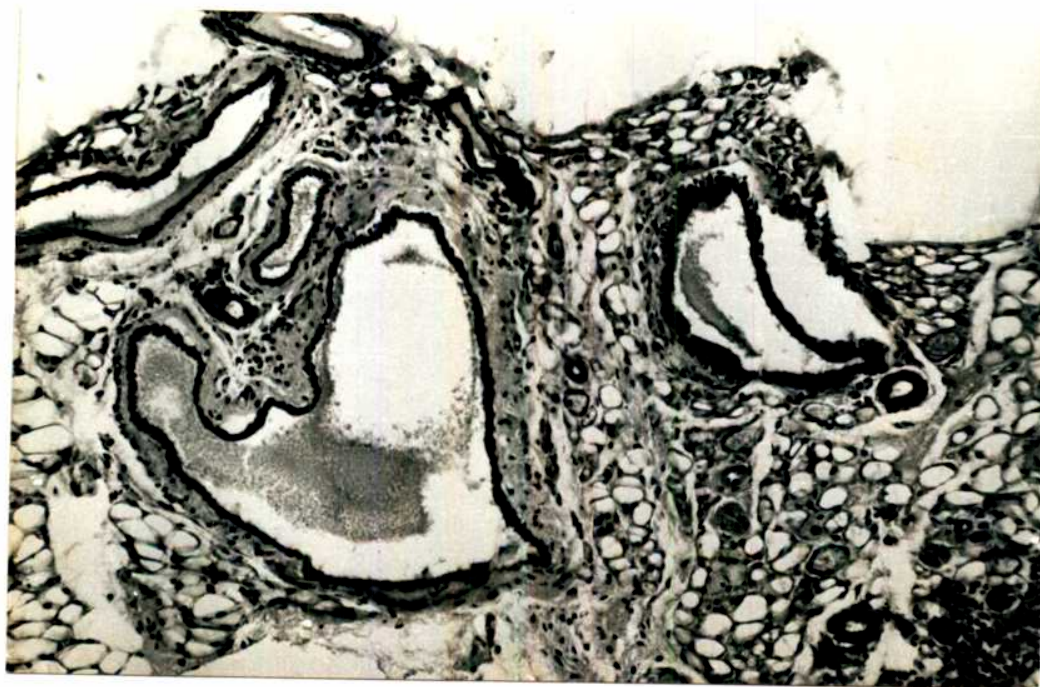


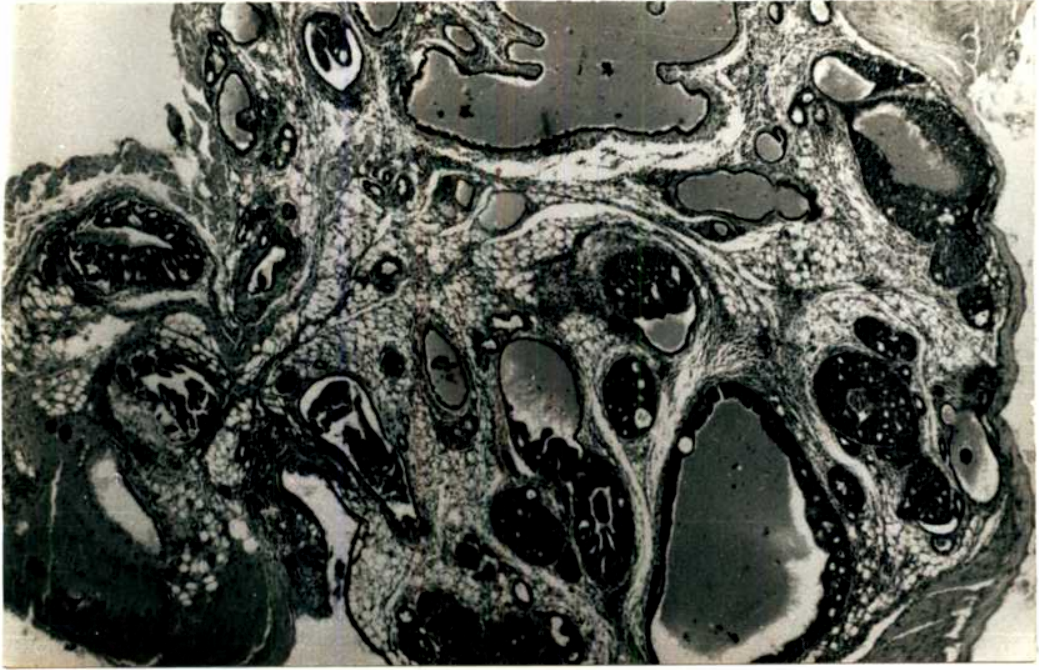
FIGURA 26



Ductos dilatados revestidos por epitelio hiperplásico. H-EX125.

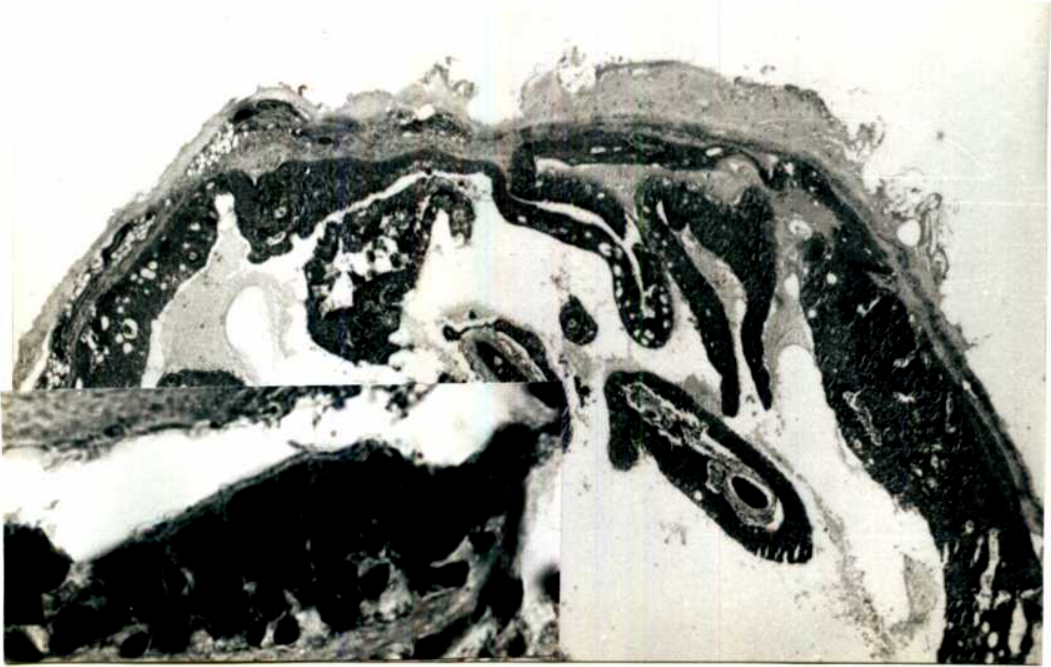
Recuadro: A mayor aumento se observa la estratificación del epitelio y las anomalías nucleares.

FIGURA 27



Hiperplasia ductal multifocal y carcinoma in situ, mostrando crecimiento papilar sólido y cubiforme. H-E X 40.

FIGURA 28



Adenocarcinoma infiltrativo, notese el espacio quístico revestido por epitelio cilíndrico con diferenciación glandular.

FIGURA 29



Adenocarcinoma ductal con espacios glandulares infiltrando el estroma. H-E X 125.

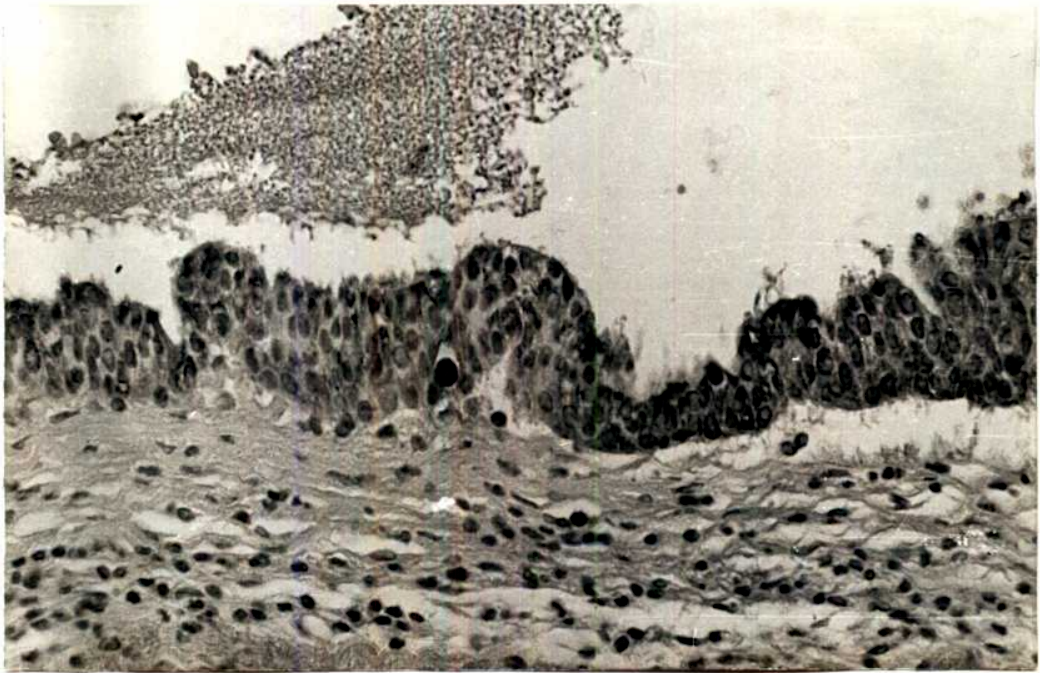
FIGURA 30



Adenocarcinoma de mama indiferenciado relacionado con HAN.

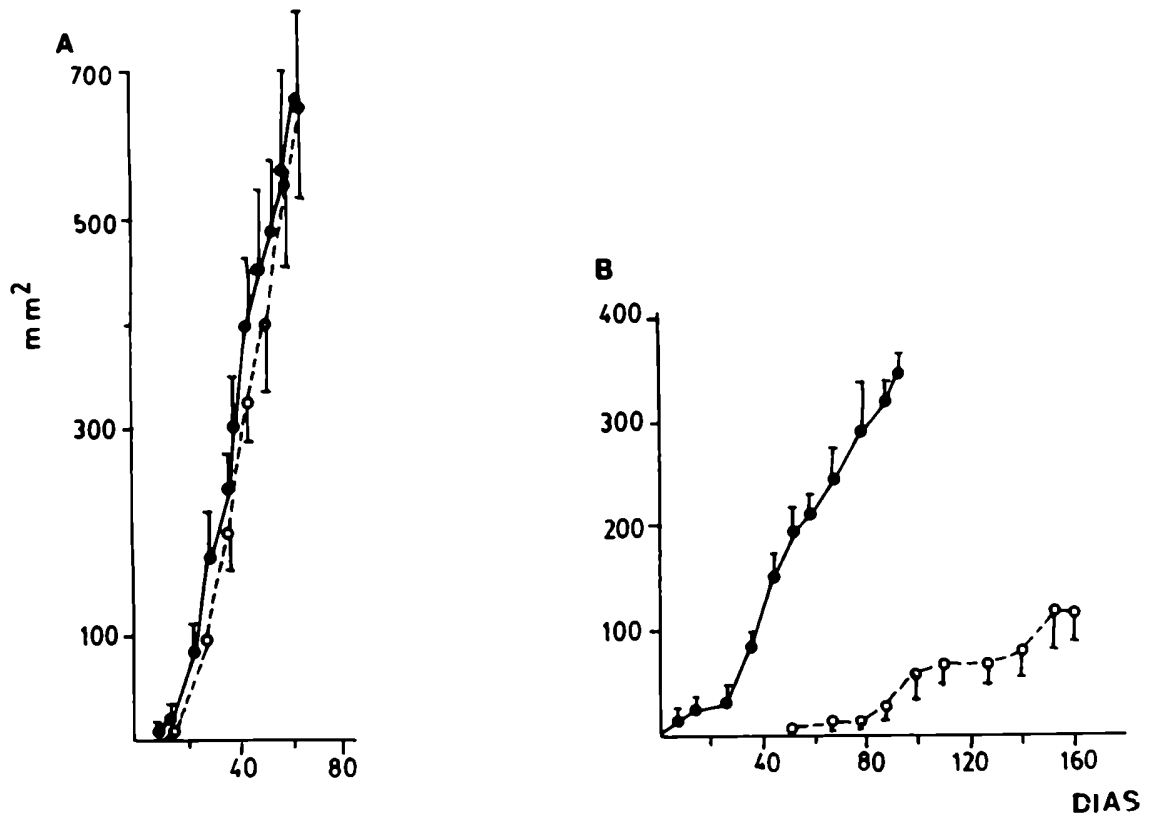
H-E X 40.

FIGURA 31



Adenocarcinoma de mama quístico mostrando tinción positiva para la citoqueratina. Contraste nuclear: rojo metilo X 250.

FIGURA 32



Crecimiento tumoral de dos líneas derivadas de un mismo tumor inducido por MPA, transplantadas en ratones tratados (puntos llenos) y no tratados (puntos blancos) con MPA. En el caso de la línea B las diferencias en tamaños tumorales son estadísticamente significativas. (test t de Student, $p < 0.05$) (327)

A: HI, B: HD.

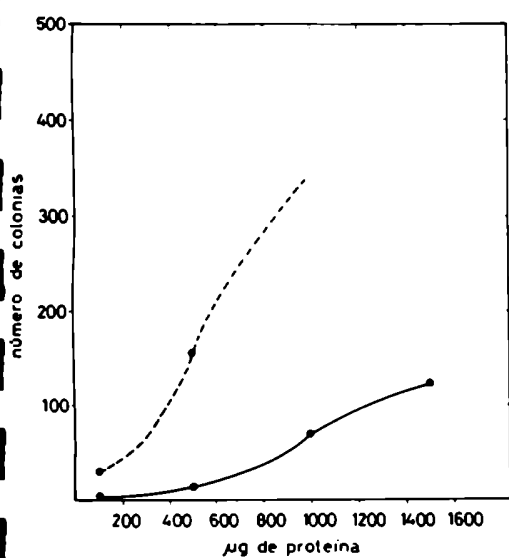
B) AISLAMIENTO, PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE TGFs

1) EXTRACCION ACIDO-ALCOHOLICA DE TGFs DE LOS ADENOCARCINOMAS

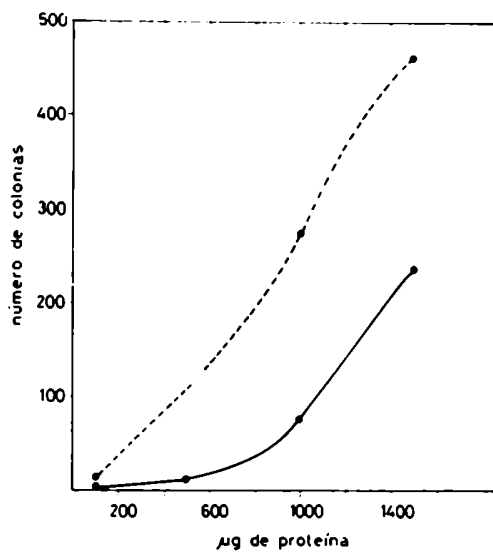
Se realizo la extracción ácido-alcohólica de 50 g de tumor de la línea hormonoindependiente (HI), 100 g de la hormonodependiente tratada con MPA (HD₂) y 25 g de la hormonodependiente sin tratar con MPA (HD₁). Se probó la capacidad de los extractos crudos dializados y liofilizados de promover el crecimiento en medio semisólido de las células NRK-49F en ausencia y presencia de 2 ng/ml de EGF. En los tres tipos tumorales se determinó la presencia TGFs. En coincidencia con los resultados obtenidos con los tumores humanos se observó que la respuesta de las células dependía de la concentración de proteínas. Además la actividad transformante fue potenciada por el EGF (Fig 33).

Para determinar las propiedades físico-químicas de los TGFs presentes en los extractos se realizaron los tratamientos descritos en la Tabla 5

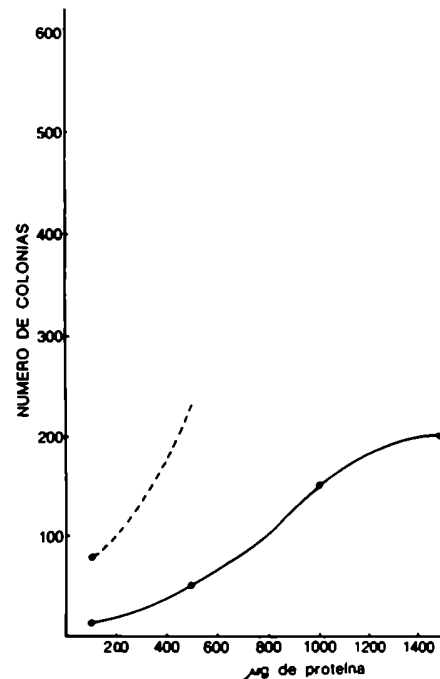
FIGURA 33



A



B



C

Estimulación del desarrollo de colonias de las células NRK-49F por los extractos ácido-alcohólicos de los tumores A: HORMONODEPENDIENTE TRATADO CON MPA (HD₂), B: HORMONOINDEPENDIENTE (HI) Y C: HORMONODEPENDIENTE SIN MPA (HD₁). Se utilizaron 6X10³ células/ml y se consideraron colonias aquellas que tuvieron 50 células después de 7 días de incubación. ---- + EGF (2ng/ml); _____ - EGF.

TABLA 5

Características de los TGFs presentes en los extractos crudos

Tratamiento	Número de colonias		
	Especimen		
	HD ₁	HD ₂	HI
Control	129	435	474
Tripsina (50 ug/ml 2h a 37 °C)	12	4	
Tripsina (50 ug/ml) + inhibidor de Tripsina de soja (100 ug/ml) 2h a 37°C	206	189	286
Ditiotreitol (0.065 M en NH ₄ HCO ₃ 0.1 M 1h a 22 °C)			
Calor (56 °C 30 min)	611	432	425

Se trataron alícuotas conteniendo 1 mg de proteína de los extractos crudos como se describe en Materiales y Métodos y luego se probó su capacidad transformante sobre células NP₂-49F.

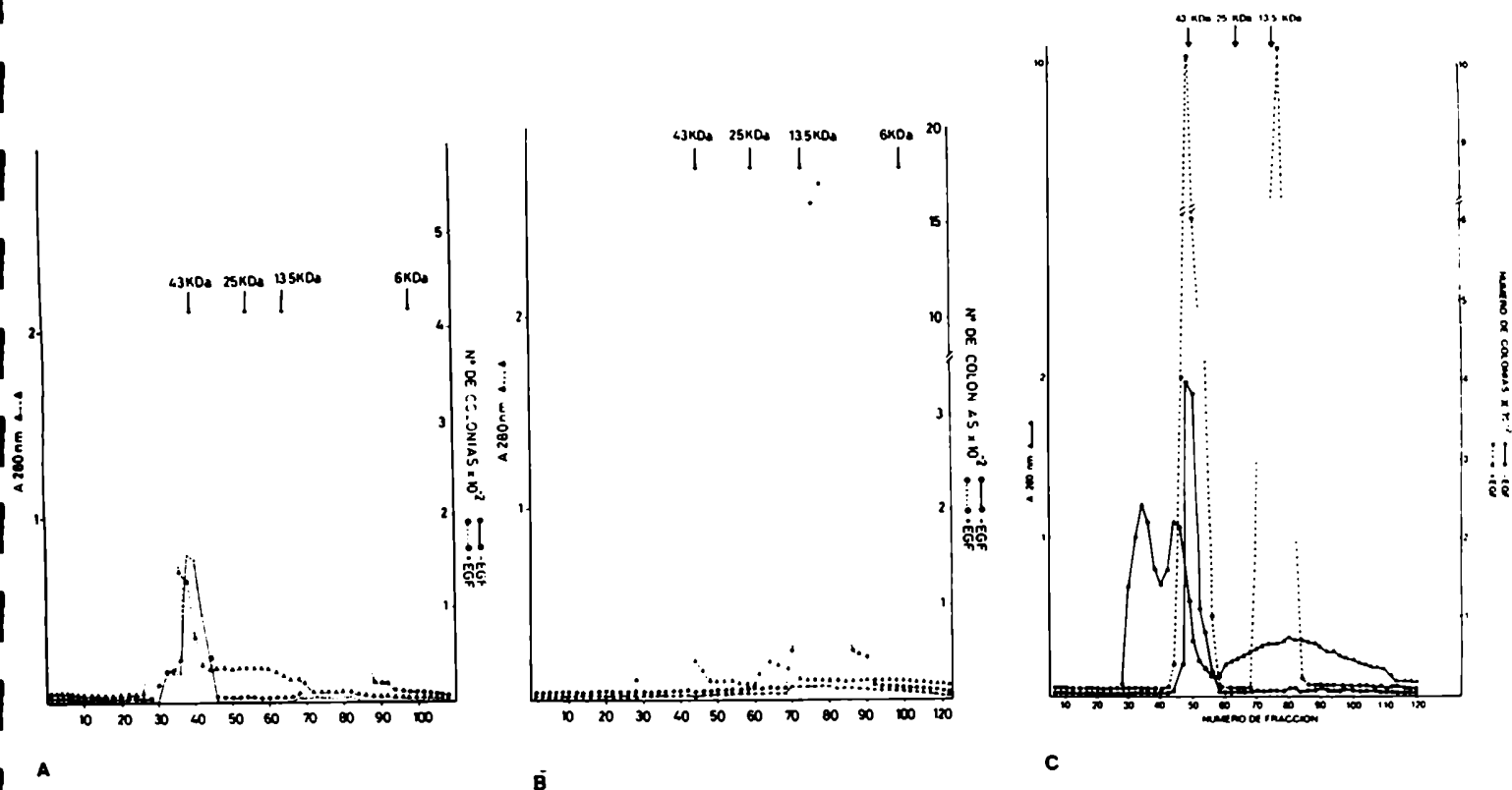
2) PURIFICACION DE LOS EXTRACTOS POR CROMATOGRAFIA EN COLUMNAS DE BIO-GEL P-60.

Cien mg de proteína de cada tumor fueron purificados por cromatografía de exclusión molecular en Bio-Gel P-60.

En la Fig 34 se observa que en los tumores HD₁ y HD₂ se encuentra presente un TGF de alto PM (43 KDa) que estimula la formación de colonias de NRK-49F en ausencia de EGF exógeno, pero cuya actividad es potenciada por EGF. Este pico no se observa en el tumor HI.

En los tres tumores está presente un TGF de 13 KDa, que solo es activo en presencia de EGF (Fig 34).

FIGURA 34



Cromatografía de exclusión molecular de los extractos ácido-alcohólicos de los tumores A: HD₂, B: HI Y C: HD₁. Se utilizó una columna de Bio-Gel P-60 equilibrada y eluida con ácido-acético 1 M. La velocidad de elución fue de 16 ml/hora y se colectaron fracciones de 3 ml. Se sembraron 100 mg de proteína de cada extracto. Los marcadores de PM fueron: ovoalbúmina (43 KDa), quimotripsinógeno (25 KDa), ribonucleasa A (13.5 KDa) e insulina (6 KDa). Se utilizaron alícuotas de 1/12 parte de cada fracción para determinar actividad transformante en presencia y ausencia de EGF.

3) CARACTERIZACION DE LOS TGFs PURIFICADOS POR COLUMNA DE BIOGEL P-60.

Con el objeto de caracterizar los TGFs purificados se procedió a unificar las fracciones de las columnas con actividad transformante.

En el tumor HD₁ las fracciones 44-54 se unieron liofilizándose luego distintas alícuotas. Idéntico procedimiento se siguió con las fracciones 38-44 del tumor HD₂.

Se realizaron también tres "pools" con las fracciones correspondientes al TGF de 13 KDa en los tres tumores (72-84 en el HD₁, 68-80 en el HD₂ y 68-82 en el HI).

A) Ensayos de competencia por los receptores de EGF

Se estudió la competencia de los TGFs con el ¹²⁵I-EGF por los receptores aislados de membranas de placentas humanas. Utilizando 125, 250 y 500 ug de proteínas del "pool" de fracciones correspondientes a cada uno de los picos, ninguno de los TGFs fue capaz de inhibir la unión del EGF a sus receptores.

B) Ensayos de estimulación mitogénica/ inhibición de la síntesis de DNA inducida por EGF e insulina en las células NRK-49F.

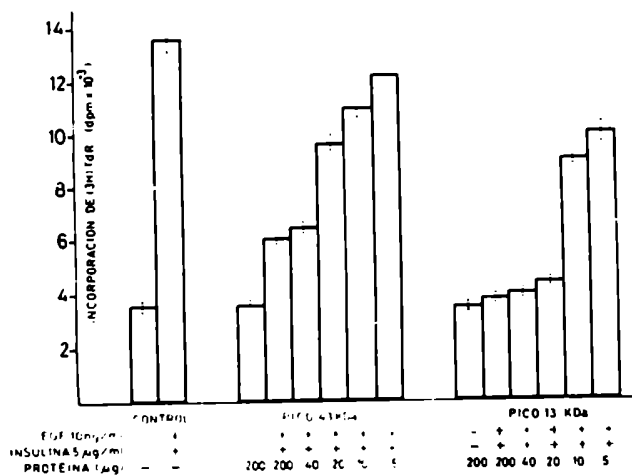
Para completar la caracterización de los TGFs se estudió la capacidad de los mismos de estimular la incorporación de (³H)ti-midina en cultivos subconfluentes de células NRK-49F arrestadas durante 72 horas en medio con 0.5% de SFB.

Utilizando 200 ug de proteína de los picos de 13 KDa aislados de cada uno de los tumores no se detectó estimulación de la síntesis de DNA en las células NRK-49F (Fig 35).

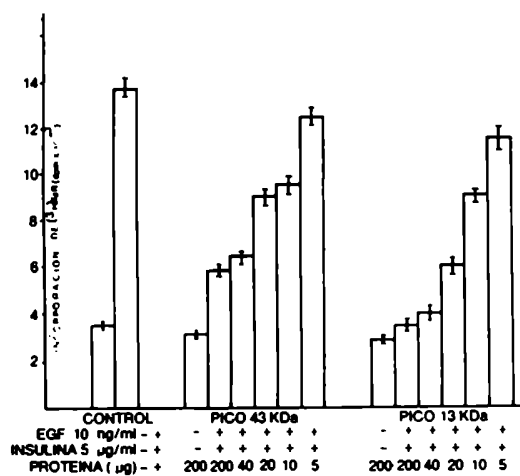
Realizando el ensayo con igual cantidad de proteína de los picos de 43 KDa presentes en la línea hormonodependiente, con y sin MPA, tampoco se observó actividad mitogénica sobre NRK-49F (Fig 35).

En la Fig 35 se observa también que tanto los TGFs de 13 KDa aislados de los tres tipos tumorales, como los de 43 Kda de los tumores hormonodependientes, son potentes inhibidores de la síntesis de DNA inducida en las células NRK-49F por EGF e insulina .

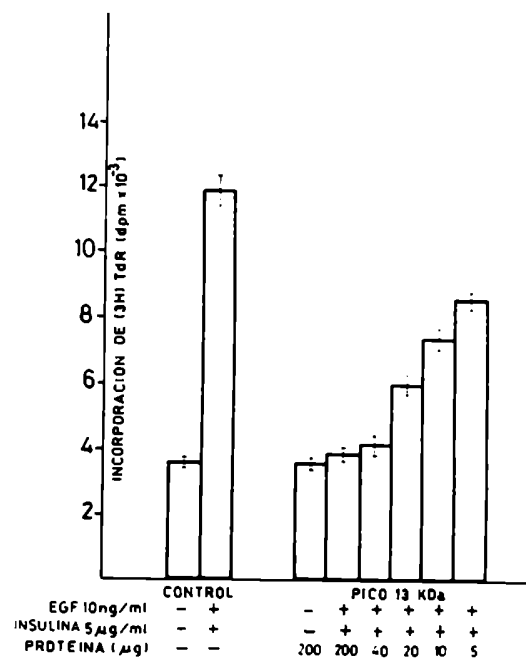
FIGURA 35



A



C



B

Ensayos de estimulación mitogénica/inhibición de la síntesis de DNA inducida por EGF (10 ng/ml) e insulina (5 µg/ml) en las células NRK-49F. Las fracciones con actividad transformante fueron unidas, liofilizadas y se ensayaron distintas cantidades de proteína de cada pico. A: HD₂, B: HI, C: HD₁.

4) PURIFICACION DE LOS TGFs POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA PRESION EN COLUMNA DE INTERACCION HIDROFOBICA

Los TGFs de 13 KDa aislados y purificados de los tres tumores y los de 43 KDa de los tumores HD₁ y HD₂ se siguieron purificando por cromatografía líquida de alta presión en columnas de interacción hidrofóbica TSK Phenyl 5PW. Se utilizó este método dado el buen resultado obtenido en la purificación del TGF-β de plaquetas humanas. (Fig 16)

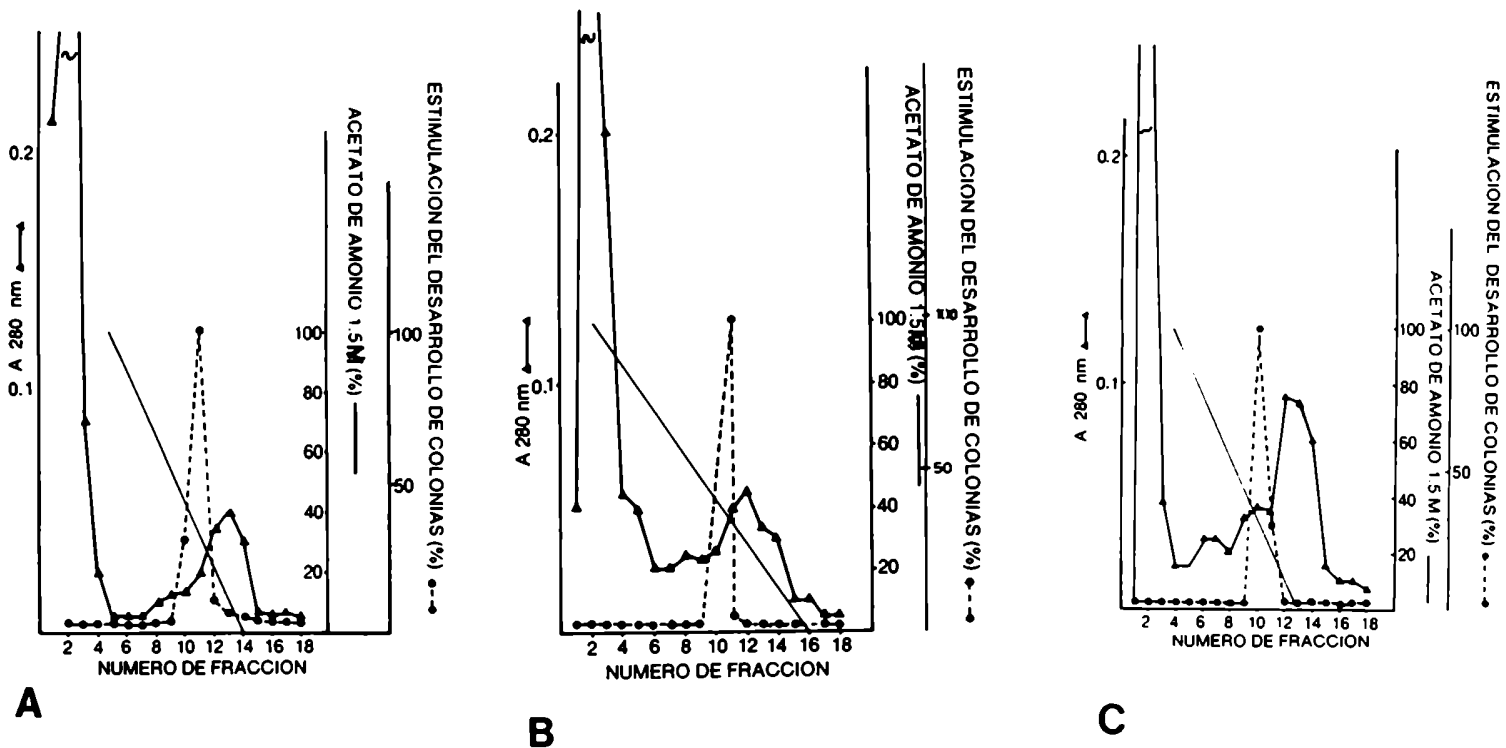
Se sembraron 5 mg de proteína de cada TGF y se eluyó con un gradiente lineal entre 1.5 M y 0.02 M de acetato de amonio. Se colectaron fracciones de 3 ml y 1/10 parte de cada una fue liofilizada para determinar actividad transformante en presencia de EGF.

En la Fig 36 se observa la purificación de los TGFs de 13 KDa. En los tres casos un solo pico de actividad transformante eluye entre 0.45 y 0.50 M de acetato de amonio. Este resultado contrasta con la elución del TGF-β de plaquetas descrita en Fig 16.

En la Fig 37 se muestran los resultados obtenidos utilizando el mismo procedimiento de purificación para 5 mg de proteína de los TGFs de 43 KDa de los tumores HD₁ y HD₂. En estos casos se observa un solo pico de actividad transformante que eluye a una concentración aproximada de 1.30 M de acetato de amonio.

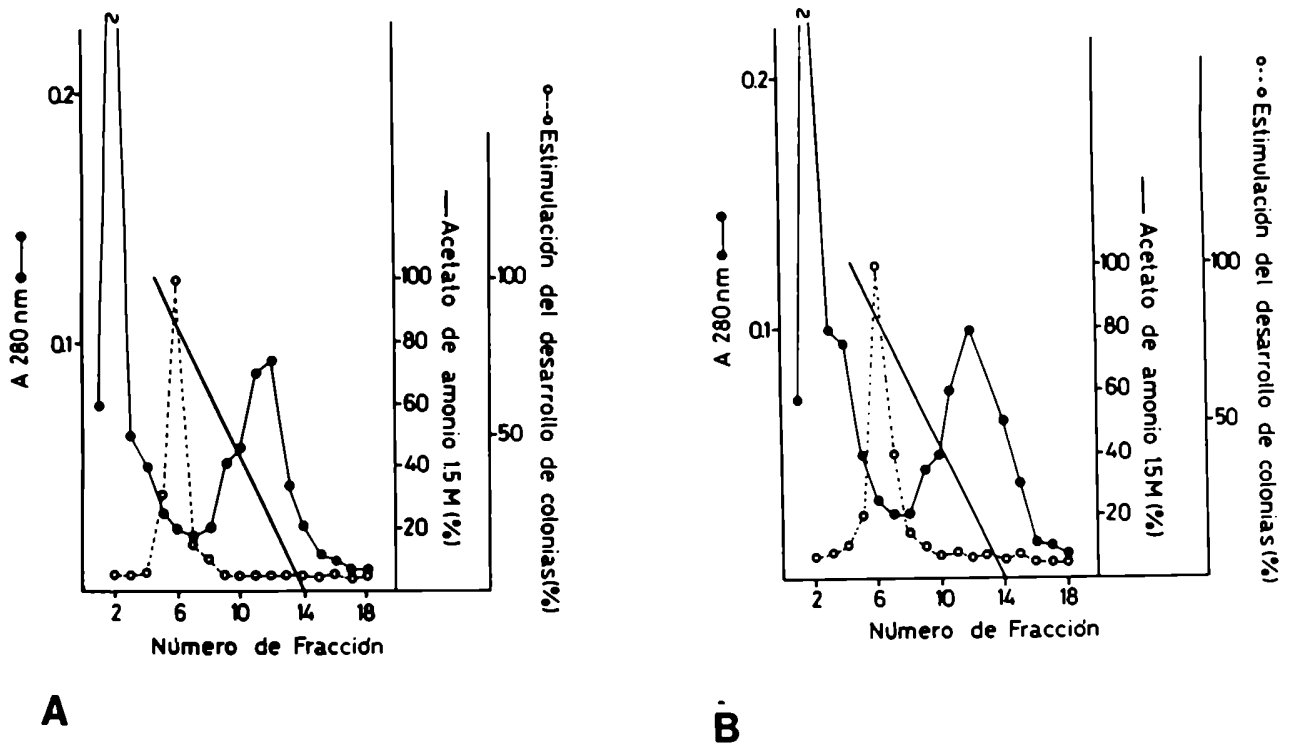
En ambas figuras se observa que este método permite separar a los TGFs de la mayoría de la proteína contaminante.

FIGURA 36



Cromatografía líquida de alta presión de los picos de actividad transformante de PM aparente 13 KDa. Se utilizó una columna de interacción hidrofóbica TSK Phenyl 5PW. Los factores fueron eluidos con un gradiente lineal entre 1.5 M y 0.02 M de acetato de amonio a una velocidad de 1.5 ml/min durante 27 minutos. Se colectaron fracciones de 3 ml y 1/10 parte de cada una fue liofilizada para determinar actividad transformante en presencia de EGF (2 ng/ml). A: HD₂, B: HI, C: HD₁.

FIGURA 37



Cromatografía líquida de alta presión de los picos de actividad transformante de PM aparente 43 KDa. Las condiciones experimentales fueron las descritas en la Fig 36. A: HD₁, B: HD₂.

5) BLOQUEO DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS TGFs DE 13 Y 43 KDa

Los resultados obtenidos en la caracterización de los TGFs aislados y purificados de los tumores indicaban que estos factores compartían con el TGF- β descrito propiedades biológicas tales como i) el requisito de la presencia de EGF para producir transformación fenotípica, ii) la inhibición de la síntesis de DNA inducida en células NRK-49F por EGF e insulina y iii) la no competencia por los receptores del EGF. Además, los TGFs de 13 Kda de PM aparente eluían en la misma posición que el TGF- β en las columnas de Bio-Gel P-60 que el TGF β . Sin embargo, el resultado obtenido en la purificación de los factores por HPLC indicaba que éstos eran diferentes al TGF- β aislado de plaquetas humanas. Así, se decidió estudiar la identidad inmunológica de los factores purificados con los TGF β_1 y TGF- β_2 .

Se ensayó la capacidad de un anticuerpo anti TGF- β de neutralizar la actividad biológica de los TGFs de 13 y 43 KDa purificados por HPLC.

La fracción con actividad transformante (1/10 parte) fue incubada con EGF en presencia y ausencia de un anticuerpo capaz de bloquear al TGF- β_1 porcino y humano y al TGF- β_2 porcino. Como control se utilizó TGF- β comercial purificado de plaquetas porcinas. Los TGFs también se incubaron con un anticuerpo anti TGF- α . En la Tabla 6 se observa que el anticuerpo empleado no es capaz de bloquear la actividad transformante de los TGFs de 13 KDa, confirmándose así la falta de identidad inmunológica de

estos factores con los TGF- β_1 y TGF- β_2 .

Idénticos resultados fueron obtenidos cuando se estudió los TGFs de 43 KDa de los tumores HD₁ y HD₂ (Tabla 7).

TABLA 6

EFFECTO DE UN ANTICUERPO ANTI TGF- β SOBRE LA ACTIVIDAD TRANSFORMANTE DE LOS TGFs DE 13 KDa PURIFICADOS POR HPLC

COLONIAS			
	CONTROL	+ANTICUERPO ANTI TGF- β	+ANTICUERPO ANTI TGF- α
TGF-HD ₁	2391 \pm 204	2180 \pm 180	2234 \pm 197
TGF-HD ₂	1427 \pm 136	1460 \pm 129	1573 \pm 132
TGF-HI	1311 \pm 120	1295 \pm 119	1427 \pm 125
TGF- β	2600 \pm 275	49 \pm 5	2297 \pm 256

TGF-HD₁: TGF DE PM 13 KDa PURIFICADO DEL TUMOR HORMONODEPENDIENTE SIN MPA, TGF-HD₂: TGF DE PM 13 KDa PURIFICADO DEL TUMOR HORMONODEPENDIENTE TRATADO CON MPA Y TGF-HI: TGF DE PM 13 KDa PURIFICADO DEL TUMOR HORMONOINDEPENDIENTE. LOS RESULTADOS SE EXPRESAN COMO $\bar{X} \pm$ ES.

TABLA 7

EFFECTO DE UN ANTICUERPO ANTI-TGF- β SOBRE LA ACTIVIDAD TRANSFORMANTE DE LOS TGFs DE 43 KDa PURIFICADOS POR HPLC.

COLONIAS			
	CONTROL	+ANTICUERPO ANTI-TGF- β	+ANTICUERPO ANTI-TGF
TGF-HD ₁	1957 \pm 180	1849 \pm 163	1930 \pm 195
TGF-HD ₂	1224 \pm 143	1334 \pm 123	1257 \pm 142
TGF- β	2600 \pm 275	49 \pm 5	2297 \pm 256

TGF-HD₁: TGF DE 43 KDa PURIFICADO DEL TUMOR HORMONODEPENDIENTE SIN MPA. TGF-HD₂: TGF DE 43 KDa PURIFICADO DEL TUMOR HORMONODEPENDIENTE TRATADO CON MPA

Los resultados de las Tablas 6 y 7 muestran el ensayo de la capacidad de un anticuerpo anti-TGF- β de neutralizar la actividad transformante de los TGFs de 13 y 43 KDa purificados por HPLC. Cada fracción con actividad transformante (1/10 parte) fue incubada con 2 ng/ml de EGF en presencia y ausencia de 50 ug/ml de un anticuerpo capaz de bloquear la actividad biológica de TGF- β ₁ porcino y humano y de TGF- β ₂ porcino. Se utilizó como control TGF- β comercial purificado de plaquetas porcinas (0.5 ng/ml). Los TGFs fueron también incubados en presencia de 50 ug/ml de un anticuerpo anti TGF- α

Resultados expresados como $X \pm ES$

C) ESTUDIO DE LA PRESENCIA DE FACTORES DE CRECIMIENTO (IGF-I, EGF) Y DE SUS RESPECTIVOS RECEPTORES EN LOS ADENOCARCINOMAS.

Según lo mencionado en la Introducción, GFs que participan en la regulación del crecimiento celular normal, también podrían estar involucrados en el proceso de transformación neoplásica. Entre estos factores se encuentran EGF e IGF-I los que de acuerdo a las evidencias obtenidas por diversos autores podrían tener un rol autocrino positivo en el crecimiento tumoral (92,93,114,117, 121,148,149,150).

En este trabajo se estudió la síntesis de EGF e IGF-I en los distintos tipos tumorales así como la presencia de receptores para estos factores en las células que los producen. El objetivo fue investigar la hipótesis autocrina del desarrollo neoplásico.

Nuevamente, la ventaja de contar con este modelo de carcinogénesis nos permitió analizar la influencia de la hormona MPA en la síntesis de GFs y la relación entre la presencia de receptores para GFs y hormonas esteroideas.

1) DETERMINACION DEL CONTENIDO DE EGF E IGF-I

Se realizó la extracción ácido-alcohólica según el método de Roberts (192,194) de muestras individuales de los tumores HD₁, HD₂ y HI. En los extractos se determinó la concentración de EGF e IGF-I utilizando los RIAs correspondientes.

En la tabla 8 se observa que hay un significativo aumento en la síntesis de EGF en los tumores HD tratados con MPA respecto del hormonodependiente sin MPA. El nivel de EGF en el tumor HI si bien es menor que en el HD₂ es significativamente mayor que en los tumores HD₁. Estos resultados indican que el MPA estimula la síntesis del EGF.

Resultados semejantes se obtuvieron en el estudio de los niveles de IGF-I. En la Tabla 9 se observa que el MPA induce también la síntesis de IGF-I.

TABLA 8

CONTENIDO DE EGF EN LOS EXTRACTOS ACIDO-ALCOHOLICOS DE LOS TUMORES

TUMOR	EGF (ug/g DE TUMOR)
HD ₁ (N=4)	1.87 ± 0.17
HD ₂ (N=4)	4.22 ± 0.64
HI (N=3)	3.96 ± 0.26

Se realizo la extracción ácido-alcohólica de muestras individuales de cada uno de los distintos tumores y se determino la concentración de EGF utilizando el radioinmunoanálisis correspondiente. Los datos representan la Media ± Error Standard. Al aplicar el TEST de WILCOXON (328) para analizar la significación en la diferencia de los valores del contenido de EGF se obtuvo :

entre HD₁ y HD₂ p= 0.0285

entre HD₁ y HI p= 0.0571

entre HD₂ y HI p> 0.5

TABLA 9

CONTENIDO DE IGF-I EN LOS EXTRACTOS ACIDO-ALCOHOLICOS DE LOS TUMORES

TUMOR	IGF (ng/g DE TUMOR)
HD ₁ (N=4)	38.50 ± 3.77
HD ₂ (N=4)	94.00 ± 17.07
HI (N=3)	56.00 ± 6.93

Se realizo la extracción ácido-alcohólica de muestras individuales de cada uno de los distintos tumores y se determino la concentración de IGF-I utilizando el radioinmunoanálisis correspondiente. Los datos representan la Media ± Error Standard. Al aplicar el TEST de WILCOXON (328) para analizar la significación en la diferencia de los valores del contenido de IGF-I se obtuvo :

entre HD₁ y HD₂ p= 0.0285

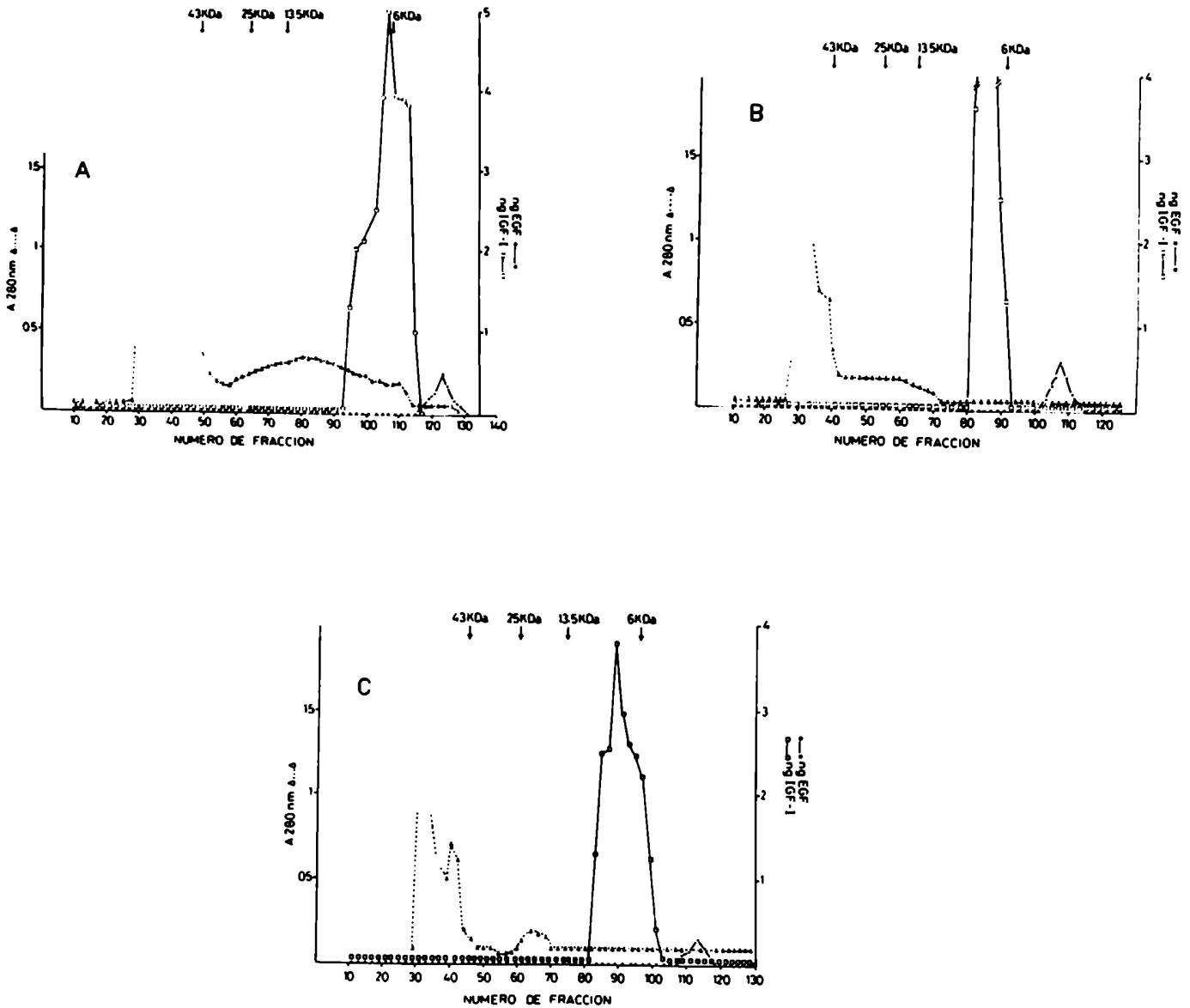
entre HD₁ y HI p= 0.0571

entre HD₂ y HI p= 0.1143

2) DETERMINACION DE LA PRESENCIA DE EGF E IGF-I POR RIAs
EN LAS FRACCIONES DE LA COLUMNAS DE BIO-GEL P-60.

Se trabajó con las fracciones obtenidas al purificar 100 mg de proteína, de cada uno de los extractos ácido-alcohólicos, por columnas de Bio-Gel P-60. Sobre alícuotas de las fracciones impares se realizaron los RIAs para determinar la presencia de EGF e IGF-I. En la Fig 38 se observa la elución del EGF e IGF-I en los correspondientes rangos de PM.

FIGURA 38



Las fracciones impares colectadas de las columnas de Bio-Bel P-60 y liofilizadas se redisolviéron en HCl 4 mM y se neutralizó luego con "buffer" fosfato. 1/15 parte de cada fracción fue utilizada para realizar el RIA de IGF-I y 1/60 parte para el RIA de EGF. Los marcadores de PM fueron ovoalbúmina (43 KDa), quimotripsinógeno (25 KDa), ribonucleasa A (13.5 KDa), e insulina (6 KDa). A: HD₁, B: HD₂, C: HI.

3) DETERMINACION DE LA PRESENCIA DE LA PROTEINA TRANSPORTADORA DE IGF-I

La presencia de IGF-I en los extractos ácido-alcohólicos de los distintos tumores evidenció la síntesis de este GF por las células tumorales.

Se conoce actualmente que los IGF-I y II se encuentran asociados a proteínas (IGF-BP) que en un primer momento fueron descritas como simples transportadoras que prolongaban la vida media de los IGFs. Sin embargo, distintos hallazgos han hecho evidente que estas proteínas están involucradas en la modulación de la actividad biológica de los IGFs (329,330,331,332).

Por lo tanto, se investigó la producción de proteínas transportadoras de IGF-I por las células neoplásicas como una forma de ampliar el estudio del mecanismo de acción de IGF-I.

Para realizar este estudio se utilizaron las fracciones de la cromatografía en Bio-Gel P-60 donde se eluyó con ácido acético 1 M. El trabajo a pH ácido fue importante para asegurar la detección de cualesquiera de las especies de la IGF-BP producida por las células tumorales. En efecto, ese pH permite i) la completa disociación del IGF endógeno de la proteína transportadora, ii) la disociación de la especie de 150 KDa de la BP en su subunidad de 50 KDa que podría ser detectada en la columna de Bio-Gel P-60.

Se incubó 1/15 parte de las fracciones de la cromatografía con ^{125}I -IGF-I y luego se separó la hormona libre mediante adsor-

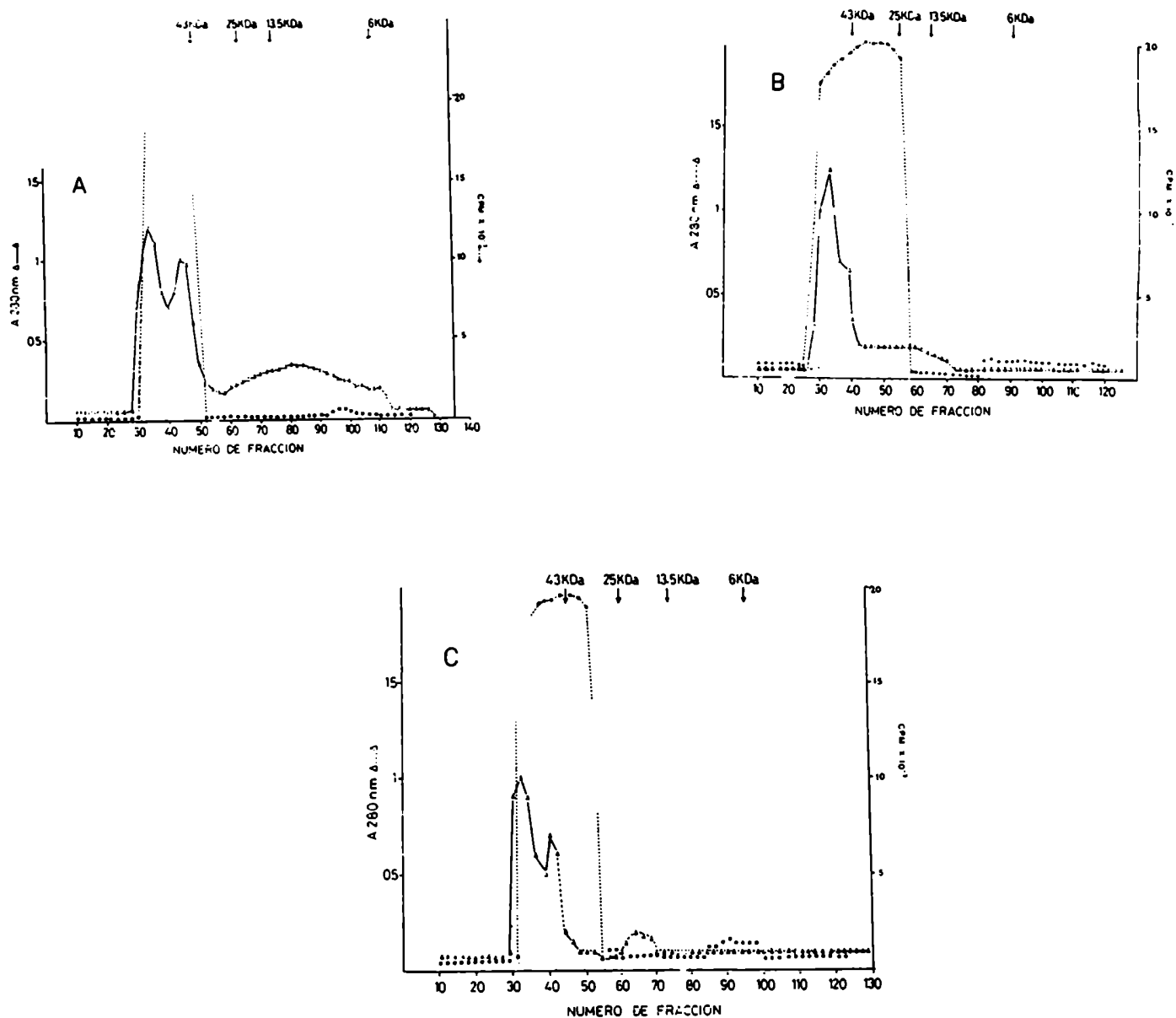
ción con Norit A.

En los tres tumores se determinó la presencia de una proteína transportadora de IGF-I de PM aproximado 43 KDa (Fig 39).

4) DETERMINACION DE RECEPTORES DE ESTROGENOS Y PROGESTERONA

En la Tabla 10 se observa que el tumor HD con y sin MPA presenta altos niveles de receptores para estrógenos y progesterona. Por el contrario, el HI presenta bajo contenido de E-R y PG-R.

FIGURA 39



Determinación de la presencia de la proteína transportadora de IGF-I en los tumores A: HD₁; B: HD₂; C: HI. Se incubó 1/15 parte de las fracciones de la cromatografía en Bio-Gel P-60 con 20,000 cpm de ¹²⁵I-IGF-I durante 16 horas a 4 °C. Luego se separó la hormona libre mediante adsorción con Norit A

TABLA 10

Concentración de receptores de estrógenos (E-R) y progesterona (PG-R) en fentomoles/mg de proteína .

TUMOR	ER	PR
HD ₁	254	708
	46	150
	64	78
	88	63
	234	498
HD ₂	154	272
	90	41
	82	70
	54	240
	99	119
HI	24	ND
	36	ND
	31	ND
	29	12
	31	6

ND: no detectables

5) DETERMINACION DE RECEPTORES PARA EGF EN LOS TEJIDOS TUMORALES

Los resultados expuestos en las Tablas 8 y 9 demostraron la síntesis de EGF e IGF-I en los tres tipos tumorales. Por lo tanto, los estudios radioligando-receptor de ambos GFs se llevaron a cabo realizando el tratamiento de las membranas con un "buffer" ClNa glicina de pH 3, que produce la disociación del factor endógeno.

En la Tabla 11 se muestran los resultados obtenidos en los estudios de receptores de EGF. Los preparados de membrana fueron los descritos en la Sección Materiales y Métodos 12. B. I.ii

Para la determinación del número de receptores se realizó el ensayo en condiciones de saturación utilizándose 2 nM 125 I-EGF.

Tal como se observa tanto los tumores HD₁ como los HI presentan receptores para este factor, siendo Q= 27.6 fmoles/mg de proteína para el HD₁ y 23.27 fmoles/mg para el HI. En los tumores HD₂ hay una significativa disminución en los niveles de EGF-R (Q= 7.12 fmoles/mg de proteína).

Para el estudio de la afinidad de los receptores en los tumores se realizó un "pool" con los preparados de membrana de los tumores HD₁ y HI y se realizó el ensayo en las condiciones descritas en Materiales y Métodos. Los datos, analizados según el método de Scatchard se observan en la Fig 40, siendo Kd= 0.8×10^{-9} M y Q= 25.9 fmoles/mg de proteína.

TABLA 11

DETERMINACION DE RECEPTORES PARA EGF

TUMOR	HD ₁	HD ₂	HI
RECEPTORES DE EGF (fmoles/mg de proteína)			
	28.6	8.30	27.2
	25.0	4.90	19.09
	23.4	6.61	20.4
	27.9	6.9	24.7
	30.9	8.9	25
	\bar{x} = 27.16	\bar{x} = 7.12	\bar{x} = 23.27
	ES= 1.33	ES= 0.70	ES= 1.51

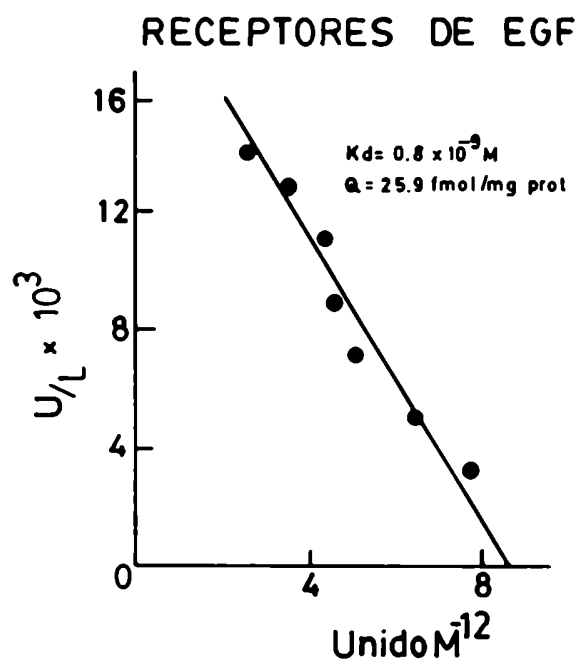
100 ug de proteína de membrana de cada una de las líneas tumorales se incubaron a 4 °C durante 16 horas con 2 nM ¹²⁵I-EGF en presencia y ausencia de 500 ng de EGF. Al aplicar el TEST de WILCOXON (328) para analizar la significación en la diferencia de los valores de receptores de EGF se obtuvo:

entre HD₁ y HD₂ P= 0.007936

entre HD₁ y HI P= 0.09523

entre HD₂ y HI P= 0.007936

FIGURA 40



Análisis de Scatchard de los datos de unión del EGF a sus receptores en el "pool" de membranas de los tumores HD₁ y HI

6) CARACTERIZACION ESTRUCTURAL DE LOS REPTORES PARA EGF EN LAS CELULAS TUMORALES

Después de realizar los ensayos de unión del EGF a su receptor de membrana se estudiaron las características estructurales del mismo.

Para ello, se usó el reactivo de entrecruzamiento disuccinimidil suberato (DSS) que permite la unión específica y covalente del GF marcado a su receptor. Esta técnica hace posible la posterior caracterización del complejo GF-receptor marcado por métodos físicos como la electroforesis en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS).

Para la caracterización de los receptores del EGF se utilizaron las membranas del tumor HI.

La Fig 41 corresponde a la autoradiografía del gel fijado y secado obtenida con una exposición de 14 días. La preparación de membrana fue la descrita en 12. B.I.ii. De acuerdo a lo indicado en la leyenda se sembraron distintas cantidades de proteína de membrana incubada con el ^{125}I -EGF y tratada posteriormente con DSS. La Fig 42 es la autoradiografía del gel obtenido con las membranas preparadas según la técnica detallada en 12 B.I.i. Nuevamente se sembraron distintas cantidades de proteína de membrana incubada con ^{125}I -EGF y estabilizado el complejo GF-receptor con DSS.

tal como se observa en ambas figuras, aparece una banda intensamente marcada en la zona de PM 170,000 la que es completa-

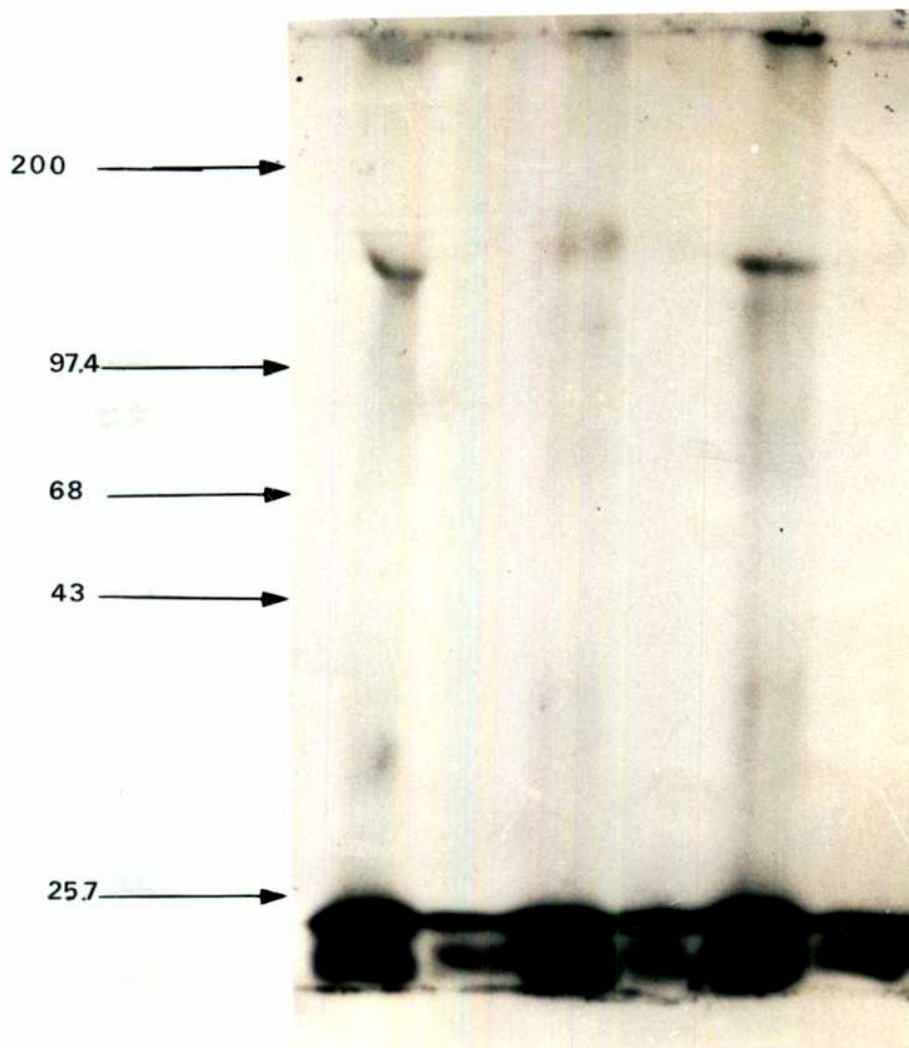
mente inhibida por el EGF frío.

De acuerdo a esto, este componente de membrana corresponde al receptor del EGF y es semejante en sus propiedades estructurales al descrito en una gran variedad de tipos celulares (107,108,109,110).

Las bandas de mucho menor intensidad que se observan en la zona de PM bajos probablemente representan productos de clivaje del receptor tal como ha sido descrito por otros autores (109, 110).

La Fig 43 presenta los geles con los cuales se obtuvieron las autoradiografías de las Fig 41 y 42, teñidos para proteínas con Coomassie Blue.

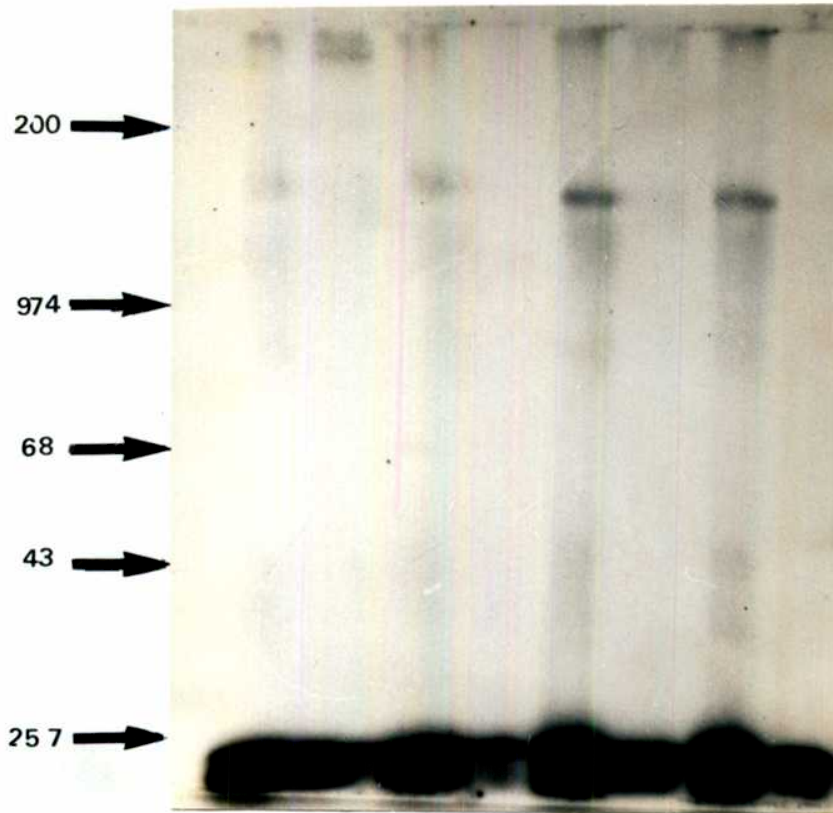
FIGURA 41



ESTABILIZACION COVALENTE DE LOS COMPLEJOS ^{125}I -EGF UTILIZANDO LAS MEMBRANAS DEL TUMOR HI. Autorradiografía del gel fijado y secado obtenida con 14 días de exposición.

Las membranas, preparadas como se describió en Materiales y Métodos 12. B.I.ii, se incubaron con 1.5 nM ^{125}I -EGF a 4 °C durante 16 horas en Buffer PBS pH 7.4 conteniendo 2 % de BSA. Después de lavar la hormona no unida las membranas se incubaron con 0.2 mM DSS a 0 °C durante 15 minutos y se paró la reacción por dilución con "buffer" Tris pH 7.4, se centrifugó y con el preparado de membrana resultante se realizó la electroforesis en las condiciones descritas en Materiales y Métodos. Las alícuotas sembradas fueron de 200 ug de proteína en el canal 1, 300 ug en el canal 3 y 400 ug en el 5. Los canales 2,4 y 6 corresponden a la incubación en presencia de 500 ng de EGF frío. Los números a la izquierda representan los PM $\times 10^{-3}$ de los marcadores utilizados en la corrida.

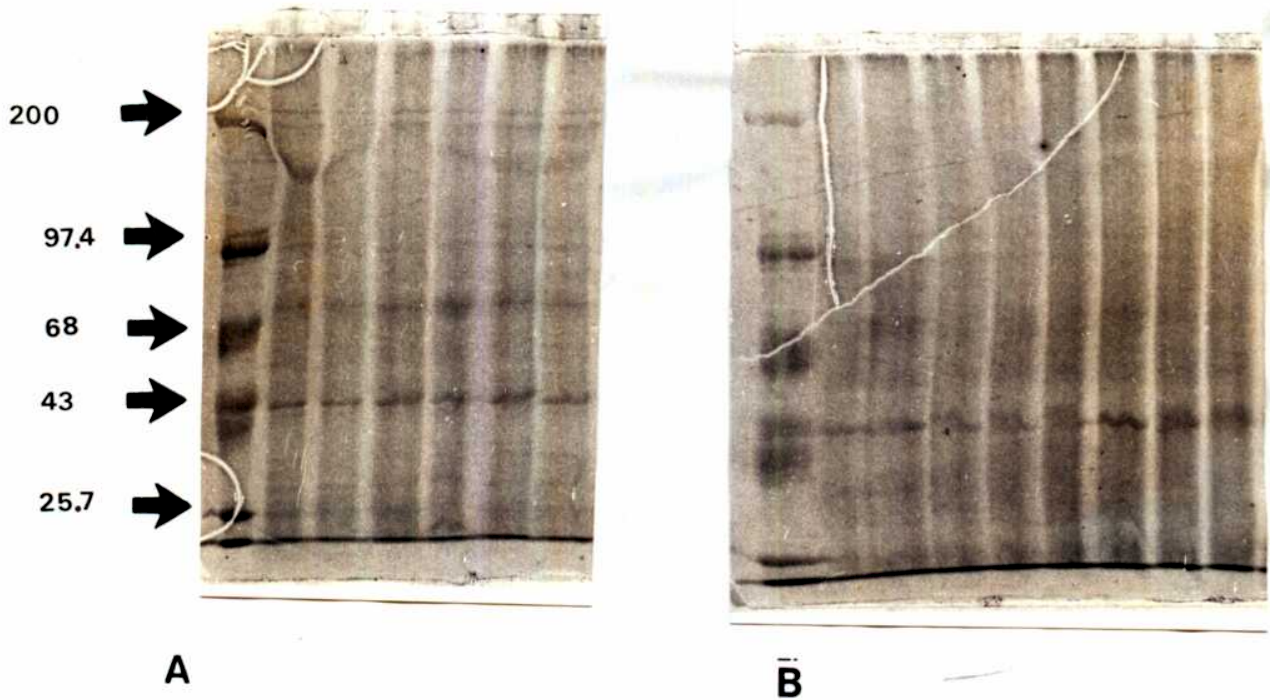
FIGURA 42



ESTABILIZACION COVALENTE DE LOS COMPLEJOS ^{125}I -EGF EN LAS MEMBRANAS DEL TUMOR HI. Autoradiografía del gel fijado y secado obtenido con 14 días de exposición.

Las membranas fueron preparadas como se describió en Materiales y Métodos 12 B I.i. Las condiciones de trabajo fueron las descritas en la figura anterior. En el canal 1 se sembró 100 ug de proteína, en el 3: 200 ug, en el 5: 400 ug y en el 7:600 ug. Los canales 2, 4, 6, y 8 corresponden a la presencia de 500 ng de EGF durante la incubación.

FIGURA 43



Electroforesis correspondientes a las autoradiografías de las Figs A: 41, B: 42.

Se utilizó el sistema discontinuo de Laemmli (324). Los geles fueron del 7.5% de poliacrilamida. Se presenta el gel teñido para proteínas con Coomassie Blue. Los marcadores de PM sembrados en el canal 1 fueron: miosina (cadena H) PM 200,000; fosforilasa B PM 97,400; albúmina sérica bovina PM 68,000; ovoalbúmina PM 43,000; quimotripsinógeno PM 25,700; β -lactoglobulina PM 18,4000; lisozima PM 14,300.

7) DETERMINACION DE RECEPTORES PARA IGF-I EN LOS TEJIDOS TUMORALES

La presencia de una proteína transportadora de IGF-I en los extractos ácido-alcohólicos de los tres tipos tumorales, determinó la necesidad de estudiar cuidadosamente las condiciones experimentales que permitiesen establecer el número de receptores y la afinidad de los mismos por el IGF-I, en las células malignas.

En efecto, trabajos recientes consignan que en tejidos en los cuales hay síntesis de proteínas transportadoras de IGF-I, en los preparados de membrana utilizados para el estudio de receptores de IGF-I, suelen encontrarse presentes estas proteínas. La interpretación de los datos de los ensayos radioligando-receptor se ve así dificultada por la contribución de la proteína transportadora a la unión del IGF-I (329,330,331,332).

Dado que por los resultados mostrados en la Fig 39 conocíamos el PM de la IGF-BP sintetizada por las células tumorales, el primer paso consistió en realizar un ensayo de unión del IGF-I, en condiciones de saturación, a las membranas del tumor HI, seguido por la estabilización covalente del complejo GF-receptor mediante el empleo de DSS. De esta forma, la presencia de la proteína transportadora de IGF-I, en los preparados de membrana, sería fácilmente visualizada en las autoradiografías.

La Fig 44 muestra los resultados obtenidos en este ensayo. Como puede observarse, además de las bandas de alto PM, que co-

responden al receptor del IGF-I y que serán analizadas en la sección siguiente, se observa una banda marcada en la región de PM 43 KDa. Los canales 1 y 2 corresponden al preparado de membrana obtenido según la técnica descrita en 12 B I.i y los canales 5 y 6 a los preparados obtenidos con la técnica 12 B I.ii. Esto nos permitió establecer que estas membranas estaban contaminadas con la IGF-BP y por lo tanto que para obtener datos de la unión del IGF-I a su receptor era necesario procesar los tejidos de modo de eliminar la IGF-BP.

Así, se desarrolló la técnica descrita en 12 B II. Los tres tipos de tumores se procesaron según esta metodología y nuevamente se utilizaron las membranas del tumor HI para realizar un ensayo radioligando-receptor en las condiciones anteriores y luego estabilizar covalentemente el complejo GF-receptor.

En la Fig 45 se observa que en estas membranas ha desaparecido la banda de 43 Kda.

Por lo tanto los estudios posteriores de receptores para IGF-I se realizaron con estos preparados a los que denominamos fracción microsomal.

En la Tabla 12 se observan los resultados de los experimentos de unión del IGF-I en los tres tipos tumorales, realizados en condiciones de saturación .

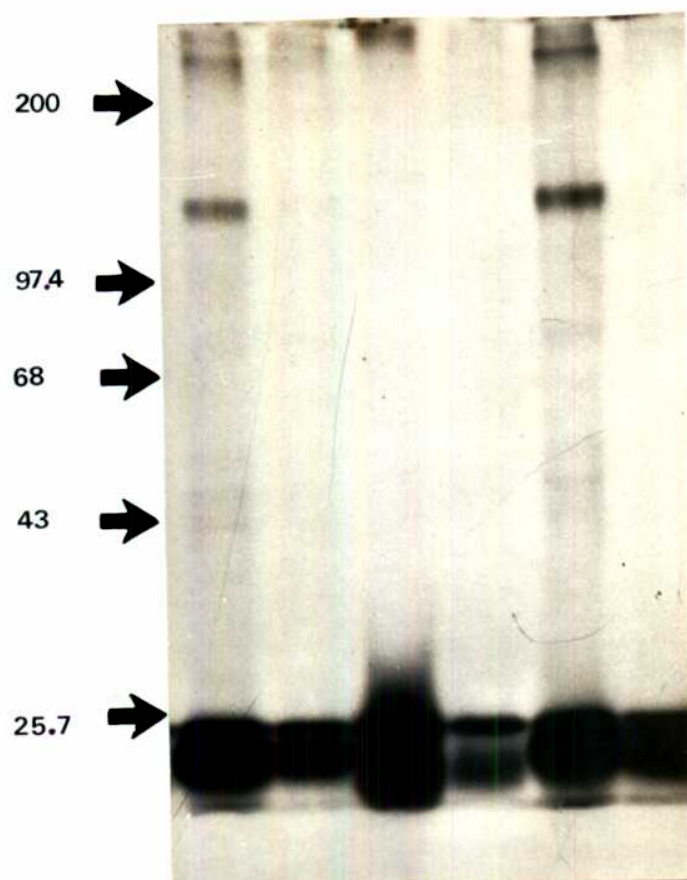
Tal como se encontró para el EGF se determinó la presencia de receptores en los tumores HD₁ y HI.

La afinidad se estudió realizando un "pool" de las membranas de los tumores HD₁ y HI. El ensayo se realizó de acuerdo a lo

descrito en Materiales y Métodos y los datos de unión se analizaron según el método de Scatchard utilizando el programa LIGAND (333) para dos sitios de unión.

En la Fig 46 se muestran los datos que indican la presencia de sitios de alta afinidad ($K_d = 3.4 \times 10^{-12}$ M ; $Q = 22.5$ fmoles/mg) y de sitios de baja afinidad ($K_d = 1.3 \times 10^{-10}$ M; $Q = 143.7$ fmoles/mg)

FIGURA 44

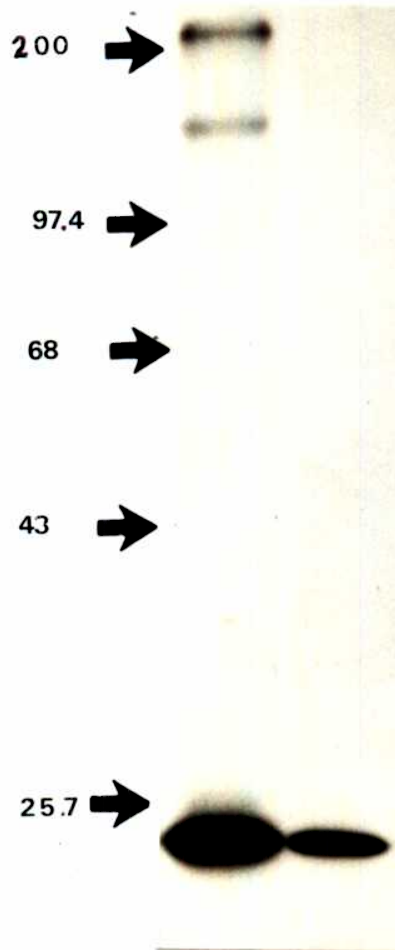


ESTABILIZACION COVALENTE DE LOS COMPLEJOS ^{125}I -IGF UTILIZANDO LAS MEMBRANAS DEL TUMOR HI. Autoradiografía del gel fijado y secado obtenida con 14 días de exposición.

Los canales 1 y 2 corresponden al preparado de membrana obtenido según la técnica descrita en 12 B I.i y los canales 5 y 6 a los preparados obtenidos con la técnica 12 B I.ii. Canales 3 y 4: preparados de membrana desnaturalizados.

Estas membranas se incubaron con $1.12 \text{ nM } ^{125}\text{I}$ -IGF a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 16 horas en Buffer Tris 25 mM, ClMg 10 mM pH 7.4 Después de lavar la hormona no unida las membranas se incubaron con 0.2 mM DSS a $0 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 15 minutos y se paró la reacción por dilución con "buffer" Tris pH 7.4, se centrifugó y con el preparado de membrana resultante se realizó la electroforesis en las condiciones descritas en Materiales y Métodos. Las alícuotas sembradas fueron de 200 μg de proteína en cada uno de los canales. Los canales 2 y 6 corresponden a la incubación en presencia de 500 ng de IGF frío. Los números a la izquierda representan los PM $\times 10^{-3}$ de los marcadores utilizados en la corrida.

FIGURA 45



ESTABILIZACION COVALENTE DE LOS COMPLEJOS ^{125}I -IGF UTILIZANDO LAS MEMBRANAS DEL TUMOR HI

Autoradiografía del gel fijado y secado obtenida con 14 días de exposición. Los preparados de membrana fueron obtenidos según lo descrito en Materiales y Métodos 12. B.II. Las condiciones de trabajo fueron idénticas a las de la Figura anterior. En los canales 1 y 2 se sembraron 100 ug proteína, correspondiendo el canal 4 a la incubación en presencia de 500 ng de IGF-I frío.

TABLA 12

DETERMINACION DE RECEPTORES PARA IGF-I

TUMOR	HD ₁	HD ₂	HI
RECEPTORES DE IGF-I (fmoles/mg de proteína)			
	53.12	16.00	32.41
	41.14	22.90	54.85
	78.43	29.20	165.84
	150.02	16.89	51.95
	54.46	24.00	126.00
	129.50	25.62	76.98
	89.70		79.46
	142.97		
	74.84		
	\bar{X} = 90.46	\bar{X} = 22.43	\bar{X} = 83.92
	ES = 13.33	ES = 2.085	ES = 17.68

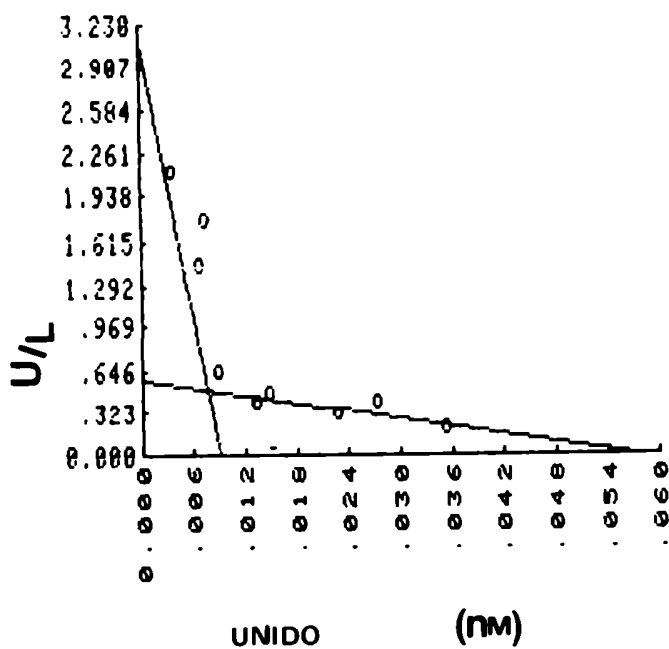
100 ug de proteína de membrana de cada una de las líneas tumorales se incubaron a 4 °C durante 16 horas con 1.58 nM ¹²⁵I-IGF-I en presencia y ausencia de 500 ng de IGF. Al aplicar el TEST de WILCOXON (328) para analizar la significación en la diferencia de los valores de receptores de IGF se obtuvo:

entre HD₁ y HD₂ P = 0.000399

entre HD₁ y HI P > 0.5

entre HD₂ y HI P = 0.001165

FIGURA 46



Representación de Scatchard de los datos de unión del IGF-I al "pool" de membranas de los tumores HD₁ y HI. Se utilizó el programa LIGAND para dos sitios de unión.

8) CARACTERIZACION ESTRUCTURAL DE LOS RECEPTORES PARA IGF-I EN LAS CELULAS TUMORALES

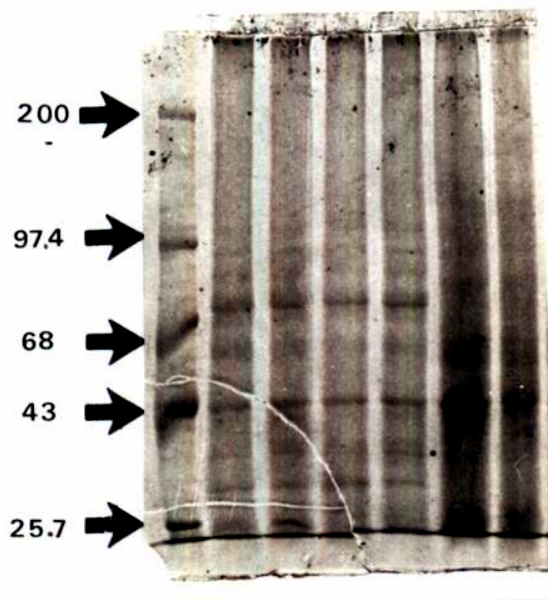
Se utilizo la metodología descrita para la estabilización covalente de los complejos ^{125}I -EGF-receptor.

La Fig 44 muestra la autoradiografía del gel secado y fijado obtenida con 14 días de exposición. Se utilizaron las membranas del tumor HI tratadas como se describió en 12 B.I.i. y 12 B.I.ii.

En la autoradiografía se observan dos tipos de bandas intensamente marcadas. Una de ellas aparece en la región de PM 130,000 Da. La especificidad de la reacción se observa en los canales 2 y 6 dado que la presencia de 500 ng de IGF-I sin marcar durante la incubación inhibe totalmente la aparición de esta banda. La otra banda de menor intensidad se presenta en la zona de PM 260,000 Da. Los canales 2 y 6 muestran una importante disminución de la intensidad de esta banda cuando se incuba en presencia de 500 ng de IGF-I frío. En la Fig 45 se observan idénticos resultados utilizando el preparado de membrana descrito en 12 B II.

En la Fig 47 se observa la tinción de proteínas con Coomassie Blue del gel correspondiente a la Fig 44.

FIGURA 47



Electroforesis correspondiente a la autoradiografía de la Fig 44. Se utilizó el sistema discontinuo de Laemmli (324). Los geles fueron del 7.5 % de poliacrilamida. Se presenta el gel teñido para proteínas con Coomassie Blue. Los marcadores de PM sembrados en el canal 1 fueron: miosina (cadena H) PM 200,000; fosforilasa B PM 97,000; albúmina sérica bovina PM 68,000; ovoalbúmina PM 43,000; quimotripsinógeno 25,700; β -lactoglobulina PM 18,400; lisozima PM 14,300.

DISCUSSION

Este trabajo comprende A) el aislamiento, purificación y caracterización de factores de transformación de neoplasias malignas humanas y B) un estudio similar en adenocarcinomas de mama murinos inducidos por MPA. Además, en este modelo experimental se analizó la síntesis de EGF e IGF-I y la presencia de receptores para estos GFs en las células que los producen. Se estudió también la influencia hormonal en la síntesis de GFs.

La mayoría de los estudios sobre TGFs de tejidos neoplásicos han sido hechos con líneas celulares tumorales, células transformadas por retrovirus o virus a DNA (8,185,188,192,228).

Sin embargo, los tumores primarios humanos no han sido estudiados intensivamente.

En este trabajo los extractos ácido-alcohólicos de seis de las siete neoplasias malignas humanas examinadas mostraron presencia de TGFs capaces de conferir el fenotipo neoplásico a las células NRK-49F, en ausencia de cualquier otro factor exógeno en el ensayo en medio semisólido de agar.

La actividad transformante de los extractos varió con cada espécimen y no se observó relación entre la histopatología del tumor y la cantidad de TGFs intracelulares.

Los tratamientos físico-químicos de los extractos crudos evidenciaron la naturaleza polipeptídica de los factores aislados y la presencia de puentes disulfuro que son necesarios para la actividad biológica de estos factores.

La purificación de los extractos ácido-alcohólicos de un carcinoma epidermoide de pulmón y de un rabdiosarcoma de pectoral, por cromatografía de exclusión molecular, mostró la presencia de TGFs similares en ambos tumores.

Las actividades transformantes de bajo PM (picos IV y V del carcinoma de pulmón y III y IV del rabdiosarcoma) no fueron potenciadas por EGF. Competieron para unirse al receptor del EGF, tuvieron actividad mitogénica sobre fibroblastos NRK arrestados en medio con 0.5% de suero y no mostraron efectos inhibitorios sobre la estimulación de DNA inducida en estas células por EGF e insulina. Dado este comportamiento, puede considerarse que éstas son actividades transformantes semejantes al TGF- α que actúan junto con el TGF- β del suero, presente en el ensayo en medio semisólido de agar, para conferir el fenotipo neoplásico a las células NRK-49F. Además, los PM del pico IV del carcinoma de pulmón y del pico III del rabdiosarcoma coinciden con el descrito para el TGF- α (209,213). El pico V del carcinoma de pulmón y el IV del rabdiosarcoma, con PM aparente de 4000 Da, pueden representar otras actividades semejantes al TGF- α o alternativamente pueden ser productos de clivaje de los picos de 6000 Da que han conservado la actividad biológica.

Los efectos de los picos I, II y III del carcinoma de pulmón y de los picos I y II del rabdiosarcoma, en los cultivos en medio semisólido y en monocapa de las células NRK-49F, son particularmente interesantes. De acuerdo a los hallazgos de Van Zoelen y col. (94,288), que hemos mencionado en la Introducción, las ac-

tividades transformantes de esos picos podrían ser agentes moduladores que actúan en combinación con mitógenos del suero, por ejemplo IGFs o PDGF, para inducir la formación de colonias de las células NRK-49F.

La falta de actividad mitogénica de estos picos sobre cultivos en monocapa de las células NRK es semejante al comportamiento descrito para el TGF- β por Assoian (234), Roberts (262) y Van Zoelen (288). Assoian también ha descrito que el TGF- β inhibe la síntesis de DNA inducida por EGF en células NRK-49F quiescentes (234). Roberts y col. (262) obtuvieron resultados semejantes con cultivos en monocapa de estas células, en presencia de suero al 2%.

En este trabajo, utilizando condiciones de máxima estimulación mitogénica de las células NRK-49F (Materiales y Métodos: Desarrollo de Métodos Experimentales para la Caracterización Biológica de TGFs), (288), hemos encontrado que los picos I, II y III del carcinoma de pulmón y los picos I y II del rhabdomyosarcoma fueron potentes inhibidores de la síntesis de DNA.

Si bien parece claro que estas actividades transformantes son distintas del TGF- β , comparten con este factor algunas de las propiedades que han demostrado que el TGF β es un regulador bifuncional de la proliferación celular (201) y que la transformación maligna también puede resultar de la falla para expresar o responder a factores inhibitorios (201). La diferencia en los pesos moleculares de estos factores, con actividades biológicas seme-

jantes, podría explicarse considerando que los TGFs con menor peso molecular resultan del clivaje de precursores o alternatively que las especies de alto PM representan una asociación con una proteína transportadora, o artificios debidos a la agregación de especies mas pequeñas.

La presencia en estas neoplasias de TGFs que pueden actuar como inductores o inhibidores de la proliferación celular indica que estas células malignas que producen factores inhibitorios, pueden ser incapaces de responder a ellos, liberándose así de los controles negativos del crecimiento. Sin embargo, esta hipótesis debe analizarse con cuidado dado que los efectos inhibitorios han sido demostrados "in vitro" y no se conoce nada de los posibles efectos "in vivo" de estos factores. Además, las células indicadoras usadas son no transformadas y se ha demostrado que las células normales y neoplásicas exhiben respuestas diferentes a los factores de transformación (4).

En ambas neoplasias malignas se han encontrado el mismo tipo de TGFs a pesar de que las células de estos tumores difieren tanto en su origen embrionario como en su tipo histológico.

Otros autores han reportado también el hallazgo de TGFs en tumores primarios humanos. Nickell y col (334) purificaron TGFs de varios carcinomas y sarcomas. Estos factores transformaron selectivamente a las células NRK-49F y AKR-2B, sin la presencia

de ningún otro factor exógeno y no compitieron por los receptores del EGF.

Derynk y col (228) describieron el hallazgo de los mRNA de TGF- α y TGF- β en una variedad de tumores sólidos.

Cuando se utilizó el modelo experimental de tumores de mama inducidos por MPA en ratones hembras de la cepa Balb/c, los resultados obtenidos en el estudio de TGFs presentaron similitudes con los hallazgos en tumores humanos.

En los extractos ácido-alcohólicos de los tipos tumorales HD₁, HD₂ y HI se observó la presencia de TGFs. En los tres casos hubo potenciación de la actividad transformante por el EGF.

Los tratamientos físico-químicos de los extractos crudos revelaron, como en el caso de los tumores humanos, que las actividades transformantes eran de naturaleza polipeptídica con presencia de puentes disulfuro, cuya destrucción resultaba en la pérdida de la actividad biológica.

La purificación de los factores y la posterior caracterización de estos TGFs por cromatografía de exclusión molecular demostró que en los tumores hormonodependientes con y sin MPA se encontraban presentes dos tipos de TGFs con distintos pesos moleculares. El primero de ellos de 43 KDa presentó las siguientes características biológicas: i) estimuló la formación de colonias de las células NRK-49F en ausencia de EGF exógeno, pero

su actividad fue potenciada por EGF, ii) no compitió por los receptores de EGF aislados de membranas de placentas humanas, iii) no presentó actividad mitogénica sobre células NRK-49F en monocapa, iv) actuó como potente inhibidor de la síntesis de DNA inducida en estas células por EGF e insulina.

Estas propiedades biológicas, con la excepción de la potenciación de la actividad transformante por el EGF son idénticas a las descritas para los TGFs de alto PM aislados de los tumores humanos.

El pico de 43 KDa no se observó en el tumor HI.

El otro tipo de actividad transformante, presente en los tres tipos tumorales, eluyó en la zona de PM 13.5 KDa en la columna de Bio-Gel. Sus propiedades biológicas fueron: i) estimuló la transformación fenotípica de las células NRK sólo en presencia de EGF, ii) no compitió por los receptores del EGF, iii) no fue mitogénico sobre células NRK-49F en monocapa y iv) inhibió la síntesis de DNA inducida por EGF e insulina en estas células.

Todas estas propiedades biológicas son idénticas a las descritas para el TGF- β (234,235,236), incluso la elución anómala en las columnas de Bio-Gel P-60, producida probablemente por interacción con la matriz.

La posterior purificación de estos factores utilizando HPLC en columnas de interacción hidrofóbica, un método original que

hemos desarrollado para el TGF- β de plaquetas humanas, demostró que ninguno de ellos eluía en la región del TGF- β de plaquetas.

Además, los estudios de las propiedades inmunológicas de los TGFs de 13 y 43 KDa permitieron establecer que no tenían identidad con los TGF- β_1 o TGF- β_2 .

Por lo tanto, nuevamente en estos tumores experimentales, tanto como en los humanos, están presentes TGFs que si bien se asemejan por sus propiedades biológicas al TGF- β son diferentes de este factor.

Debe considerarse que se purificaron en la columna de Bio-Gel P-60 las mismas cantidades de proteína (100 mg) de cada extracto ácido-alcohólico, se colectaron idénticas fracciones y las alícuotas utilizadas para los ensayos de transformación fueron las mismas. De acuerdo a los actuales conocimientos, los ensayos de formación de colonias de células NRK-49F en presencia de 2 ng/ml de EGF permiten cuantificar al TGF- β (194). Por lo tanto, se utilizó este criterio como una aproximación para la cuantificación de la actividad transformante del pico de 43 Kda.

Se observa así, que hay una significativa disminución de la síntesis de este factor en el tumor HD₂ respecto del HD₁.

Estos resultados junto con la ausencia de este pico en el tumor HI, sugieren que podría tratarse de un factor inhibitorio de la proliferación de las células malignas "in vivo".

La síntesis de este regulador negativo del crecimiento

celular se ha perdido en el tumor HI de crecimiento autónomo.

Este mecanismo podría contribuir entonces a la ventaja proliferativa de las células neoplásicas.

Los trabajos de Lippman y Dickson han aportado evidencias experimentales que apoyan esta hipótesis (272). Ellos han trabajado con la línea MCF-7 de células epiteliales de cáncer de mama humano, cuyo crecimiento "in vitro" y tumorigénesis "in vivo" se encuentran bajo regulación hormonal. Estos autores han encontrado que las células MCF-7 liberan al medio de cultivo TGF- β biológicamente activo que compete para unirse a los receptores del TGF- β y es reconocido e inactivado por anticuerpos anti-TGF- β . Cuando fraccionaron el medio condicionado en columnas de Bio-Gel P-150 encontraron dos picos con las características biológicas del TGF- β ; uno de ellos de PM aproximado 50 KDa y el otro en la zona donde eluye el TGF- β de plaquetas (13.5 Kda). En este trabajo se sugiere que la especie de bajo PM corresponde al dímero maduro de 112 aa del TGF- β , mientras que la especie de alto PM podría representar una asociación no covalente con una proteína transportadora secretada por las células MCF-7. Esto no afecta sin embargo la actividad biológica del factor.

En el caso de nuestros hallazgos la diferencia en una de las propiedades biológicas de los TGFs de alto y bajo PM (la inducción de la transformación fenotípica de NRK, en ausencia de EGF, del TGF de 43 KDa) hace difícil pensar que los distintos PM se

deban simplemente a la asociación con una proteína transportadora.

Además, también en la purificación por HPLC ambos factores eluyen en distintas concentraciones de acetato de amonio, lo cual es una evidencia más de que los TGFs que hemos aislado son distintas especies.

En este mismo trabajo Lippman y Dickson también encontraron que la secreción de TGF- β aumentaba de 8 a 27 veces cuando se trataba a las células con antiestrógenos en concentraciones que resultaban inhibitorias del crecimiento.

Por otra parte, el estudio de la variante LY-2 de las MCF-7, que es resistente a los antiestrógenos, demostró que éstos no aumentaban los niveles de TGF- β en aquellas células.

También en este modelo, donde el crecimiento de las MCF-7 es estimulado por E₂, los autores estudiaron el mecanismo de regulación de la síntesis de TGF- β . Obtuvieron evidencias de que la inducción del TGF- β está mediada por la interacción de los antiestrógenos con el receptor del estradiol. Además, demostraron que la regulación del TGF- β no se produce a nivel del mRNA.

Por otra parte, de acuerdo a los hallazgos que hemos mencionado en la Introducción, muchos tipos celulares secretan TGF- β en una forma latente que requiere acidificación para su activación (201).

Así, Lippman y Dickson encontraron que el aumento de 12 a 13 veces en los niveles de TGF- β activo, en el ensayo radioligando-

receptor, producido por los antiestrogénos, se debía a un incremento de 3 a 4 veces en el total de especies secretadas y también a un aumento de 3 a 4 veces en la fracción del total intrínsecamente biológicamente activo.

En este mismo trabajo los autores estudiaron el efecto del TGF- β sobre el crecimiento de líneas celulares de tumor de mama. Las líneas MDA-MB 231, altamente tumorigénica y sin receptores para estrógenos y LY-2 resultaron inhibidas en su crecimiento por el TGF- β . Finalmente, en experimentos de cocultivo demostraron que el TGF- β inducido por antiestrogénos en las MCF-7 inhibía la proliferación de las células MDA-MB 231.

En conclusión, todos estos hallazgos, junto con los de Roberts y col. (262) que establecieron que el TGF- β inhibe el desarrollo de colonias de líneas celulares tumorales provenientes de carcinomas, sarcomas y melanomas, sugieren que el TGF- β actúa como un regulador autocrino negativo de la proliferación de células epiteliales.

El otro pico de 13 Kda que se encuentra en los tres tipos tumorales presenta aun mayores semejanzas en sus características biológicas "in vitro" con las del TGF- β . Sin duda, la falta de reconocimiento por anticuerpos anti TGF- β y la diferente elución en las columnas de HPLC lo diferencian de este último factor.

Con la aproximación cuantitativa empleada para el pico de 43 Kda, observamos que los niveles del TGF de 13 Kda son semejantes

en los tumores HD₁ y HI, encontrándose disminuido en el HD₂.

Podría considerarse así que éste es nuevamente un factor inhibitorio cuya síntesis es anulada por el MPA. Esto está de acuerdo con lo que sucede con las células MCF-7 donde el E₂ inhibe la síntesis de TGF-β. Sin embargo, quedaría aun por explicar porqué en el tumor autónomo (HI) este TGF tiene niveles semejantes a los del tumor HD₁.

Una posible respuesta sería que si bien el tumor HI no ha perdido la capacidad de sintetizar esta actividad inhibitoria no es capaz ya de responder a la misma.

Este, es un mecanismo de transformación maligna ampliamente postulado. En distintos trabajos se trataron células normales de mama humana con agentes químicos para inmortalizarlas y luego se transfectaron secuencialmente con una serie de oncogenes (287, 335, 336, 337). De esta forma, se imitó el proceso en etapas del desarrollo maligno. Los hallazgos fueron sorprendentes: las células normales, las inmortalizadas y las progresivamente transformadas producían TGF-β y tenían receptores para éste. Sin embargo, presentaban una pérdida progresiva de la respuesta al TGF-β.

Las causas de esta pérdida no se conocen aun, pero se ha postulado que la deficiencia se produce probablemente después de que el TGF-β se une a su receptor, tanto en la transmisión de la señal del TGF-β al interior de la célula, como en los elementos celulares que producen la respuesta.

En nuestro modelo , la ventaja proliferativa del tumor HD₂ estaría dada porque el MPA inhibe la síntesis de un posible factor autocrino negativo. En el HI, que ya no necesita la presencia de MPA para proliferar este TGF regulador negativo, sigue sintetizándose.

Sin embargo, las células HI, que han evolucionado una etapa mas alla en el proceso de malignización, han perdido la capacidad de respuesta a este factor.

Por otra parte, la semejanza entre las características biológicas de los TGFs de 13 y 43 Kda con el TGF- β hacen necesario considerar posibles funciones paracrinas de este último factor en el proceso de transformación maligna. Estas, podrían ser ejercidas también por los dos TGFs aislados.

En efecto, el TGF- β estaría involucrado en la estimulación de la proliferación de fibroblastos alrededor del tumor y la infiltración de vasos sanguíneos en la masa tumoral (194,199,276, 277,278). De esta forma, podría ser responsable junto con otros GFs secretados por las células neoplásicas, tales como el PDGF, de la intensa proliferación del estroma que rodea en forma característica a los carcinomas de mama.

Además, los estudios de Roberts y col (277) que han demostrado que el TGF- β induce angiogénesis "in vivo" son una evidencia en favor de una de las funciones paracrinas potencialmente mas importantes de este factor.

Sin duda, la infiltración de vasos sanguíneos en la masa

tumoral es un evento indispensable para el desarrollo de las neoplasias sólidas.

Estos efectos paracrinos del TGF- β , inductores de la proliferación celular, son opuestos a su acción autocrina negativa sobre células epiteliales malignas.

La complejidad de las actividades de TGF- β requerirá sin duda muchos mas estudios para determinar cuál es su real participación en el desarrollo tumoral.

Finalmente, hemos comparado los TGFs aislados de los tumores da mama con el TGF- β dado que las importantes semejanzas en sus actividades biológicas nos hacen pensar que estos TGFs de 13 y 43 Kda pertenecen a la familia de factores de transformación relacionada con el TGF- β (250,251,252).

Apoyan nuestra hipótesis los hallazgos de Massagué (249) quien ha sugerido que una de las formas de regular la respuesta de las células al TGF- β podría ser a través de la presencia de múltiples formas del factor y de receptores con afinidades diferenciales.

Por otra parte, tal como se describió en la Introducción, se han identificado varios factores de transformación diferentes a los TGF- α y TGF- β pero que poseen propiedades biológicas semejantes a las de alguno de estos dos últimos factores (288, 203, 204)

Entre ellos, se encuentran el TGF extraído por Halper y Moses

(205) de tejido epitelial (al igual que los TGFs de 13 y 43 Kda descritos en este trabajo).

Los resultados obtenidos en la investigación de la presencia de EGF en los tumores experimentales, demostraron claramente que en los tres tipos tumorales se encuentra presente el EGF maduro de 6000 Da.

Este resultado concuerda con evidencias experimentales en favor de un rol autocrino positivo del EGF en el desarrollo neoplásico, particularmente en los tumores de mama (338).

El mayor interés de nuestros resultados reside en que este es el primer trabajo donde se demuestra la presencia de EGF completamente procesado (6000 Da) en tumores de mama.

Los hallazgos recientes de Murphy y col. (339) sin duda son los mas próximos a nuestros resultados experimentales.

Estos autores utilizaron una sonda de cDNA para el precursor del EGF humano, con el objeto de analizar la expresión del gen del EGF en líneas celulares de tumores de mama humanos. Demostraron así que las líneas con receptores para estrógenos, T-47D y ZR 75 presentan altos niveles del mRNA del EGF. Las líneas BT 20 y MDA MB 231, sin receptores de estrógenos, tienen muy bajos niveles del mRNA del EGF. Sin embargo, no todas las líneas con receptores estrogénicos expresaron el gen del EGF, dado que en

las células MCF-7 no se detectó el mRNA del EGF.

Murphy y col. investigaron luego cuáles eran los productos de traducción del gen del EGF en las células T-47D. Encontraron que en el medio condicionado de estas células estaba presente una actividad capaz de competir por los receptores de EGF. Sin embargo, los resultados que obtuvieron utilizando un radioinmunoensayo específico para el EGF sugurieron que el factor presente no era el péptido maduro de 6000 Da. Además, los estudios de inmunoprecipitación y SDS-PAGE del medio condicionado de las células T-47D y de lisados de estas células, utilizando 3 anticuerpos anti-EGF, demostraron que en el medio condicionado la banda de proteína mas importante aparecía en la zona de PM 40,000 Da. Con dos de los anticuerpos se observaba que otra proteína menos abundante de PM 18,000 era también inmunoprecipitada. El precursor del EGF de 133,000 Da o el péptido maduro no pudieron detectarse. No se logró inmunoprecipitar ninguna proteína en el lisado celular. Además, el análisis del DNA de las líneas de cáncer de mama humano MCF-7, T-47D, HBL-100, BT-20 y MDA MB 231 demostró que en ninguna de ellas había amplificación del gen del EGF.

La especificidad de la metodología empleada en nuestro trabajo permite afimar que el EGF detectado en los tumores inducidos por MPA es el polipéptido maduro de 6000 Da.

A diferencia de los estudios de Murphy nosotros hemos detectado la presencia de EGF intracelular en las células neoplásicas.

La respuesta de las células epiteliales malignas de mama al EGF han sido investigada por distintos grupos.

Kurachi y col. (338) han sugerido que el EGF está involucrado en el desarrollo de tumores mamarios murinos.

Las líneas celulares de cáncer de mama humano han demostrado distintas respuestas al EGF. Así Osborne y col. (340) han demostrado que el EGF induce la proliferación de las células MCF-7 en medio libre de suero. En este mismo trabajo no se observó efecto estimulador sobre la línea MDA-MB 231. Fitzpatrick y col (341) obtuvieron también efectos inductores del crecimiento en las células MCF-7 y T-47D. Las líneas MDA-MB 231 y ZR-75-1 no respondieron al EGF. Imai y col (342) observaron una importante estimulación de las células T-47D por EGF, mientras que el crecimiento de otras líneas no fue inducido por el factor.

Además, se ha demostrado que líneas celulares de cáncer de mama humano secretan factores de transformación.

Así, en el medio condicionado de las células MCF-7 Lippman y col. han determinado la presencia de una actividad transformante de las células NRK-49F y AKR-2B (343,344). Este factor estimula además la proliferación de las mismas células MCF-7 y de fibroblastos 3T3 y compete para unirse a los receptores del EGF. La purificación del medio condicionado ha demostrado que el TGF aislado tiene un PM aparente de 30 KDa. Todas estas características indican que este factor está relacionado con el TGF- α , si

bien tiene un PM significativamente mayor que el TGF- α clonado y secuenciado de fibroblastos transformados (213,217,218). No se conoce si este factor está relacionado con el precursor del TGF- α de 17-19 Kda. Lippman y col. sugieren que el aumento del PM puede deberse a i) modificaciones por glicosilación, ii) que se trata del producto de un procesamiento alternativo del mRNA o iii) es un nuevo gen relacionado con el TGF- α . Salomon y col. (345) estudiaron también la línea MCF-7 y encontraron una actividad transformante con las mismas características que el TGF descrito por Lippman y su grupo.

De acuerdo en lo mencionado en la Introducción Derynk y col. han encontrado el mRNA de 4.8 Kb del TGF- α en células MCF-7 y en otras líneas de cáncer de mama humano (228).

Nuestros resultados en los estudios del EGF demostraron también que la síntesis de este factor es inducida por MPA.

En efecto, el tumor HD tratado con MPA presentó un aumento significativo en el nivel de EGF respecto del tumor HD sin MPA.

La cantidad de EGF en el tumor HI es semejante a la del HD₂ y también superior al tumor HD₁.

La estimulación de la síntesis del EGF por el MPA, podría ser uno de los mecanismos por los cuales esta hormona induce el desarrollo de neoplasias de mama en las hembras Balb/c.

Respecto de la progesterona, debe mencionarse que si bien se

acepta que las hormonas fundamentales en el desarrollo de los tumores mamarios son los estrógenos y la prolactina, hay diversas evidencias que sugieren que los progestágenos tendrían también una importante función (346). Se ha demostrado que la administración de progestágenos puede tanto aumentar como disminuir la inducción de la carcinogénesis química en ratas. Este efecto depende del momento de la administración de los progestágenos y de la duración del tratamiento, respecto de la administración del carcinógeno (347)

Manni y col. (303) han trabajado con tumores mamarios inducidos en ratas por N-nitrosometilurea. Así, han demostrado que tanto la progesterona como el R5020 estimulaban el desarrollo de colonias en agar de estas células tumorales cuando estaban presentes en concentraciones entre 10 y 100 nM. En altas concentraciones resultaban en cambio inhibitorios. La administración combinada de estradiol y progesterona resultó en la potenciación de la formación de colonias, respecto de la observada con los tratamientos individuales, cuando la progesterona estaba presente en bajas concentraciones y una inhibición cuando las concentraciones eran altas. Los autores sugirieron así que la progesterona podría tener un efecto bifásico en el crecimiento celular. Se conoce además que la administración de altas dosis de progestágenos induce regresión en un alto porcentaje de tumores de mama humanos con receptores para estrógenos (348). Sin embargo, Dao y col. (349) han demostrado que dosis fisiológicas de progesterona, cuando se suministran con pequeñas cantidades de estróge-

nos, aumentan el índice de marcación con timidina aún en tumores que no tienen receptores para estrógenos.

En ratones se ha postulado que las hormonas son necesarias fundamentalmente para la fase de inducción de los tumores de mama, dado que en la mayoría de las cepas éstos se transforman en hormonoindependientes. (350). Sin embargo, hay unos pocos modelos experimentales en los cuales los tumores mantienen su hormonodependencia. Sluyser y col. (346) han caracterizado los tumores de mama inducidos por estrógenos y progesterona en ratas GR y demostraron que su crecimiento se mantiene si se suministran ambas hormonas. Además Watson y col. (351) han descrito un modelo en el cual la administración de uretano a ratones C57b1/DBA2 F1, que llevan un trasplante hipofisario en la cápsula renal, provoca la aparición de adenocarcinomas de mama. Estos tumores, similares a los descritos aquí, son de tipo ductal, poseen receptores para estrógenos y se mantienen estrógeno dependientes en pasajes sucesivos. Estos autores han postulado que dosis fisiológicas de progesterona aumentan la proliferación de los tumores.

En nuestro modelo tumoral ha sido posible demostrar no solo que el MPA es capaz de inducir tumores de mama, si no que también es capaz de promover el crecimiento de estos tumores en sucesivos trasplantes.

El hallazgo de la inducción del EGF por MPA concuerda con

los estudios de Murphy y col. (339), que demostraron que los niveles del mRNA del EGF en las células T-47D aumentaban significativamente al tratar las células con concentraciones de MPA tan pequeñas como 0.1 nM. Un efecto semejante se produjo en las células ZR-75.

Sin embargo, el modelo con el que trabajaron estos autores es completamente distinto al utilizado en nuestro trabajo. En efecto, las concentraciones de progestágenos que inducen la expresión del EGF son inhibitorias de la proliferación de las células T-47D. Murphy y col. postulan así dos posibles explicaciones: A) la expresión del gen del EGF, que codifica para un factor posiblemente estimulador del crecimiento celular, es un mecanismo de defensa de las células contra la inhibición de la proliferación ejercida por el MPA y B) el EGF tiene un efecto antiproliferativo sobre las células T-47D. Esta hipótesis es sin embargo difícil de sostener dado que como hemos mencionado sobre este tipo celular varios autores ha demostrado que el EGF es mitogénico. Murphy y col, basándose en el hallazgo que hemos comentado anteriormente que las células T-47D sintetizan y secretan proteínas relacionadas inmunológicamente con el EGF pero de alto PM, han postulado que probablemente éstas tengan propiedades biológicas diferentes a las del péptido maduro.

Sin duda nuestro modelo experimental se asemeja más a los hallazgos de Lippman y col. (343,344,352) que ya hemos descrito. Este grupo encontró que la síntesis de la actividad transformante

de 30 Kda semejante al TGF- α era estimulada por estradiol el cual es mitogénico para estas células. Postularon así que factores semejantes al EGF actuando en forma autocrina positiva contribuyen a la ventaja proliferativa de las células malignas.

Del mismo modo nosotros pensamos que la inducción de la síntesis de EGF causada por el MPA es uno de los mecanismos por los cuales esta hormona estimula el crecimiento tumoral.

El estudio de receptores de EGF demostró que éstos se encuentran presentes en los tumores HD₁ y HI siendo su número semejante en ambos tipos tumorales. Por el contrario, se observó una significativa disminución en los niveles del receptor en los tumores HD₂.

Las condiciones experimentales, que incluyeron el tratamiento de las membranas con "buffer" de pH 3, nos permitieron determinar que la disminución en el número de receptores para EGF en el tumor HD₂ no se debía a la ocupación de los mismos por el ligando endógeno.

La caracterización estructural de los receptores, utilizando reactivos de entrecruzamiento, demostró que el receptor presente en los tumores es la especie de 170,000 Da descrita en una gran variedad de tipos celulares (93,107,108,109).

Como hemos mencionado anteriormente, los niveles de EGF en el tumor HD₂, son significativamente superiores a los de los

otros dos tumores.

Por esto pensamos que este aumento en la síntesis de EGF, estimulado por MPA, en las células del tumor HD₂ tiene una participación fundamental en la regulación de i) el número de receptores de superficie de EGF en las células del tumor HD₂. ii) la activación del receptor, iii) las señales intracelulares producidas por la activación del receptor iv) el proceso de internalización y degradación en los lisosomas de complejo Receptor-EGF.

Sin duda, este fenómeno de disminución del número de receptores de superficie ejercido por el ligando, es semejante al proceso de "down regulation" descrito para diversas hormonas y factores de crecimiento, entre ellos el propio EGF (111).

Pero es muy importante aclarar que hay diferencias fundamentales entre la implicancia biológica de la "down regulation" y el fenómeno que nosotros observamos en nuestro sistema.

En efecto, "down regulation" indica que la célula que ha sufrido una disminución de los receptores para un determinado ligando, inducida por el propio ligando, pierde sensibilidad para éste. Así, la hormona o GF no puede ejercer su efecto biológico a través de la unión con receptores de superficie.

En cambio, las evidencias experimentales obtenidas con los tumores estudiados sugieren que i) la ventaja proliferativa del tumor HD₂ respecto de HD₁ está dada por la estimulación del MPA, ii) la hormona es la responsable del aumento en los niveles de

EGF observado en el tumor HD₂ respecto del HD₁, iii) el EGF sería así un factor autocrino positivo en las células neoplásicas iv) el aumento en el nivel del EGF en el tumor HD₂ sería el responsable de la disminución del número de receptores de superficie para este factor, v) este fenómeno sería distinto de la "down regulation", porque no implica una falta de respuesta de las células al EGF, si no por el contrario las células HD₂ seguirían respondiendo al factor y posiblemente con mayor sensibilidad que las células de los otros tumores.

En favor de un mecanismo como el propuesto existen evidencias obtenidas por distintos grupos.

En 1982 Osborne y col. (353) publicaron el primer trabajo donde se demostró la presencia de receptores de alta afinidad para el EGF en células de cáncer de mama humano. Ellos demostraron que las células MCF-7 poseían receptores específicos de EGF. El gráfico de Scatchard fue curvilíneo, lo que sugirió la existencia de dos sitios con distinta afinidad y se detectaron aproximadamente entre 25,000 y 50,000 sitios/célula. Además, el EGF indujo "down regulation" de sus receptores. Tal como hemos mencionado en esta línea EGF es un potente mitógeno.

En 1984 Fitzpatrick y col. (341) estudiaron los receptores de EGF en 137 tumores de mama humanos. Encontraron que en aproximadamente el 48 % de los tumores había receptores de EGF. El análisis de Scatchard de los datos de unión utilizando un "pool" de membranas demostraron la existencia de un solo sitio

siendo $Q = 28$ fmoles/mg de proteína de membrana y $K_d = 2$ nM.

Un trabajo reciente de Davidson y col (354) presenta resultados semejantes a los que hemos encontrado en nuestro sistema.

En efecto, ellos encontraron que las líneas con receptores para estrógenos, MCF-7, T-47D y ZR-75-1 presentan un nivel bajo de receptores para EGF y su crecimiento "in vitro" es estimulado por el EGF. Por el contrario, las líneas sin receptores estrogénicos MDA-MB-231, Hs578T, EVSA-T y BT-20 contienen un alto número de receptores para EGF y su crecimiento "in vitro" no es estimulado por el EGF. La regulación de la expresión de los receptores del EGF se ejerce a nivel transcripcional.

La relación inversa entre el número de receptores del EGF y la capacidad de este factor de estimular la proliferación se encontró también en la línea de carcinoma epidermoide A-431, en otras líneas también de carcinomas epidermoides y en las células de cáncer de mama MDA-MB-468 (341,354).

Actualmente no hay explicación sobre porqué el EGF actúa como un potente mitógeno en células en las que se observan bajos niveles de sus receptores y por el contrario no tiene efecto o inhibe el desarrollo de aquellas en las cuales hay alto contenido de receptores.

Sin embargo, los trabajos citados y nuestras observaciones con el tumor HD₂ indican que éste es un fenómeno que se produce en distintos tipos celulares.

Nuestros resultados indican que el tumor HD₁ presenta altos niveles de receptores para estrógenos, progesterona y EGF, el HD₂ mantiene los niveles de receptores estrogénicos y de progesterona y ha disminuído significativamente el contenido de receptores para EGF. En el tumor HI el número de receptores de estrógenos y progesterona es muy bajo, observándose altos niveles de receptor de EGF.

Estos hallazgos concuerdan con lo descrito por otros autores y son por otra parte una evidencia mas en favor de la hipótesis que hemos propuesto de la posible participación del EGF como un factor autocrino positivo en las células de los tumores de mama inducidos por MPA.

Los resultados de Fitzpatrick y col. (341) que mencionamos anteriormente, con tumores de mama humanos, demostraron que no había una significativa asociación entre los valores de los EGF-R y los de E-R o PG-R, con lo cual demostraron que el EGF-R no es un marcador de E-R, como ha sido propuesto para el PG-R. Ellos encontraron que el 20 % de los tumores sin E-R, presentaban altos niveles de EGF-R, sugiriendo así que este tipo de tumores puede representar una clase de células de cáncer de mama en las cuales el crecimiento está regulado por el EGF y no por estrógenos.

Resultados semejantes, respecto de una significativa relación inversa entre la presencia de receptores para EGF y estrógenos en tumores de mama humanos, han sido obtenidos por otros grupos utilizando técnicas de radioligando-receptor o inmunohis-

toquímicas (352).

En el trabajo de Davidson y col. (354) que comentamos antes se demostró en siete líneas celulares de carcinomas de mama humanos una relación inversa entre los E-R y EGF-R.

Por otra parte, Vickers y col.(355) estudiando la variante de la línea MCF-7 resistente a adriamicina MCF-7/Adr^r, que presenta el fenotipo de resistencia a múltiples drogas (MDR), encontraron que estas células habían perdido los receptores de estrógenos y progesterona y presentaban un aumento de 100 veces en el contenido de EGF-R. Observaron además que el aumento de los receptores de EGF en esta línea resistente a las drogas está relacionado con una disminución de la respuesta de las células al efecto mitogénico del EGF.

Finalmente, en un trabajo de 1986 Murphy y col. (356) encontraron que en las células T-47D, en las cuales los progestágenos son inhibitorios del crecimiento celular, hay una inducción del EGF-R por el PG-R.

En nuestro modelo experimental en el tumor hormonodependiente sin MPA están presentes E-R, PG-R y EGFR. Podía esperarse un resultado como éste considerando que es la neoplasia de mas lento desarrollo y por lo tanto aquella en la cual las células tumorales se mantienen mas proximas a la regulación por los agentes que actúan en el ciclo celular normal.

Actualmente, no se conocen con exactitud los factores que participan en el control del crecimiento y la diferenciación de la glándula mamaria normal. Sin embargo, distintos hallazgos

indican que estos procesos dependen de la interacción de múltiples hormonas: estrógenos, progesterona, glucocorticoides y prolactina y de factores de crecimiento entre los cuales sin duda el más firmemente postulado es el EGF.

Se conoce que el EGF tiene potentes efectos inductores de la proliferación de las células mamarias epiteliales de origen humano y murino (82,92,93). Si bien no está claro cuál es el rol de este factor en el crecimiento y diferenciación de la glándula mamaria muchos estudios han proporcionado evidencias de un rol fisiológico normal del EGF (357)

En el tumor HD tratado con MPA se mantiene la presencia de E-R y PG-R pero hay una disminución significativa de los receptores de EGF. Este resultado es concordante con los resultados ya mencionados de otros grupos (354,356).

Finalmente, el tumor de más rápido desarrollo, el HI ha perdido los receptores de estrógenos y progesterona y presenta en cambio altos niveles de EGF-R. Esto sugiere que i) el tumor se ha independizado de la acción inductora de la proliferación del MPA porque probablemente otros factores son los responsables de la estimulación, pudiendo encontrarse entre estos el EGF actuando por un mecanismo autocrino.

Los resultados que hemos obtenido en el estudio del IGF-I presentan similitudes con los del EGF.

Así, se ha observado la síntesis de este factor por las

células de los tres tipos de tumores.

Nuevamente, se ha determinado un significativo aumento en la cantidad de IGF-I producida por las células del tumor HD₂ respecto del HD₁. El contenido de este factor en el tumor HI es semejante al del HD₂ y superior al del HD₁.

Estas evidencias indican una posible estimulación de la síntesis de IGF-I por el MPA.

La secreción de IGF-I por células de cáncer de mama ha sido claramente demostrada. En efecto, todas las líneas de tumores mamarios humanos examinadas hasta el momento, presentan IGF-I en sus medios condicionados, detectado por el radioinmunoensayo específico (358).

Realizando una extracción ácido-alcohólica del medio condicionado de las células MCF-7 y purificando el material encontrado se demostró que éste migra junto con IGF-I del suero (353,358).

Cuando estaba presente el rojo fenol en el medio de cultivo de estas células no se pudo observar una inducción por E₂ de la síntesis de IGF-I. En cambio, la eliminación de este indicador de pH del medio de cultivo ha permitido establecer que los estrógenos estimulan de 2 a 3 veces la producción de IGF-I (358). También, la insulina determinó un aumento semejante en los niveles de este factor.

Recientemente, se ha demostrado que el EGF y TGF- α son capaces de inducir la síntesis de IGF-I en las células MCF-7 (359).

Por otra parte, los antiestrogénos, el TGF- β y los glucocorticoides inhiben la secreción de IGF-I (359). En todos los casos los efectos sobre la síntesis del IGF-I precedieron a los efectos de los distintos agentes sobre la proliferación celular.

Hasta el momento, no se conoce cuál es la participación del IGF-I en el proceso de transformación maligna de las células epiteliales mamarias. Sin embargo, dado los hallazgos mencionados se piensa que podría tratarse, al igual que el EGF, de un factor autocrino positivo en estas células neoplásicas.

Es interesante mencionar que dos líneas altamente malignas y sin receptores para estrógenos secretan grandes cantidades de IGF-I pero no presentan respuesta al IGF-I exógeno (360).

Respecto de los receptores del IGF-I, los hallazgos obtenidos en nuestro trabajo, son también semejantes a lo demostrado para el EGF.

En efecto los tumores HD₁ y HI presentan receptores para el factor y en el HD₂ se observó una significativa disminución en el contenido de receptores.

Podrían postularse así hipótesis similares a las que detallamos para el EGF para explicar estos resultados.

Los niveles de receptores de IGF-I en líneas celulares de tumores mamarios y en tumores de mama humanos no han sido tan estudiados como los del EGF. Sin embargo, se ha reportado, utilizando reactivos de entrecruzamiento, la presencia de IGF-I-R en células de cáncer de mama humano. Estos receptores poseen las

características estructurales descritas en otros tipos celulares (361).

Debe considerarse que la presencia de proteínas transportadoras de IGF-I (IGF-BP) en muchos tipos celulares ha sido una de las principales dificultades en los estudios de la unión del IGF-I a sus receptores (329,330,331). Estas proteínas se unen al IGF-I con tal afinidad que interfieren en la interpretación de los datos de los ensayos radioligando-receptor. Las IGF-BP constituyen una familia de péptidos heterogéneos que unen IGF-I e IGF-II.

Se han caracterizado diversas especies de acuerdo a su PM, su afinidad por los IGFs y sus propiedades inmunológicas (329,330, 331,332)

Los tumores HD₁, HD₂ y HI sintetizan una proteína transportadora de IGF-I de PM aproximado 43 KDa. La función de esta proteína no se conoce hasta el momento.

IGFs estarían involucrados también en mecanismos autocrinos de estimulación de la proliferación celular normal. En efecto, se conoce que las células hepáticas producen IGFs y poseen altos niveles de receptores (362). Por lo tanto, es posible que simultáneamente los IGFs y sus receptores estén presentes en la misma vesícula intracelular.

Así, es necesario que el receptor esté protegido contra el ligando intracelular. Los hallazgos recientes de Barenton y col. (329) indican que esta protección sería proporcionada por las IGF-BP.

También, ha sido propuesto un mecanismo autocrino/paracrino de regulación de la acción de IGFs por sus proteínas transportadoras. De esta forma, la respuesta final de las células a los IGFs dependería del balance entre las concentraciones de estos factores y las IGF-BP en el microambiente celular (329,330).

Los estudios radioligando-receptor de IGF-I en el "pool" de las membranas de los tumores HD₁ y HI indicaron la presencia de sitios de alta afinidad ($K_d = 3.4 \times 10^{-12}$ M, $Q = 22.5$ fmoles/mg) y sitios de baja afinidad ($K_d = 1.3 \times 10^{-10}$ M, $Q = 143.7$ fmoles/mg).

La caracterización estructural de estos receptores demostró la presencia de dos bandas intensamente marcadas en las autoradiografías. Las experiencias fueron realizadas en presencia del agente reductor β -mercaptoetanol. En estas condiciones, la banda más intensa apareció en la zona de PM 130,000 Da coincidiendo con la descrito para membranas de placenta humana y de fibroblastos de piel humana. Se ha demostrado que en condiciones no reductoras la banda desaparece, observándose una intensa marcación en el rango de PM 350,000-290,000 (142). Las características de este tipo de componente de membrana, estabilizado covalentemente con el IGF-I, coinciden con las que hemos descrito en la Introducción para el receptor de la insulina y de IGF-I. En efecto, se trataría de la subunidad α de este receptor, que contiene el sitio de unión del factor (142).

El segundo tipo de componente de membrana marcado, aunque

menos intensamente, aparece en las autoradiografías en la zona de PM 260,000. Esta banda ha sido descripta en numerosos tejidos (142) y en condiciones no reductoras se localiza en el rango de PM 214,000-234,000 Da. El aumento de PM observado con la presencia de agentes reductores se debe probablemente a la ruptura de puentes disulfuro intracatenarios y es un fenómeno que ha sido descripto para distintas proteínas (139,142). Se considera que este tipo de componente de membrana es el receptor con alta afinidad para IGF-II (139,142).

Finalmente, hemos observado la misma relación entre la presencia de receptores para estrógenos, progesterona e IGF-I.

Es decir, el tumor HD₁ presenta altos niveles de receptores para estas dos hormonas y para el IGF-I. Nuevamente y dado que se considera que el IGF-I posee una función fisiológica en la proliferación celular normal es posible considerar que la presencia de estos tres receptores sea el reflejo de la conservación en estas células de algunos de los mecanismos regulatorios normales.

La relación inversa que hemos demostrado, entre la presencia de receptores para estrógenos e IGF-I, es un hallazgo novedoso. Un fenómeno como éste en tumores de mama humanos sería una evidencia mas en favor de la hipótesis que postula que en los tumores E-R negativos la proliferación estaría regulada factores de crecimiento polipeptídicos y no por hormonas esteroideas.

El tumor HI, donde se ha perdido la síntesis de E-R y PG-R, es una evidencia también en favor de esta hipótesis. En efecto, la proliferación autónoma de este tumor podría deberse al efecto autocrino positivo de EGF e IGF-I.

CONCLUSIONES

En este trabajo se han estudiado factores de crecimiento (GFs) y transformación (TGFs) en neoplasias malignas humanas y en un modelo experimental: tumores de mama inducidos por acetato de medroxiprogesterona (MPA) en hembras vírgenes de la cepa Balb/c. En este modelo se trabajó con líneas de tumores hormonodependientes (HD₁), hormonodependientes tratados con MPA (HD₂) y hormonoindependientes (HI).

En las neoplasias humanas se encontraron TGFs, en distintos rangos de PM, que por sus características biológicas son semejantes al TGF- β . También se hallaron TGFs similares al TGF- α con un PM que corresponde al de este factor.

Ambos tipos de factores de transformación estuvieron presentes en tumores de distinto origen embriológico y tipo histológico.

En los tumores de mama inducidos por MPA se encontraron dos tipos de TGFs uno de ellos de PM 43 y el otro 13 Kda.

El comportamiento biológico de ambos presentó similitudes con el TGF- β , si bien se demostró que no tienen identidad inmunológica con el TGF- β_1 o TGF- β_2 .

EL factor de 43 Kda se aisló en las líneas HD₁ y HD₂, no observándose su síntesis en la HI.

Además, sus niveles disminuyeron en el tumor HD₂ respecto del HD₁.

Postulamos así, que este TGF de 43 Kda podría actuar

vivo" como un inhibidor de la proliferación celular, cuya síntesis se ha perdido en el tumor HI, de crecimiento autónomo.

El TGF de 13 Kda tiene las mismas propiedades biológicas que el TGF- β e incluso se comporta en la misma forma que éste en la elución en columnas de Bio-Gel. Sin embargo, se localiza en otra zona del gradiente de acetato de amonio en la purificación por HPLC.

Sus niveles son semejantes en los tumores HD y HI observándose una disminución en el HD₂.

Podría considerarse que éste es nuevamente un regulador negativo de la proliferación celular, cuya síntesis es inhibida por el MPA. En el caso del tumor HI, no se ha perdido la capacidad de sintetizar el factor; sin embargo, las células de esta neoplasia no serían capaces de responder a este TGF inhibitorio.

Hemos considerado también posibles funciones paracrinas de los TGFs de 13 y 43 Kda. En efecto, ambos podrían estar involucrados tanto en la proliferación del estroma que rodea en forma característica a las neoplasias mamarias, como en la infiltración de vasos sanguíneos en la masa tumoral.

Se ha demostrado que los tres tipos de tumores sintetizan EGF e IGF-I. Es importante considerar que este es el primer trabajo donde se demuestra la presencia del EGF completamente procesado de 6000 Da en células de cáncer de mama.

La síntesis de ambos factores es estimulada por el MPA.

Hemos postulado así que EGF e IGF-I actuarían como factores autocrino positivos en los tumores.

Se han encontrado receptores para el EGF en los tumores HD₁ y HI. Los niveles del EGF-R están significativamente disminuidos en el tumor HD₂. Dado que la cantidad de EGF presente en este último tipo de tumor es mayor que en las otras dos líneas, hemos considerado que la disminución de los receptores es causada por el EGF. Este, sería un proceso semejante a la "down regulation", que sin embargo no involucra la pérdida de sensibilidad al estímulo mitogénico de EGF. Por el contrario, podría haber incluso una mayor respuesta de las células HD₂ al EGF.

Las características estructurales del receptor demostraron que se trata de la especie de 170,000 Kda, descrita también en otras células normales y malignas.

Se ha observado en los tumores HD₂ y HI una relación inversa entre los niveles de receptores para estrógenos, progesterona y EGF.

En los tres tipos tumorales, se observó la síntesis además del IGF-I, de una proteína transportadora de este factor de 43 KDa. Se considera que ésta actuaría modulando en forma autocrina/paracrina la actividad biológica del IGF-I

También se han encontrado receptores para IGF-I en los tumores HD₁ y HI, observándose muy bajos niveles en el HD₂

Se ha postulado así, un mecanismo semejante al propuesto para el EGF para explicar la regulación de los IGF-I-R por el IGF-I.

Las características estructurales del receptor coinciden con las descritas para el receptor del IGF-I, siendo la subunidad que contiene el sitio de unión de 130.000 Da. También, y de acuerdo con lo demostrado en una variedad de tipos celulares se determinó la presencia del receptor de 260,000 Da que une preferencialmente al IGF-II.

Se observó además una relación inversa entre los niveles de los receptores para estrógenos y progesterona y los de IGF-I en los tumores HD₂ y HI.

Los hallazgos en las neoplasias humanas y experimentales demuestran la presencia en células malignas de factores de crecimiento y transformación. Algunos de éstos actuarían como reguladores autocrino positivos del crecimiento celular. Así, serían los responsables de la ventaja proliferativa de las células neoplásicas. En los tumores humanos esta función la cumplirían los factores semejantes al TGF- α y en los experimentales el EGF.

Por otra parte, las células malignas sintetizarían distintos niveles de TGFs con capacidad de regulación negativa de la proliferación. Así, tanto la diferencia en la cantidad de estos factores como las modificaciones en la respuesta a los mismos resultarían en el crecimiento sin control de las células neoplásicas.

Finalmente, se observó la presencia de receptores para EGF e IGF-I en los tumores experimentales y una relación inversa entre

los niveles de estos receptores y los de estrógenos y progesterona. Esto, podría indicar que la estimulación de la proliferación en los tumores de mama hormonoindependientes es regulada por factores de crecimiento polipeptídicos.

Este último hallazgo es de suma importancia para tenerse en cuenta en futuras terapias en los carcinomas de mama humanos.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Bradshaw RA. The control of cell Growth: The role of polypeptide growth factors and oncogenes products. Oncogenes and growth factors. RA Bradshaw, S. Prentis (eds). Elsevier Science Publishers, pp XI-XVI, 1987.
- 2.- Marx JL. Cell growth control comes under scrutiny. Science 239:1093-1094, 1988.
- 3.- O'Keefe EJ, Pledger WJ. Review: a model of cell cycle control: sequential events regulated by growth factors. Mol. Cell Endocrinol. 31:167-186, 1983.
- 4.- Goustin AS, Leof EB, Shipley GD, Moses HL. Growth factors and cancer. Cancer Res. 46:1015-1029, 1986.
- 5.- Nishizuka Y. The role of protein Kinase C in cell surface signal transduction and tumor promotion. Nature 308:693-698, 1984.
- 6.- Heldin CH, Westermark B. Growth factors: Mechanism of action and relation to oncogenes. Cell 37:9-20, 1984.
- 7.- Walthall BJ, Ham RG. Multiplication of human diploid fibroblasts in a synthetic medium supplemented with EGF, insulin and dexamethasone. Exp. Cell Res. 134:301-309, 1981

- 8.- Todaro GJ, De Larco JE, Marquardt H, Bryant ML, Sherwin SA, Sliski AH. Polypeptide growth factors produced by tumor cells and virus transformed cells: a possible growth advantage for the producer cells. Hormones and Cell Culture, Book A. Cold Spring Harbor Conferences on Cell Proliferation 6 GH Sato, R Ross (eds). (Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory) pp 113-127, 1979.
- 9.- Waterfield MD, Scrace GT, Whittle N, Stroobant P, Johnsson A, Wasteson A, Westermark B, Heldin CH, Huang JS, Deuel TF. Platelet-derived growth factor is structurally related to the putative transforming protein p28^{src} of simian sarcoma virus. Nature 304:35-39, 1983.
- 10.- Doolittle RF, Hunkapiller MW, Hood LE, Devare SG, Robbins KC, Aaronson SA, Antoniades HA. Simian sarcoma virus oncogene v-sis is derived from the gene (or genes) encoding a platelet-derived growth factor. Science 221:275-277, 1983.
- 11.- Downward J, Yarden Y, Mayes E, Scrace GT, Totty N, Stockwell P, Ullrich A, Schlessinger J, Waterfield MD. Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erbB oncogene protein sequences. Nature 307:521-527, 1984.
- 12.- Mulcahy LS, Smith MR, Stacey DW. Requirement of ras proto-oncogen function during serum stimulated growth of NIH 3T3

- cells. *Nature* 313:241-243, 1985.
- 13.- Hunter T, Cooper JA. Protein-tyrosine kinases. *Annu. Rev. Biochem.* 54:897-930, 1985.
- 14.- Greenberg ME, Ziff EB. Stimulation of 3T3 cells induces transcription of the c-fos proto-oncogene. *Nature* 311:433-438, 1984.
- 15.- Muller R, Bravo R, Burckhardt J, Curran T. Induction of a c-fos gene and protein by growth factors precedes activation of c-myc. *Nature* 312:716-720, 1984.
- 16.- Yarden Y, Ullrich A. Molecular analysis of signal transduction by growth factors. *Biochemistry* 27: 3113-3123.
- 17.- Antoniades HN. Human platelet-derived growth factor (PDGF): purification of PDGF-I and PDGF-II and separation of their reduced subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:7314-7317, 1981.
- 18.- Antoniades MN, Scher CS, Stiles CD. Purification of platelet-derived growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:1809-1813, 1979.
- 19.- Heldin CH, Westermark B, Wasteson A. Platelet-derived growth

- factor. Isolation by a large scale procedure and analysis of subunit composition. *Biochem. J.* 193:907-913, 1981.
- 20.- Stroobant P, Waterfield MD. Purification and properties of porcine platelet-derived growth factor. *EMBO J.* 4:1945-1949, 1985.
- 21.- Gazit A, Ingarashi H, Chiu I-M, Srinivasan A, Yaniv A, Tronick SR, Robbins KC, Aaronson SA. Expression of the normal human sis/PDGF-2 coding sequence induces cellular transformation. *Cell* 39:89-97, 1984.
- 22.- Josephs SF, Guo C, Ratner L, Wong-Staal F. Human proto-oncogene nucleotide sequences corresponding to the transforming region of simian sarcoma virus. *Science* 223:487-491, 1984.
- 23.- Betsholtz C, Johnsson A, Heldin CH, Westermark B, Lind P. cDNA sequence and chromosomal localization of human platelet-derived growth factor A chain and its expression in tumor cell lines. *Nature* 320:695-699, 1986.
- 24.- Chernoff A, Levine RF, Goodman DS. Origin of platelet-derived growth factor in megakaryocytes in guinea pigs. *J. Clin. Invest.* 65:926-930, 1980.

- 25.- Glenn K, Ross R. Human monocyte-derived growth factor (s) for mesenchymal cells: activation of secretion by endotoxin and concanavalin A. *Cell* 25:603-615, 1981.
- 26.- Wang CH, Largis EE, Schaffer SA. The effect of endothelial cell-conditioned media on the proliferation of aortic smooth muscle cells and 3T3 cells in culture. *Artery* 9:358-351, 1981.
- 27.- Barret TB, Gajdusek CM, Schwartz SM, McDougall JK, Benditt EP. Expression of the sis gene by endothelial cells in culture and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6772-6774, 1984.
- 28.- Bowen-Pope DF, Malpass TW, Foster DM, Ross R. Platelet-derived growth factor in vivo: levels, activity and rate of clearance. *Blood* 64:458-469, 1984.
- 29.- Seifert RA, Schwartz SM, Bowen-Pope DF. Developmentally regulated production of platelet-derived growth factor-like molecules. *Nature* 311:669-671, 1984.
- 30.- Ross R, Raines EW, Bowen-Pope DF. The biology of platelet-derived growth factor. *Cell* 46:155-169, 1986.

- 31.- Goustin AS, Betsholtz C, Pfeifer-Ohlsson S, Persson H, Rydnert J, Bywater M, Holmgren G, Heldin CH, Westermark B, Ohlsson R. Coexpression of the *sis* and *myc* proto-oncogenes in developing human placenta suggest autocrine growth control of trophoblast growth. *Cell* 41:301-312, 1985.
- 32.- Beaconsfield P, Birwood G, Beaconsfield R. The placenta. *Sci. Am.* 243:94-103, 1980.
- 33.- Rozengurt E. Early signals in the mitogenic response. *Science* 234:290-293, 1986.
- 34.- Schuldiner S, Rozengurt E. Na^+/H^+ antiport in Swiss 3T3 cells: Mitogenic stimulation leads to cytoplasmic alcalinization. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 79:7778-7782, 1982.
- 35.- Zetterberg A, Engstrom W, Larson O. Growth activation of resting cells: Induction of balanced and unbalanced growth. *Ann.NY Acad. Sci.* 397:130-147, 1982.
- 36.- Moonlenaar WH, Tertoolen LGJ, de Laat SW. Growth factors immediately raise cytoplasmic free Ca^{2+} in human fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 259:8066-8069, 1984.
- 37.- Frantz CN. Univalent cation concentration and regulation of

the Balb/c3T3 growth cycle. Genetic Expression in the Cell Cycle. GM Padilla K, S. McCarty Sr (eds). 411-446. New York: Academic, 1982.

- 38.- Shier WT. Serum stimulation of phospholipase A₂ and prostaglandin release in 3T3 cells is associated with platelet-derived growth promoting activity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 137-141, 1980.
- 39.- Deuel TF. Polypeptide Growth Factors: Roles in Normal and Abnormal Cell Growth. Ann. Rev. Cell Biol. 3:443-492, 1987.
- 40.- Owen AJ, Geyer RP, Antoniades HN. Human platelet-derived growth factor stimulates aminoacid transport and protein synthesis by human diploid fibroblasts in plasma-free media. Proc. Natl. Acad. Sci USA 79:3203-3207, 1982.
- 41.- Nishimura J, Deuel TF. Platelet-derived growth factors stimulates the phosphorylation of ribosomal protein S6. FEBS Lett. 156:130-134, 1983.
- 42.- Bockus BJ, Stiles CD. Regulation of cytoskeletal architecture by platelet-derived growth factor, insulin and epidermal growth factor. Exp. Cell Res. 153:186-197, 1984.

- 43.- Narayanan AS, Page RC. Biosynthesis and regulation of type V collagen in diploid human fibroblasts. J. Biol. Chem. 258:11694-11696, 1983.
- 44.- Clemmons DR, Shaw DS. Variables controlling somatomedin production by cultured human fibroblasts. J. Cell. Physiol. 115:137-142.
- 45.- Clemmons DR, Van Wyk JJ. Sequential addition of platelet-derived growth factor and plasma to Balb/c3T3 fibroblasts cultures stimulates Somatomedin C binding early in cell cycle. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:6644-6648, 1980.
- 46.- Bowen Pope DF, Dicorleto PE, Ross RR. Interactions between the receptors for platelet-derived growth factor and epidermal growth factor J. Cell Biol. 96:679-683, 1983.
- 47.- Wharton W, Leof E, Olashaw N, O'Keefe EJ, Pledger WJ. Mitogenic response to epidermal growth factor (EGF) modulated by platelet derived growth factor in cultured fibroblasts Exp. Cell Res. 147:443-448.
- 48.- Bowen-Pope DF, Seifert RA, Ross RR. The platelet-derived growth factor receptor. Control of Animal Cell Proliferation AL Boyton, HL Leffert (eds). New York Academic Press 281-312, 1985

- 49.- Bowen-Pope DF, Vogel A, Ross RR. Production of platelet-derived growth factor like molecules and expression of platelet-derived growth factor receptors accompany transformation by a wide spectrum of agents. Proc. Natl. Sci. USA 81:2396-2400, 1984.
- 50.- Heldin CH, Westermark B, Westerman A. Specific receptors for platelet-derived growth factor on cells derived from connective tissue and glia. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:3664-3668, 1981.
- 51.- Williams LT, Tremble P, Antoniades HN. Platelet-derived growth factor binds specifically to receptors on vascular smooth muscle cells and the binding becomes nondissociable. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:5867-5870, 1982.
- 52.- Huang JS, Huang SS, Kennedy B, Deuel TF. Platelet-derived growth factor. Specific binding to target cells. J. Biol. Chem. 257:8130-8136, 1982.
- 53.- Ushiro H, Cohen S. Identification of phosphotyrosine as a product of epidermal growth factor-activated protein kinase in A-431 cell membranes. J. Biol. Chem. 255: 8363-8365, 1980.

- 54.- Kasuga M, Zick Y, Blithe DL, Crettaz M, Kahn CR, Insulin stimulates tyrosine phosphorylation of the insulin receptor in a cell free system. *Nature* 298:667-669, 1982.
- 55.- Jacobs S, Kull FC Jr, Earp HS, Svoboda ME, Van Wyk JJ. Somatomedin C stimulates the phosphorylation of the β -sub unit of its own receptor. *J. Biol. Chem.* 258:9581-9584, 1983.
- 56.- Radke K, Martin GS. Transformation by Rous sarcoma virus: Effects of src gene expression on the synthesis and phosphorylation of cellular polypeptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:5212-5216, 1979.
- 57.- Erikson E, Shealy DJ, Erikson RL. Evidence that viral transforming gene products and epidermal growth factor stimulate phosphorylation of the same cellular protein with similar specificity. *J. Biol. Chem.* 256:11381-11384.
- 58.- Rubsamen H, Saltenberger K, Friis R, Eigenbrodt E. Cytosolic malic dehydrogenase activity is associated with a putative substrate for the transforming gene product of Rous sarcoma virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:228-232, 1982.
- 59.- Cooper JA, Bowen-Pope DF, Raines E, Ross R, Hunter T. Similar effects of platelet-derived growth factor and epidermal

- growth factor on the phosphorylation of tyrosin in cellular proteins. Cell 31:263-273, 1982.
- 60.- Cooper JA, Sefton BM, Hunter T. Diverse mitogenic agents induce the phosphorylation of two related 42,000-dalton proteins on tyrosine in quiescent chick cells. Mol. Cell. Biol. 4:30-37, 1984.
- 61.- Fava RA, Cohen S. Isolation of calcium-dependent 35-kilodalton substrate for the epidermal growth factor receptor/kinase from A-431 cells. J. Biol. Chem. 259:2636-2645, 1984.
- 62.- Brugge JS. The p35/p36 substrates of protein-tyrosine kinases as inhibitors of phospholipase A₂. Cell 46:149-150.
- 63.- Nishimura J, Deuel TF. Stimulation of protein phosphorylation in Swiss mouse 3T3 cells by human platelet-derived growth factor. Biochem. Biophys. Res. Commun. 103:355-361, 1981.
- 64.- Rozengurt E, Rodriguez-Pena M, Smith K. Phorbol esters, phospholipase C and growth factors rapidly stimulate the phosphorylation of a Mr 80,000 protein in intact quiescent 3T3 cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:7244-7248, 1983.

- 65.- Dicker P, Rozengurt E. Phorbol ester stimulation of Na-K pump activity in Swiss 3T3 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 100:433-441, 1981.
- 66.- Moonlenaar WH, Tertoolen LGJ, de Laat SW. Phorbol ester and diacylglycerol mimic growth factors in raising cytoplasmic pH. *Nature* 312:371-374, 1984.
- 67.- Besterman JM, Cuatrecasas P. Phorbol esters rapidly stimulate amiloride-sensitive Na⁺/H⁺ exchange in a human leukemic cell line. *J. Cell Biol.* 99:340-343, 1984.
- 68.- Vara F, Rozengurt E. Stimulation of Na⁺/H⁺ antiport activity by epidermal growth factor and insulin occurs without activation of protein kinase C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 130-974-980, 1985.
- 69.- Betsholtz C, Westermark B, Ek, B, Heldin. Coexpression of a PDGF-like factor and PDGF receptors in a human osteosarcoma cell line: implications for autocrine receptor activation. *Cell* 39: 447-457, 1984.
- 70.- Yarden Y, Escobedo JA, Kuang W-J, Yang-Feng TL, Daniel TO. Structure of the receptor for platelet-derived growth factor helps define a family of closely related growth factor

receptors. Nature 323:226-232, 1986.

- 71.- Cochran BH, Zullo J, Verma IM, Stiles CD. Expression of the c-fos gene and the fos related gene as stimulated by platelet derived-growth factor. Science 226:1080-1082, 1984.
- 72.- Kelly K, Cochran BH, Stiles CD, Leder P. Cell-specific regulation of the c-myc gene by lymphocyte mitogens and platelet-derived growth factor. Cell 35:603:610, 1983.
- 73.- Robbins KC, Antoniades HN, Devare SG, Hunkapiller MW, Aaronson SA. Structural and immunological similarities between simian sarcoma virus gene product(s) and human platelet-derived growth factor. Nature 305: 605-608, 1983.
- 74.- Devare SG, Reddy EP, Law JD, Robbins KC, Aaronson SA. Nucleotide sequence of the simian sarcoma virus genome: demonstration that its acquired cellular sequences encode the transforming gene product p28^{src}. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 731-735, 1983.
- 75.- Wang JYJ, Williams LT. A v-sis oncogen protein produced in bacteria competes for platelet-derived growth factor binding to its receptor. J. Biol. Chem. 259:10645-1010648, 1984.
- 76.- Huang JS, Huang SS, Deuel TF. Transforming protein of simian

sarcoma virus stimulates autocrine cell growth of SSV-transformed cells through platelet-derived growth factor cell surface receptors. *Cell* 39:79-87, 1984.

- 77.- Hannink M, Donoghue DJ. Requirement for a signal sequence in the biological expression of the v-sis oncogene. *Science* 226:1197-1199, 1984.
- 78.- Heldin CH, Westermark B, Wasteson A. Chemical and biological properties of a growth factor from human cultured osteosarcoma cells: resemblance with platelet-derived growth factor. *J. Cell Physiol.* 105:235-246, 1980.
- 79.- Nister M, Heldin CH, Wasteson A, Westermark B. A glioma derived analog to platelet-derived growth factor: demonstration of receptor competing activity and immunological cross-reactivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 926-930, 1984.
- 80.- Cohen S. Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new born animal. *J. Biol. Chem.* 237:1555-1562, 1962.
- 81.- Cohen S, Elliott GA. The stimulation of epidermal keratinization by a protein isolated from the submaxillary gland of the mouse. *J. Invest. Dermatol.* 40: 1-5, 1963.

- 82.- Cohen S, Carpenter G. Human epidermal growth factor: isolation and chemical and biological properties. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 72:1317-1321, 1975.
- 83.- Gregory H. Isolation and structure of urogastrone and its relationship to epidermal growth factor. Nature 257:325-327, 1975.
- 84.- Hirata HT, Moore GW, Bertagna C, Orth DN. Plasma concentrations of immunoreactive human epidermal growth factor (urogastrone) in man. J. Clin. Endocrinol. Metab. 50:440-444, 1980.
- 85.- Starkey RH, Orth DN. Radioimmunoassay of human epidermal growth factor (urogastrone). J. Clin. Endocrinol. Metab. 45:1144-1153, 1977.
- 86.- Frati L, Daniele S, Delogu A, Covelli I. Selective binding of the epidermal growth factor and its specific effects on the epithelial cells of the cornea. Exp. Eye Res. 14:135-141, 1972.
- 87.- Feldman EJ, Aures D, Grossman MI. Epidermal growth factor stimulates ornithine decarboxylase activity in the digestive tract of mouse. Proc. Soc. Exp. Med. Biol. 159:400-402,

1978.

88.- Bucher NLR, Patel U, Cohen S. Hormonal factors and liver growth. *Adv. Enzyme Regul.* 16:205-213, 1978.

89.- Lintern-Moore S, Moore GPM, Panaretto BA, Robertson D. Follicular development in the neonatal mouse ovary: effect of epidermal growth factor. *Acta Endocrinol.* 96:123-126, 1981.

90.- Bower JM, Camble R, Gregory H, Gerring EL, Willshire IR. The inhibition of gastric acid secretion by epidermal growth factor. *Experientia* 31:825-826, 1975.

91.- Konturek SJ, Radeki T, Brozozowski T, Piastucki I, Dembinski A, Dembinska-Kiek A, Zmuda A, Gryglewski R, Gregory H. Gastric cytoprotection by epidermal growth factor. *Gastroenterology* 81:438-443, 1981.

92.- Carpenter G. Epidermal growth factor. *Handbook Exp. Pharmacol.* 57:89-132, 1981.

93.- Carpenter G. Cohen S. Epidermal growth factor. *Annu. Rev. Biochem.* 48:193-216, 1979.

94.- Van Zoelen EJJ, van Oostwaard TMJ, de Laat SW. Transforming growth factor β and retinoic acid modulate phenotypic

transformation of normal rat kidney cells induced by epidermal growth factor and platelet-derived growth factor.

J. Biol. Chem. 261: 5003-5009, 1986.

95.- Shipley GD, Childs CB, Volkenant ME, Moses HL. Differential effects of epidermal growth factor, transforming growth factor and insulin on DNA and protein synthesis and morphology in serum free cultures of AKR-2B cells. Cancer Res. 44:710-716, 1984.

96.- Leof EB, Van Wyk JJ, O'Keefe EJ, Pledger WJ. Epidermal growth factor (EGF) is required only during the traverse of early G₁ in PDGF stimulated-density arrested Balb/c3T3 cells. Exp. Cell Res. 147:202-208, 1983.

97.- Tsutsumi O, Kurachi H, Takami O. A physiological role of epidermal growth factor in male reproductive function Science 233:975-977, 1986.

98.- Gill. GN, Bertics PJ, Santon JB. Epidermal growth factor and its receptor. Mol. Cell. Endocrinol. 51:169-186, 1987.

99.- Gray A, Dull TJ, Ullrich A. Nucleotide sequence of epidermal growth factor cDNA predicts a 128,000-molecular weight protein precursor. Nature 303:722-725, 1985.

- 100.-Scott J, Urdea M, Quiroga M, Sanchez-Pescador R, Fong N, Selby M, Rutter WJ, Bell GI. Structure of a mouse sub-maxillary messenger RNA encoding epidermal growth factor and seven related proteins. *Science* 221: 236-240, 1983.
- 101.-Rall LB, Scott J, Bell GI. Mouse prepro-epidermal growth factor synthesis by the kidney and other tissues. *Nature* 313:228-231, 1985.
- 102.-Personen K, Viinika L, Koskimies A, Banks AR, Nicolson M Perheentupa J. Size heterogeneity of epidermal growth factor in human body fluids. *Life Sci.* 40:2489-2492, 1987.
- 103.-Tsukumo K, Nakamura H, Sakamoto S. Purification and characterization of high molecular weight human epidermal growth factor from human urine. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 145:126-128, 1987.
- 104.-Derynk R, Roberts AB, Winkler M, Chen EY, Goeddel DV, Human transforming growth factor α : Precursor structure and expression in *E. coli*. *Cell* 38:287-297, 1984.
- 105.-Massagué J. Epidermal growth factor like transforming growth factor. II. Interaction with epidermal growth factor receptor in human placenta membranes and A431

- cells. J. Biol. Chem. 258:13614-13620, 1983.
- 106.-Stroobant P, Rice AP, Gullik WJ, Cheng DJ, Kerr IM.
Purification and characterization of vaccinia virus growth factor. Cell 42:383-393, 1985.
- 107.-Cohen S, Ushiro H, Stoscheck C Chinkers MA. A native 170,000 epidermal growth factor receptor-kinase complex from shed membrane vesicles. J. Biol. Chem. 257:1523-1531, 1982.
- 108.-Bertics PJ, Gill G. Self-phosphorylation enhances the protein-tyrosine kinase activity of the epidermal growth factor receptor. J. Biol. Chem. 260:14642-14647, 1985.
- 109.-Downward J, Parker P, Waterfield MD. Autophosphorylation sites in the epidermal growth factor receptor. Nature 311 483-485, 1983.
- 110.-Ullrich A, Coussens L, Hayflick JS, Dull TJ, Gray A, Tam AW, Lee J, Yarden Y, Libermann TA, Schlessinger J, Downward J, Mayes ELV, Whittle N, Waterfield MD, Seeburg PH. Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells. Nature 309:418-425, 1984.

- 111.-Stoschek CM, Carpenter G. Down regulation of epidermal growth factor receptors: direct demonstration of receptor degradation in human fibroblasts. *J. Cell Biol.* 98:1048-1053, 1984.
- 112.-Hunter T, Nicholas L, Cooper JA. Protein kinase C phosphorylation of the EGF receptor at a threonine residue close to the cytoplasmic face of the plasma membrane. *Nature* 311:480-483, 1984.
- 113.-Downward J, Waterfield MD, Parker PJ. Autophosphorylation and protein kinase C phosphorylation of the epidermal growth factor receptor. *J. Biol. Chem.* 260:14538-14546, 1985.
- 114.-Downward J, Yarden Y, Mayes E, Scrase G, Totty N. Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erb B oncogene protein sequences. *Nature* 307:521-527, 1984.
- 115.-Hayman MJ. erb-B: growth factor receptor turned oncogene. *Oncogenes and growth factors.* RA Bradshaw, S Prentis (eds). Elsevier Science Publishers, 1987.
- 116.-Hunter T. *Oncogenes and growth control.* Oncogenes and growth factors. RA Bradshaw, S Prentis (eds). Elsevier Science Publishers, 1987.

- 117.-Hayman MJ, Beug H. Identification of a form of the avian erythroblastosis virus erb-B gene product at the cell surface. *Nature* 309:460-462, 1984.
- 118.-Radke K, Martin S. Transformation by Rous sarcoma virus: effects of src gene expression on the synthesis and phosphorylation of cellular polypeptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:5212-5216, 1979.
- 119.-Haigler HT, Schaeffer DD, Burgess WH. Characterization of lipocortin I and immunologically unrelated 33 KDa protein as epidermal growth factor receptor kinase substrates and phospholipase A₂ inhibitors. *J. Biol. Chem.* 262:6921-6927, 1987.
- 120.-Schaeffer DD, Haigler HT. Characterization of Ca²⁺ dependent phospholipid binding and phosphorylation of lipocortin I. *J. Biol. Chem.* 262:6931-6937, 1987.
- 121.-Lin CR, Chen WS, Krueger W, Stolarsky LS, Weber W, Evans R, Verma IM, Gill GN, Rosenfeld MG. Expression cloning of human EGF receptor complementary DNA: gene amplification and three related messenger RNA products in A431 cells. *Science* 224: 843-847, 1984.
- 122.-Temin HM. Control by factors in serum of multiplication

of uninfected and infected cells and converted by avian sarcoma viruses. Growth regulating substances for animal cells in cultures. The Wistar Symposium Monograph No 7, 10116, 1967.

123.-Dulak NC, Temin HM. A partially purified polypeptide fraction from rat liver cell conditioned medium with multiplication stimulating activity for embryo fibroblasts. J. Cell Physiol. 81:153-160, 1973.

124.-Marquardt H, Todaro GJ, Handerson LE, Oroszlan S. Purification and primary structure of a polypeptide with multiplication-stimulating activity from rat liver cells cultures. Homology with epidermal growth factor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:4684-4688, 1981.

125.-Clemmons DR, Underwood LD, Van Wyk JJ. Hormonal control of immunoreactive somatomedin production by cultured human fibroblasts. J. Clin. Invest. 67:10-19, 1981.

126.-Suboda ME, Van Wyk JJ, Klapper DG, Fellows RE, Grisson FE, Schlueter RJ. Purification of Somatomedin C from human plasma: Chemical and biological properties, partial sequence analysis and relation to other somatomedins. Biochemistry 19:790-797, 1980.

- 127.-D'Ercole AJ, Stiles AD Underwood LE. Tissue concentration of somatomedin C: further evidence for multiple sites of synthesis and paracrine or autocrine mechanisms of action. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:935-939, 1984.
- 128.-Scott J, Cowell J, Robertson ME, Priestley LM, Pritchard J, Bell GI, Graham CF, Knott TJ. IGF-II gene expression in Wilms's tumours and embryonic tissues. Nature 317:260-262, 1985.
- 129.-Zapf J, Walter H, Froesch ER. Radioimmunological determination of insulin like growth factors I y II in normal subjects and in patients with growth disorders and extrapancreatic tumor hypoglycemia. J. Clin. Invest. 68:1321-1330, 1981.
- 130.-Furlanetto RW, The somatomedin C binding protein: evidence for a heterologous subunit structure. J. Clin. Endocrin. Metab. 51:12-19, 1980.
- 131.-Adams SO, Nissley SP, Handwerker S, Rechler MM. Developmental patterns of insulin-like growth factors-I and II synthesis and regulation in rat fibroblasts. Nature 302:150-152, 1983.
- 132.-Rinderknecht E, Humbel RE. The aminoacid sequence of human insulin growth factor I and its structural homology with

- proinsulin. *J. Biol. Chem.* 253:2769-2776, 1978.
- 133.-Van Wyk JJ, Russel WE, Li CH. Synthetic somatomedin C: comparison with natural hormone isolated from human plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:740-742, 1984.
- 134.-Bell GI, Merryweather JP, Sanchez-Pescador R, Stempien MM, Preistly L, Scott J, Rall LB. Sequence of a cDNA clone encoding human preproinsulin-like growth factor II. *Nature* 310:775-777, 1984.
- 135.-Dull TJ, Gray A, Hayflick JS, Ullrich A. Insulin-like growth factor II precursor gene organization and relation to insulin gene family. *Nature* 310: 777-781, 1984.
- 136.-Jansen M, Van Schaik FMA, Ricker AT, Bullock B, Woods DE, Gobbay KH, Nussbaum AL, Sussenbach JS, Van Der Brande JL. Sequence of cDNA encoding human insulin like growth factor I precursor. *Nature* 306:609-611, 1983.
- 137.-Brissenden JE, Ullrich A, Franke U. Human chromosomal mapping of genes for insulin-like growth factors I and II and epidermal growth factor. *Nature* 310:81-784, 1984.
- 138.- Tricoli JV, Rall LB, Scott J, Bell G, Shows TB. Localization of insulin like growth factor genes to human chromo-

- some 11 and 12. *Nature* 310:784-786, 1984.
- 139.-Pilch PF, Czech MP. The subunit structure of the high affinity insulin receptor. *J. Biol. Chem.* 225:1722-1731, 1980.
- 140.-Ullrich A, Bell JR, Chen EY, Herrera R, Petruzzelli LM, Dull TJ, Gray A, Coussens L, Liao Y-C, Tsubokawa M, Mason A, Seeburg PH, Grunfeld C, Rosen OM, Ramachandran J. Human insulin receptor and its relationship to the tyrosine kinase family of oncogenes. *Nature* 313:756-761, 1985.
- 141.-Ronnett G, Knutson VP, Kohanski RA, Simson TL, Lane MD. Role of glycosylation in the processing of newly translated insulin proreceptor in 3T3-L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.* 259:4566-4575, 1984.
- 142.-Massagué J, Czech MP. The subunit structures of two distinct receptors for insulin-like growth factors I and II and their relationship to the insulin receptor. *J. Biol. Chem.* 257: 5038-5045, 1982.
- 143.-Rettenmier CW, Chen JH, Roussel MF, Sherr CJ. The product of the *c-fms* proto-oncogene: a glycoprotein with associated tyrosine kinase activity. *Science* 228:320-322, 1985.

- 144.-Blundell TL, Humbell RE. Hormone families: pancreatic hormones and homologous growth factors. *Nature* 287: 781-787, 1980.
- 145.-Underwood LE, D'Ercole AJ, Van Wyk JJ. Somatomedin C and the assessment of growth. *Pediatric Clinics of North America* 27: 771-782, 1980.
- 146.-Russell WE, Van Wyk JJ, Pledger WJ. Inhibition of the mitogenic effects of plasma by a monoclonal antibody to somatomedin C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:2389-2392, 1984.
- 147.-Voutilainen R, Miller WL. Coordinate tropic hormone regulation of mRNAs for insulin-like growth factor II and the cholesterol side-chain-cleavage enzyme, P450ssc, in human steroidogenic tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 1590-1594, 1987.
- 148.-Dickson RB, Lippman ME. Estrogenic regulation of growth and polypeptide growth factor secretion in human breast carcinoma. *Endocrine Rev.* 8:29-40, 1987.
- 149.-Baxter RC, Maitland JE, Raisur RL, Reddel R, Sutherland RL. High molecular weight somatomedin C (IGF-I) from T47-D human mammary carcinoma cells: immunoreactivity and bioactivity. Spencer EM (ed) *Insulin-like growth factors*

somatomedins. Walter deGruyter Co., Berlin pp 615-618,
1983.

150.-Campisi J, Pardee AB. Post transcriptional control of the
onset of DNA synthesis by an insulin-like growth factor.
Mol .Cell. Biol 4:1807, 1984.

151.-Thomas KA, Gimenez-Gallego Guillermo. Fibroblast growth
factors: Broad spectrum mitogens with potent angiogenic
activity. Oncogenes and growth factors. RA Bradshaw,
S Prentis (eds). Elsevier Science Publishers, 1987.

152.-Gospodarowicz D, Moran JS. Mitogenic effect of fibroblast
growth factor on early passage cultures of human and murine
fibroblasts. J. Cell. Biol. 101: 2330-2338, 1975.

153.-Gospodarowicz D, Localization of a fibroblast growth factor
and its effect alone and with hydrocortisone on 3T3 cell
growth. Nature 249:123-125, 1974.

154.-Gospodarowicz D, Weserman F, Moran J. Presence in the brain
of a mitogenic agent distinct from fibroblast growth factor
that promotes the proliferation of myoblast in low density
culture. Nature 256:216-219, 1975.

155.-Gospodarowicz D, Neufel G, Schweigerer L. Fibroblast growth

factor. Mol. Cel. Endocrinol. 46:187-191, 1986.

- 156.-Thomas KA, Candelore MR, Fitzpatrick S. Purification and characterization of acidic fibroblast growth factor from bovine brain. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:357-362, 1984.
- 157.-Gospodarowicz D, Ferrara N, Schweigerer L, Neufeld G. Structural characterization and biological functions of fibroblast growth factor. Endocrine Rev. 8:95-113, 1987.
- 158.-Esch F, Baird A, Ling N, Ueno N, Hill F, Denoroy L, Klepper R, Gospodarowicz D, Bohlen P, Guillemin R. Primary structure of bovine pituitary basic fibroblast growth factor (FGF) and comparison with the amino terminal sequence of bovine brain acidic FGF. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:6507-6511, 1985.
- 159.-Gospodarowicz D, Cheng J, Lui G-M, Baird A, Bohlen P. Isolation by heparin-Sepharose affinity chromatography of brain fibroblast growth factor: identity with pituitary fibroblast growth factor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 6963-6971, 1984.
- 160.-Gospodarowicz D, Cheng J, Lui GM, Baird A, Esch F, Bohlen

- P. Corpus luteum angiogenic factor is related to fibroblast growth factor. *Endocrinology* 117:2283-2288, 1985.
- 161.-Esch F, Ueno N, Baird A, Hill F, Denoroy L, Ling N, Gospodarowicz D, Guillemin R. Primary structure of bovine brain acidic fibroblast growth factor (FGF). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 133:554-557, 1985.
- 162.-Baird A, Esch F, Mormede P, Ueno N, Ling N, Bohlen P, Ying SY, Wehrenberg WB, Guillemin R. Molecular characterization of fibroblast growth factor: distribution and biological activities in various tissues. *Recent Prog. Horm. Res.* 42:143-152, 1986.
- 163.-Neufel G, Gospodarowicz D. The identification and partial characterization of the fibroblast growth factor receptor of baby hamster kidney cells. *J. Biol. Chem.* 260:13860-13867, 1985.
- 164.-Neufel G, Gospodarowicz D. Basic and acidic fibroblast growth factor interact with the same cell surface receptor. *J. Biol. Chem.* 261:5631-5637, 1986.
- 165.-Tsuda T, Kaibuchi K, Kawahara Y, Fukuzaki H, Takai Y. Induction of protein kinase C and calcium ion mobilization by fibroblast growth factor in Swiss 3T3 cells. *FEBS Lett.*

187:43-47, 1985.

166.-Bohlen P, Esch F, Baird A, Gospodarowicz D. Acidic fibroblast growth factor from bovine brain. Amino terminal sequence and comparison to basic fibroblast growth factor. EMBO J 4:1951-1956, 1985.

167.-Gospodarowicz D. Biological activity in vivo and in vitro of pituitary and brain fibroblast growth factor. Mediators in Cell Growth and Differentiation. RJ Ford Maizel AL (eds). Raven Press, New York pp 109-134, 1985.

168.-Gospodarowicz D. Fibroblast growth factor . Hormonal Proteins and peptides ed Li CH. Academic Press New York , vol 12 pp 205-230, 1985.

169.-Gospodarowicz D, Vlodasky I, Savion N. The role of fibroblast growth factor and the extracellular matrix in the control of proliferation and differentiation of corneal endothelial cells. Vision Res. 21:87-91, 1981.

170.-Vlodasvsky I, Gospodarowicz D. Structural and functional alterations in the surface of vascular endothelial cells associated with the formation of a confluent cell monolayer and with the withdrawal of fibroblast growth factor. J. Supramol. Struct. 12:73-76, 1979.

- 171.-Montesano R, Vassalli JD, Baird A, Guillemin R, Orci L.
Basic fibroblast growth factor induces angiogenesis in vivo.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83:7297-7301, 1986.
- 172.-Kato Y, Gospodarowicz D. Sulfated proteoglycan synthesis
by rabbit costal chondrocytes grown in the presence and
absence of fibroblast growth factor. J. Cell. Biol. 100:477-
479, 1985.
- 173.-Broad TE, Ham RG. Growth and adipose differentiation of
sheep preadipocytes fibroblasts in serum free medium.
Eur. J. Biochem. 135:33-37, 1983.
- 174.-Togari A Baker D, Dickens G, Guroff G. The neurite promo-
ting effect of fibroblast growth factor on PC-12 cells.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 114:1189-1192, 1983.
- 175.-Togari A, Dickens G, Huzuya H, Guroff G. The effect of
fibroblast growth factor on PC-12 cells. J. Neurosci.
5:307-310, 1985.
- 176.-Wagner JA, D'Amore P. Neurite outgrowth induced by an en-
dothelial cell mitogen isolated from retina. J. Cell
Biol. 103:1363-1367, 1986.

- 177.- Gospodarowicz D, Weseman J, Moran J, Linstrom J. Effect of fibroblast growth factor on the division and fusion of bovine myoblasts. *J. Cell Biol.* 70:395-400, 1976.
- 178.-Gospodarowicz D, Neufel G, Schweigerer L. Molecular and biological characterization of fibroblast growth factor: an angiogenic factor which also controls the proliferation and differentiation of mesoderm and neuroectoderm derived cells. *Cell. Differ.* 19:1-12, 1986.
- 179.-Kaibuchi K, Tsuda T, Kikuchi A, Tanimoto T, Yamashita T, Takai Y. Possible involvement of the protein kinase C and calcium ions in growth factor induced expression of c-myc oncogene in Swiss 3T3 cells. *J. Biol. Chem.* 261: 1187-1190, 1986.
- 180.-Parfett CLJ, Halminton RT, Howell BW, Edwards DR, Nilsen-Halminton M, Denhardt DT. Characterization of a cDNA clone encoding murine mitogen regulated protein: regulation of mRNA levels in mortal and immortal cell lines. *Mol. Cell. Biol.* 35:3289-3293, 1985.
- 181.-Halminton RT, Nilsen-Halminton M, Adams G. Superinduction by cycloheximide of mitogen induced secreted protein produced by Balb/c3T3 cells. *J. Cell. Physiol* 123:201-206, 1985.

- 182.-Muller R Wagner EF. Differentiation of f9 teratocarcinoma stem cells after transfer of c-fos proto-oncogenes. Nature 311:438-440, 1984.
- 183.-Armelin HA, Armelin MCS, Kelly K, Stewart Y, Leder P, Cochran BH, Stiles CD. Functional role of c-myc in mitogenic response to platelet derived growth factor precedes activation of c-myc . Nature 312:716-719, 1984.
- 184.-Roberts AB, Frolik CA, Anzano MA, Sporn MB. Transforming growth factors from neoplastic and non-neoplastic tissues. Federation Proceedings. 42:2621-2626, 1983.
- 185.-Todaro GJ, De Larco JE. Growth factors produced by sarcoma virus transformed cells. Cancer Res. 38:4147-4154, 1978.
- 186.-De Larco JE, Preston Y, Todaro GJ. Properties of a sarcoma growth factor-like peptide from cells transformed by a temperature-sensitive sarcoma virus. J. Cell. Physiol. 109:143-152, 1981.
- 187.-Sporn MB, Todaro GJ. Autocrine secretion and malignant transformation of cells. N. Engl. J. Med. 303:878-880, 1980.
- 188.-Ozanne B, Fulton R, Kaplan P. Kirsten murine sarcoma virus

transformed cell lines and a spontaneously transformed rat cell line produce transforming factors. J. Cell. Physiol. 105: 163-180, 1980

189.-Twardzyk DR, Todaro GJ, Marquardt H, Reynolds F, Stephenson JR. Transformation induced by Abelson murine leukemia virus involves production of a polypeptide growth factor. Science 216:812-820, 1982.

190.-Moses HL, Branum E, Proper JA, Robinson R. Transformed growth factor production by chemically transformed cells. Cancer Res. 41:2842-2848, 1981.

191.-Todaro GJ, Fryling CM, DeLarco JE. Transforming growth factors produced by certain human tumor cells: polypeptides that interact with epidermal growth factor receptors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:5258-5262, 1980.

192.- Roberts AB, Lamb LC, Newton DL, Sporn MB, DeLarco JE, Todaro GJ. Transforming Growth Factors: isolation of peptides from virally and chemically transformed cells by acid-ethanol extraction. Proc. Natl. Acad. Sci USA 77: 5258-5262, 1980.

193.-Davoren PR. The isolation of the insulin from a single cat pancreas. Biochem. Biophys. Acta 63:150-153, 1962.

- 194.-Roberts AB, Anzano MA, Lamb LC, Smith JM, Sporn MB. New class of transforming growth factors potentiated by epidermal growth factor: isolation from non-neoplastic tissues. Proc. Natl. Acad. Sci USA 78:5339-5343, 1981.
- 195.-Tucker RF, Volkenant ME, Branum EL, Moses HL. Comparison of intra and extracellular transforming growth factors from nontransformed and chemically transformed mouse embryo cells. Cancer Res. 43:1581-1586, 1983.
- 196.-Roberts AB, Anzano MA, Lamb LC, Smith JM, Frolik CA, Marquardt H, Todaro GJ, Sporn MB. Isolation from murine sarcoma cells of novel transforming growth factors potentiated by epidermal growth factor. Nature 295:417-419, 1982.
- 197.-Brown KD, Blakeley DM. Transforming growth factors: sources, properties and possible roles in normal and malignant cell growth control. Biochem. Soc. Transactions 12:168-173, 1984.
- 198.-Lawrence DA. Transforming growth factors-an overview. Biol. Cell 53: 93-98, 1985.
- 199.-Assoian RK, Grotendorst GR, Miller DM, Sporn MB. Cellular transformation by coordinated action of three peptide growth

- factors from human platelets. *Nature* 309:804-806, 1984.
- 200.-Anzano MA, Roberts AB, Smith JM, Sporn MB, DeLarco JE.
Sarcoma growth factor from conditioned medium of virally transformed cells is composed of both type α and β transforming growth factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:6264-6268, 1983.
- 201.-Massagué J. The transforming growth factors. *Oncogenes and growth factors*. RA Bradshaw, S Prentis (eds). Elsevier Science Publishers, 1987.
- 202.-Halper H, Moses HL. Epithelial tissue-derived growth factor-like-polypeptides. *Cancer Res.* 43:1972-1979, 1983.
- 203.-Moses HL, Branum EL, Proper JA, Robinson RA. Transforming growth factor production by chemically transformed cells. *Cancer Res.* 41:2842-2848, 1981.
- 204.-Proper JA, Moses HL. Detection of transforming growth factors in mouse embryos. *J. Supramol. Struct.* 5:253-257, 1981.
- 205.-Halper H, Moses HL. Purification and characterization of a novel transforming growth factor. *Cancer Res.* 47:4552-4559, 1987.

- 206.-Marquardt H, Hunkapiller MW, Hood LE, Twardzik DR, DeLarco JE, Stephenson JR, Todaro GL. Transforming growth factors produced by retrovirus-transformed rodent fibroblasts and human melanoma cells: amino acid sequence homology with epidermal growth factor. Proc. Natl. Acad. Sci USA 80: 4684-4688, 1983.
- 207.-Twardzik DR, Ranchalis JE, Moss B, Todaro GJ. Vaccinia growth factor: newest member of the family of growth modulators which utilize the membrane receptor for EGF. Acta Neurochir. 41:104-109, 1987.
- 208.-Chang W, Upton C, Purchio AF, McFadden G. The genome of Shope Fibroma virus, a tumorigenic poxvirus, contains a growth factor gene with sequence similarity to those encoding epidermal growth factor and transforming growth factor alpha. Mol. Cell. Biol. 7:535-540, 1987.
- 209.-Lee DC, Rose TM, Webb NR, Todaro GJ. Cloning and sequence analysis of a cDNA for rat transforming growth factor alpha. Nature 313:489-491, 1985.
- 210.-Bringman TS, Lindquist PB, Derynk R. Different transforming growth factor alpha species are derived from a glycosylated and palmitoylated transmembrane precursor. Cell 48:429-440,

1987.

211.-Brissenden JE, Derynk R, Franke U. Mapping of transforming growth factor alpha gene on human chromosome 2 close to the breakpoint of the Burkitt's lymphoma t(2,8) variant translocation. *Cancer Res* 45:5593:5597,1985.

212.-De Larco JE, Todaro GJ. Growth factors from murine sarcoma virus transformed cells. *Proc. Natl. Acad.*75:4001-4005, 1978.

213.-Tam JP, Marquardt H, Rosberger DF, Wong TW, Todaro GJ. Synthesis of biologically rat transforming growth factor I. *Nature* 309:376-378, 1984.

214.-Reynolds FH, Todaro GJ, Fryling C, Stephenson JR. Human transforming growth factors induce phosphorylation of EGF receptors. *Nature* 292:259-262, 1981.

215.-Winkler ME, Bringman T, Marks BJ. The purification of fully active recombinant transforming growth factor alpha produced in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 261:13868-13843, 1986.

216.-Marquard H, Todaro GJ. Human transforming growth factor production by a melanoma cell line, purification and initial characterization. *J. Biol. Chem.* 277:5220-5225, 1982.

- 217.-Marquardt H, Hunkapiller MJ, Hood LE, Todaro GJ. Rat transforming growth factor type I: structure and relation to epidermal growth factor. *Science* 223:1079-1082, 1984.
- 218.-Smith JM, Sporn MB, Roberts AB, Derynk R, Winkler ME. Human transforming growth factor-alpha causes precocious eyelid opening in newborn mice. *Nature* 315:515-516, 1985.
- 219.-Rhodes JA, Tam JP, Finke U, Saunders M, Bernake J, Silen W, Murphy RA. Transforming growth factor alpha inhibits secretion of gastric acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83:3844-3846, 1986.
- 220.-Vonderlhaat BK. Local effects of EGF, Alpha TGF, and EGF like growth factors on local lobuloalveolar development of the mouse mammary gland in vivo. *J. Cell. Physiol.* 132:581-584, 1987.
- 221.-Schreiber AB, Winkler ME, Derynk R. Transforming growth factor-alpha : a more potent angiogenic mediator than epidermal growth factor. *Science* 232:1250-1253, 1986.
- 222.-Stern PH, Krieger NS, Nissenson RA, Williams RD, Winkler ME, Derynk R, Strewler GJ. Human transforming growth factor-alpha stimulates bone resorption in vitro. *J. Clin. Invest.*

76:2016-2019, 1986.

223.-Takahashi N, MacDonald BR, Hon J, Winkler ME, Derynk R, Mundy GR, Roodman GD. Recombinant human transforming growth factor alpha stimulates the formation of osteoclasts-like cells in long term human marrow cultures. J.Clin Invest. 78:894-898, 1986.

224.-Schultz GS, White M, Mitchell R, Brown G, Lynch J. Epithelial wound healing enhanced by transforming growth factor- α and vaccinia growth factor. Science 235:350-352, 1987.

225.-Freemark M, Comer M. Epidermal growth factor (EGF)-like transforming growth factor (TGF) activity and EGF receptors in ovine fetal tissues: possible role for TGF in ovine fetal development. Pediatr Res. 22:609-615, 1987.

226.-Samsoundar J, Kobrin MS, Kudlow JE. Alpha-transforming growth factor secreted by untransformed bovine anterior pituitary cells in culture. J. Biol. Chem. 261: 14408-14413, 1986

227.-Gottlieb AB, Chang CK, Posnett DN, Fanelli B, Tam JP. Detection of transforming growth factor alpha in normal, malignant, and hyperproliferative human keratinocytes. J. Exp. Med. 167:670-675, 1988.

- 228.-Derynk R, Goeddel DV, Ullrich A, Gutterman JU, Williams RD, Bringman TS. Synthesis of messenger RNAs for transforming growth factors α and β and the epidermal growth factor receptor by human tumors. *Cancer Res.* 47:707-712, 1987.
- 229.-Macías A, Perez R, Hagerstrom T, Skoog L. Identification of transforming growth factor alpha in human primary breast carcinomas. *Anticancer Res.* 7:1271-1275, 1987.
- 230.-Cutry AF, Kinniburgh AJ, Twardzik DR, Wenner CE. Transforming growth factor alpha (TGF alpha) induction of c-fos and c-myc expression in C3H 10T1/2 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 152:216-222, 1988.
- 231.-Finzi E, Fleming T, Segatto O, Pennington CY, Bringman TS, Derynk R, Aaronson SA. The human transforming growth factor type alpha coding sequence is not a direct oncogene when overexpressed in NIH 3T3 cells. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 84:3733-3737, 1987.
- 232.-Buik RN, Filmus J, Quaroni A. Activated H-ras transforms rat intestinal epithelial cells with expression of alpha-TGF. *Exp. Cell. Res.* 170:300-309, 1987.
- 233.-Wilding G, Lippman ME, Gelmann EP. Effects of steroid hormones and peptide growth factors on protooncogene

c-fos expression in human breast cancer cells. Cancer Res. 48:802-805, 1988.

234.-Assoian RK, Komoriya A, Meyers CA, Miller DM, Sporn MB. Transforming growth factor- β in human platelets: identification of a major storage site, purification and characterization. J. Biol. Chem. 259:9756-9761, 1984.

235.-Frolik CA, Dart LL, Meyers CA, Smith DM, Sporn MB. Purification and initial characterization of a type β transforming growth factor from human placenta. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:3676-3680, 1983.

236.-Roberts AB, Anzano MA, Meyers CA, Wideman J, Blancher R, Pan YCE, Stein S, Lehtman SR, Smith LC, Lamb LC, Sporn M. Purification and properties of a type β transforming growth factor from bovine kidney. Biochemistry 22:5692-5698, 1983.

237.-Massagué J. Type β transforming growth factor from feline sarcoma virus transformed rat cells. Isolation and biological properties. J. Biol. Chem. 259:9756-9761, 1984.

238.-Fernandez-Pol JA, Klos DJ, Grant GA. Purification and biological properties of type β Transforming Growth Factor from mouse transformed cells. Cancer Res. 46:5153-5161, 1986.

- 239.-Cheifetz S, Weatherbee JA, Tsang MLS, Anderson JK, Mole JE, Lucas R, Massagué J. The transforming growth factor- β system, a complex pattern of cross-reactive ligands and receptors. *Cell* 48:409-415, 1987.
- 240.-Seyedin SM, Thompson AY, Bentz H, Rosen DM, Mc Pherson JM. Cartilage inducing factor A: apparent identity to transforming growth factor- β . *J. Biol. Chem* 261:5693-5695, 1986.
- 241.-Derynk R, Jarret JA, Chen EY, Eaton DH, Bell JR, Assoian RK, Roberts AB, Sporn MB, Goeddel DV. Human transforming growth factor- β cDNA sequence and expression in tumor cell lines. *Nature* 316:701-705, 1985.
- 242.-Derynk R, Jarret JA, Chen EY, Goeddel DV. The murine transforming growth factor- β precursor. *J. Biol. Chem.* 261:4377-4379, 1986.
- 243.-Rosen DM, Stempien SA, Thompson AY, Seyedin SM. Transforming growth factor-beta modulates the expression of osteoblast and chondroblast phenotypes in vitro. *J. Cell Physiol.* 134:337-346, 1988.
- 244.-Takehara K, LeRoy EC, Grotendorst GR. TGF-beta inhibition of endothelial cell proliferation: alteration of EGF binding and

- EGF-induced growth-regulatory (competence) gene expression. *Cell* 49:415-422, 1987.
- 245.-Lin P, Liu C, Tsao MS, Grisham JM. Inhibition of proliferation of cultured rat liver epithelial cells at specific cell cycle stages by transforming growth factor-beta. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 143:26-30, 1987.
- 246.-Kurokawa M, Lynch K, Podolsky DK. Effects of growth factors on an intestinal epithelial cell line: transforming growth factor beta inhibits proliferation and stimulates differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 142: 775-782, 1987.
- 247.-Ishibashi T, Miller SL, Burstein SA. Type beta transforming growth factor is a potent inhibitor of murine megakaryocytopoiesis in vitro. *Blood* 69:1737-1741, 1987.
- 248.-Ohta M, Greenberg JS, Anklesaria P, Bassols A, Massagué J. Two forms of transforming growth factor-beta distinguished by multipotential haematopoietic progenitor cells. *Nature* 329:539-541, 1987.
- 249.-Massagué J, Like B. Cellular receptors for type β transforming growth factor. *J. Biol. Chem.* 269:2636-2645, 1985.

- 250.-Mason AJ, Hayflick JS, Ling N, Esch F, Ueno, N, Ying S-Y, Guillemin R, Niall H, Seeburg PH. Complementary DNA sequences of ovarian follicular fluid inhibin show precursor structure and homology with transforming growth factor- β . *Nature* 318:659-663, 1985.
- 251.-Cate RL, Mattaliano RJ, Hession C, Tizard R, Farber NM. Isolation of the bovine and human genes for Mullerian inhibiting substance and expression of the human gene in animal cells. *Cell* 45:685-698, 1986.
- 252.-Padgett RW, St Johnston D, Gelbart WM. A transcript from a *Drosophila* pattern gene predicts a protein homologous to the transforming growth factor- β family. *Nature* 325:81-84, 1987.
- 253.-Masagué J. The TGF- β family of growth and differentiation factors. *Cell* 49:437-438, 1987.
- 254.-Massagué J. Subunit structure of a high-affinity receptor for type β -transforming growth factor. *J. Biol. Chem.* 260:7059-7066, 1985.
- 255.-Frolik CA, Wakefield LM, Smith DM, Sporn MB. Characterization of a membrane receptor for transforming growth factor β in normal rat kidney fibroblasts. *J. Biol. Chem.*

259:10995-11000, 1984.

256.-Tucker RF, Branum EL, Shipley GD, Ryan RJ, Moses HL. Specific binding to cultured cells of 125 I-labelled transforming growth factor type β from human platelets. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6757-6751, 1984.

257.-Roberts AB, Roche NS, Sporn MB. Selective inhibition of the anchorage-independent growth of myc-transfected fibroblasts by retinoic acid. Nature 315:237-239, 1985.

258.-Wakefield LM, Smith DM, Masui T, Harris CC, Sporn MB. Distribution and modulation of the cellular receptors for transforming growth factor beta. J. Cell. Biol. 105:965-975, 1987.

259.-Seyedin SM, Segarini PR, Rosen DM, Thompson AY, Bentz H, Graycar J. J. Cartilage-inducing factor B is a unique protein structurally and functionally related to transforming growth factor-beta. Biol. Chem. 262:1946-1949, 1987.

260.-Moses HL, Childs CB, Halper J, Shipley GD, Tucker RF. Role of transforming growth factors in neoplastic transformation Control of cell growth and proliferation CM Venziale (ed), pp 147-167. New York Van Nostrand Reinhold, 1984.

- 261.-Moses HL, Tucker RF, Leof EB, Coffey RJ, Halper J. Type beta transforming growth factor is a growth stimulator and growth inhibitor. *Cancer Cells* 3: 65-71. J Ferramisco, B Ozanne, C Stiles (eds). Cold Spring Harbord, NY: Cold Spring Harbord Lab, 1985.
- 262.-Roberts AB, Anzano MA, Wakefield LM, Roche NS, Stern DF, Sporn MB. Type β transforming growth factor: a bifunctional regulator of cell growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:119-121, 1985.
- 263.-Tucker RF, Shipley GD, Moses HL. Growth inhibitor from BSC-1 cells closely related to platelet type β transforming growth factor. *Science* 226:705-707, 1984.
- 264.-Shipley GD, Tucker RF, Moses H. Type β transforming growth factor/growth inhibitor stimulates entry of monolayer cultures of AKR-2B cells into S phase after a prolonged prereplicative interval. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:4147-4151, 1985.
- 265.-Leof EB, Proper JA, Goustin AS, Shipley GD, DiCorleto PE. Induction of c-sis mRNA and activity similar to platelet-derived growth factor by transforming growth factor β : a proposed model of indirect mitogenesis involving autocrine activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:2453-2457, 1986.

- 266.-Centrella M, McCarthy TL, Canalis E. Transforming growth factor β is a bifunctional regulator of replication and collagen synthesis in osteoblast enriched cell cultures from fetal rat bone. *J. Biol. Chem.* 262:2869-2874, 1987.
- 267.-Masui T, Wakefield LM, Lechner JF, LaVeck MA, Sporn MB. Type beta transforming growth factor is the primary differentiation inducing serum factor for normal human bronchial epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:2438-2442, 1986.
- 268.-McMahon JB, Richards WL, Del Campo AA, Song M-KH, Thor-geirsson SS. Differential effects of transforming growth factor β on proliferation of normal and malignant rat liver epithelial cells in culture. *Cancer Res.* 46:4665-4671, 1986.
- 269.-Shipley GD, Pittelkow MR, Wille JJ, Scott RE, Moses HL. Reversible inhibition of normal human prokeratinocyte proliferation by type β transforming growth factor-growth inhibitor in serum free medium. *Cancer Res.* 46:2068-2071, 1986.
- 270.-Kehrl JH, Wakefield LM, Roberts AB, Jakowlew S, Alvarez-Mon. Production of transforming growth factor β by human T lymphocytes and its potential role in regulation of T cell

growth. J. Exp. Med. 163:1037-1050, 1986.

- 271.-Kasid A, Lippman ME. Estrogen and oncogene mediated growth regulation of human breast cancer cells. J. Steroid. Biochem 27:465-470, 1987.
- 272.-Knabbe C, Lippman ME, Wakefield LM, Flanders KC, Kassid A, Derynk R, Dickson RB. Evidence that transforming growth factor β is a hormonally regulated negative growth factor in human breast cancer cells. Cell 48:417-428, 1987.
- 273.-Ignotz RA, Massagué J. Type β transforming growth factor controls the adipogenic differentiation of 3T3 fibroblasts. Proc. Natl. Acad. Sci USA 82:8530-8534, 1985.
- 274.-Florini JR, Roberts AB, Ewton DZ, Falen SI, Flanders KC, Sporn MB. Transforming growth factor- β . A very potent inhibitor of myoblast differentiation identical to the differentiation inhibitor secreted by buffalo rat liver cells. J. Biol. Chem. 261: 16509-16513, 1986.
- 275.-Moses HL, Coffey RJ, Leaf EB, Lyons RM, Keski-Oja J. Transforming growth factor beta regulation of cell proliferation J. Cell. Physiol. 5:1-7, 1987.
- 276.-Chen J-K, Hoshi H, McKeegan WL. Transforming growth factor

type β specifically stimulates synthesis of proteoglycan in human adult arterial smooth muscle cells. Proc. Natl. Acad. Sci USA. 84:5287-5291, 1987.

277.-Roberts AB, Sporn MB, Assoian RK, Smith JM, Roche NS, Wakefield LM, Heine UI, Liotta LA, Falanga V, Kehrl JH, Fauci AS. Transforming growth factor type β : a rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci USA. 83:4167-4171, 1986.

278.-Ignotz RA, Massagué J. Transforming growth factor- β stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation to the extracellular matrix. J. Biol. Chem. 261:4337-4345, 1986.

279.-Laiho M, Saksela O, Keski-Oja J. Transforming growth factor-beta induction of type-1 plasminogen activator inhibitor. Pericellular deposition and sensitivity to exogenous urokinase. J. Biol. Chem. 262:17467-17477, 1987.

280.-Feng P, Catt K, Knecht M. Transforming growth factor β regulates the inhibitory actions of epidermal growth factor during granulosa cell differentiation. J. Biol. Chem. 261:14167-14170, 1986.

- 281.-Hotta M, Baird A. The inhibition of low density lipoprotein metabolism by transforming growth factor-beta mediates its effects on steroidogenesis in bovine adrenocortical cells in vitro. *Endocrinology* 121:150-159, 1987.
- 282.-Assoian RK, Frolik CA, Roberts AB, Miller DM, Sporn MB. Transforming growth factor- β controls receptor levels for epidermal growth factor in NRK fibroblasts. *Cell* 36:35-41. 1984.
- 283.-Wrann M, Bodmer S, de Martin R, Spiel C, Hofer-Warbinek R, Frei K, Hofer E, Fontana A. T cell suppressor factor from human glioblastoma cells is a 12.5 kd protein closely related to transforming growth factor-beta. *EMBO J.* 6:1633-1636, 1987.
- 284.-Like B, Massagué J. The antiproliferative effect of transforming growth factor β occurs at a level distal from receptors for growth activating factors. *J. Biol. Chem.* 261:13426-13429, 1986.
- 285.-Keski-Oja J, Moses HL. Growth inhibitory peptides in the regulation of cell proliferation. *Med. Biol.* 65:13-20, 1987.
- 286.-Mustoe TA, Pierce GF, Thomason A, Gramates P, Sporn MB, Deuel TF. Accelerated healing of incisional wounds in rats

- induced by transforming growth factor-beta. Science 237:
1333-1336, 1987.
- 287.-Marx JL. Cell growth control takes balance. Science 239:
975-976, 1988.
- 288.-Van Zoelen EJJ, Van Oostward TMJ, Van Der Saag PT, De Laat
SW. Phenotypic transformation of normal rat kidney cells
in a growth factor defined medium: induction by a neuroblas-
toma derived transforming growth factor independently of
the EGF receptor. J. Cell. Physiol. 123:151-160, 1985.
- 289.-Hirai R, Yamaoka R, Mitsui H. Isolation and partial purifi-
cation of a new class of transforming growth factor from
avian sarcoma virus transformed rat cell line. Cancer Res.
43:5742-5746, 1983.
- 290.-Dunn TB. Mammary tumors in mice. Ann Ass Advance Sci. 22:
13-18, 1945.
- 291.-Nandi S, Mc Grath C. Mammary neoplasias in mice. Advances in
Cancer Res. 17: 353-358, 1973.
- 292.-Lathrop AEC, Loeb L. Further investigations on the origins
of tumors in mice III. On the part played by internal secre-
tions in the spontaneous development of tumors. J. Cancer

Res. 1:1-6, 1916.

293.-Simkin MB. Mammary tumors in the mice. Amer. Ass. Advance Sci. 22:85-89, 1945.

294.-Loeb L, Kirtz MM. The effect of transplant of anterior lobes of the hipophysis on the growth of the mammary gland and on the development of mamary gland carcinoma in various strains of mice. Am J. Cancer 36: 59-57, 1939.

295.-Yanai R, Nawasawa H. Inhibition of mammary tumorigenesis by ergot alkaloids and promotion of mammary tumorigenesis by pituitary isografts in adeno-ovariectomized mice. J. Natl. Cancer Inst. 48: 715-719, 1972.

296.-Welsch CW, Gribler C. Prophylaxis of spontaneous development of mammary carcinomas in C3H/HeJ female mice by suppression of prolactin. Cancer Res 33:2939-2943, 1973.

297.-Quadri SK, Meites J. Regression of spontaneous mammary tumors in rats by ergot drugs. Proc. Expl. Biol. Med 138: 999-1004, 1971.

298.-Bern HA, Nandi S. Recent studies of hormonal influence of mouse mammary tumorigenesis. Progr. Exptl. Tumor Res. 2: 90-96, 1961.

- 299.-Simkin MB, Wyman RS. Effect of adrenalectomy on mammary tumorigenesis in strain C3H mice. J.Natl. Cancer Inst 6: 187-193, 1945.
- 300.-El Etreby MF, Gunzel P. Prolaktizell-tumoren in Tierexperiment und beim Menschen. Arzneimittel-Forsch (Drug Res) 23: 1768-1772, 1973.
- 301.-El Etreby MF, Graf KJ, Gunzel P, Neuman F. Evaluation of effects of sexual steroids on the hypothalamic-pituitary systems of animals and man. Mechanisms of Toxic Action on some targets organs. Arch. Toxicol. Suppl 2: 11-19, 1979.
- 302.-Jabara AG. Effects of progesterone on 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene induced mammary tumours in Sprague Dawley rats. Brit. J. Cancer 21: 418-423, 1967.
- 303.-Manni A, Badger B, Wright C, Rafeeq Ahmed S, Demers LM. Effects of progestins on growth of experimental breast cancer in culture: interation with estradiol and prolactin and involvement of the polyamine pathway. Cancer Res. 47: 3066-3071, 1987.
- 304.-Watson CS, Medina D, Clark JH. Characterization and estrogen stimulation of cytoplasmic progesterone receptor in ovarian

dependent MXT-3590 mammary tumor line. Cancer Res. 39: 4098-5003, 1979.

305.-Tseng L, Gurside E. Induction of human endometrial estradiol dehydrogenase by progestins. Endocrinology 97: 825-833, 1975.

306.-Bullock LP, Barthe PL, Mawozowic I, North A, Wayne Bardin C. The effects of progestins on submaxillary gland epidermal growth factor: demonstration of androgenic, synandrogenic and antiandrogenic actions. Endocrinology 97: 189-194, 1975.

307.-Murad G, Gilman AG. Estrogens and Progestins. Goodman LS, Gilman A (eds) The Pharmacological Bases of Therapeutics, 5th ed, New York. Macmillan: 1439-1445, 1975.

308.-Lippman ME, Buzdar A, Tormey DC, McGuire WL. Combining endocrine and chemotherapy -Any true benefits? Breast. Cancer Res Treat. 4: 251-259, 1984.

309.-Pannuti F, Martoni A, Lenaz GR. A possible new approach to the treatment of metastasis breast cancer: massive dosis of medroxyprogesterone acetate. Cancer Treat. Rep 62: 499-505, 1978.

- 310.-Robustelli della Cuna G, Pellegrini A, Ganzina F. Chemotherapy and hormonal treatment of advanced breast cancer. Farmitalia Carlo Erba, Milan 1982.
- 311.- Robustelli della Cuna G, Preti P. Advanced breast cancer: hormonedependency and mechanisms of action of medroxyprogesterone acetate. Robustelli della Cuna (ed). The role of high dose medroxyprogesterone acetate in the management of endocrine-related tumors. Bagkok, 1986.
- 312.-Nordqvist S. Effect of progesterone on human endometrial carcinoma in different experimental systems. Acta Genec. Scand 19: 25-30, 1972.
- 313.-Vecchietti G, Gerzeli G, Zanoio L, Novelli GG. Effect of treatment with medroxyprogesterone acetate (MPA) on the DNA content of adenocarcinoma of the endometrium. Minerva Ginecologica 31: 1-6, 1979.
- 314.-Bischoff F, Bryson G. Medroxyprogesterone administration in female Marsh mice (abstract N° 9). Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 18: 3-7, 1977.
- 315.-Nagasawa H, Fujii M, Hagiwara K. Inhibition by medroxiprogesterone acetate of precancerous mammary hyperplastic alveolar nodule formation in mice. Breast Cancer Res Treat.

5: 31-37, 1985.

- 316.-Lanari C, Molinolo A, Pasqualini CD. Inhibitory effect of medroxyprogesterone acetate on foreign body tumorigenesis in mice. JNCI 77: 157-164, 1986.
- 317.-Hsu SM, Raine L, Fanger H. The use of avidin-biotin-peroxidase complex in immunoperoxidase technics. Am. J. Clin. Pathol. 75: 816-821, 1981.
- 318.-Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. Anal. Biochem. 72: 248-254, 1976.
- 319.-Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr Al, Randall RJ. Protein measurements with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275, 1951.
- 320.-Calvo JC, Radicella JP, Charreau EH. Measurement of specific radioactivities in labelled hormones by self-displacement analysis. Biochem J. 212: 259-264, 1983.
- 321.-Korenman SG, Dukes BA. Specific estrogen binding by the cytoplasm of human breast carcinoma. J. Clin. Endocr. Metab. 30: 639-645, 1970.

- 322.-Calandra RS, Charreau EH, Royer de Giaroli M, Baldi A, Calvo JC, Pujato D, Arrighi L. Receptores para esteroides y prolactina en carcinomas mamarios humanos. Medicina (Bs As) 40: 718-725, 1980.
- 323.-Scatchard G. The attraction of proteins for small molecules and ions. Ann. NY Acad Sci 51:660-672, 1949.
- 324.-Thorell JI, Johansson BG. Enzymatic iodination of polypeptide with ^{125}I to high specific activity. Biochem. Biophys. Acta 251: 363-369, 1971.
- 325.-Laemmli UK. Cleavaje of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. Nature 227: 680-685, 1970.
- 326.-Saas B, Dunn TB. Classification of mouse mammary tumors in Dunn's miscellaneous group including recent reported types. JNCI 62: 1287-1293, 1979.
- 327.-Colton T. Statistics in Medicine ,pp 219-222. Little Brown & Co, Boston, 1974.
- 328.-Wilcoxon F, Wilcox RA. Some rapid approximate Statistical Procedures. Multiple Comparison Methods: Several Groups vs

Control. New York, 1964.

- 329.-Barenton B, Patel B, Khan MN, Guyda HJ, Posner BI. Insulin like growth factor-binding protein in hypophysectomized rat liver: characterization and subcellular localization. *Endocrinology* 122: 2499-2507, 1988.
- 330.-Ritvos O, Ranta I, Jalakanen J, Suikkari A-M, Voutilainen R, Bohn H, Rutanen E-M. Insulin-like growth factor (IGF) binding protein from human decidua inhibits the binding and biological action of IGF-I in cultured choriocarcinoma cells. *Endocrinology* 122: 2150-2157, 1988.
- 331.-Martin JL, Baxter RB. Insulin-like growth factor binding proteins (IGF-BP) produced by human skin fibroblasts: immunological relationship to other human IGF-BPs. *Endocrinology* 123: 1907-1915, 1988.
- 332.-Wood WI, Cachianes G, Henzel WJ, Winslow GA, Spencer SA, Helimis R, Martin J, Baxter R. Cloning and expression of the growth hormone-dependent insulin-like growth factor-binding protein. *Mol. Endocrinol.* 2: 1176-1185, 1988.
- 333.-Munson PJ. *Methods in Enzymology*. JJ Langone, H Van Vunakis (eds). Vol 92, p 543. Academic Press NY, 1983.

- 334.-Nickell KA, Halper J, Moses HL. Transforming growth factors in solid human malignant neoplasms. *Cancer Res.* 43: 1966-1971, 1983.
- 335.-Stamper MR, Bartley JC. Induction of transformation and continuous cell lines from normal human mammary epithelial cells after exposure to benzo(a)pyrene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 2394-2397, 1985.
- 336.-Clark R, Milleg R, O'Rourke E, Trahey M, Stampfer M, Kreigler M, McCormick F. Transformation of human mammary epithelial cells with oncogenic retroviruses. *Proceedings of the first Annual Meeting on Oncogenes, Frederick MD, 1985*, p 131.
- 337.-Kassid A, Lippman ME, Papageorge AG, Lowry DR, Gelmann EP. Transfection of v-ras^H DNA into MCF-7 cells bypasses their dependence on estrogens for tumorigenicity. *Science* 228: 725-728, 1985.
- 338.-Kurachi H, Okamoto S, Oka T. Evidence for the involvement of submandibular gland epidermal growth factor in mouse mammary tumorigenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 5940-5943, 1985.
- 339.-Murphy LC, Murphy LJ, Dubik D, Bell G, Shiu RP. Epidermal

growth factor gene expression in human breast cancer cells: regulation of expression by progestins. *Cancer Res.* 48: 4555-4560, 1988.

340.-Osborne CK, Halminton B, Titus G, Livingston RB. Epidermal growth factor stimulation of human breast cancer cells in culture. *Cancer Res.* 40: 2361-1366, 1980.

341.-Fitzpatrick SL, LaChance MP, Schultz GS. Characterization of epidermal growth factor receptor and action on human breast cancer cells in culture. *Cancer Res.* 44: 3442-3447, 1984.

342.-Imai Y, Leuhg CKH, Friesen HG, Shiu RP. Epidermal growth factor receptors and efect of epidermal growth factor on growth of human breast cancer cells in long term tissue culture. *Cancer Res.* 42: 4394-4398, 1982.

343.-Bates SE, McManaway ME, Lippman ME, Dickson RB. Characteriza- tion of estrogen responsive transforming activity in human breast cancer cell lines. *Cancer Res.* 46: 1707-1713, 1986.

344.-Dickson RB, Huff KK, Spencer EM, Lippman ME. Induction of epidermal growth factor related polypeptides by 17 β -estra- diol in MCF-7 cells. *Endocrinology* 118: 138-142, 1986.

345.-Salomon DS, Zwiebel JA, Bano M, Losonczy I, Fehnel P, Kid-

well W. Presence of transforming growth factors in human breast cancer cells. *Cancer Res.* 44: 4069-4077, 1984.

346.-Sluysen M, Van Nie R. Estrogen receptor content and hormone responsive growth of mouse mammary tumors. *Cancer Res.* 34: 3253-3257, 1974.

347.-Gottardis M, Erturk E, Rose DP. Effect of progesterone administration on N-nitrosomethylurea-induced rat mammary carcinogenesis. *J. Canc. Clin. Oncol.* 19: 1479-1484, 1983.

348.-Pannuti F, Camaggi CM, Srocchi E, Giovannini M, Iafelice G, Canova N, Costati B, Murai G. High dose medroxyprogesterone acetate therapy: plasma levels and bioavailability response correlation after single and multiple dose administration in advanced breast cancer patients. Preliminary results. Campio L (ed) *Role of medroxyprogesterone acetate in endocrine related tumors.* Vol 2, Raven Press, New York. 1983

349.-Dao TL, Sinha DK, Nemoto T, Patel J. Effects of estrogen and progesterone on cellular replication of human breast tumors. *Cancer Res.* 42: 359-362, 1982.

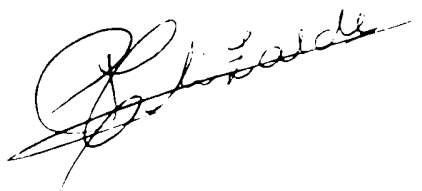
350.-Welsh, Nagasawa H. Prolactin and murine mammary tumorigenesis. A review. *Cancer Res.* 37: 951-963, 1977.

- 351.-Watson CH, Medina D, Clark JH. Estrogen receptor characterization in transplantable mouse mammary tumor. *Cancer Res.* 37: 3344-3348, 1977
- 352.-Dickson RB, Lippman ME. Estrogenic regulation of growth and polypeptide growth factor secretion in human breast carcinoma. *Endocrine Reviews* 8: 29-43, 1987.
- 353.-Osborne CK, Halminton B, Nover M. Receptor binding and processing of epidermal growth factor by human breast cancer cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 55:86-92, 1982.
- 354.-Davidson NE, Gelmann EP, Lippman ME, Dickson RB. EGF receptor gene expression in estrogen receptor positive and negative human breast cancer cell lines. *Endocrinology* 1: 216-223, 1987.
- 355.-Vickers PJ, Dickson RB, Shoemaker R, Cowan KH. A multidrug resistant MCF-7 human breast cancer cell line which exhibits cross resistance to antiestrogens and hormone-independent tumor growth in vivo. *Mol. Endocrinol.* 2: 886-892, 1988.
- 356.-Murphy LJ, Sutherland RL, Stead B, Murphy LC, Lazarus L. Progesterin regulation of epidermal growth factor receptor in human mammary carcinoma cells. *Cancer Res.* 46: 728-734,

1986.

- 357.-Okamoto S, Oka T. Evidence for physiological function of epidermal growth factor: progestational sialoadenectomy of mice decreases milk production and increases offspring mortality during lactation period. Proc. Natl. Acad. Sci USA 81: 6059-6063, 1986.
- 358.-Darve P, Yates J, Curtis S, King RJB. Effect of estradiol on human breast cancer cells in culture. Cancer Res. 43: 349-355, 1983.
- 359.-Huff KK, Knabbe C, Lindsey R, Kauffman D, Bronzert D, Lippman ME, Dickson RB. Multihormonal regulation of insulin-like growth factor-I related protein in MCF-7 human breast cancer cells. Mol. Endocrinol. 2: 200-208, 1988.
- 360.-Huff KK, Knabbe C, Kaufman D, Gabbay KH, Dickson RB. Hormonal regulation of insulin like growth factor I(IGF-I) secretion from MCF-7 human breast cancer cells. Proceedings of the 68th Annual Meeting of the Endocrine Society, Anaheim CA 1986 (Abstract 205).
- 361.-Furlanetto RW, Di Carlo JN. Somatomedin C receptors and growth effects in human breast cancer cells maintained in log term culture. Cancer Res.44: 2122-2128, 1984.

362.-Spencer EM. Synthesis by cultured hepatocytes of somatome-
din and its binding protein. FEBS lett 99:157. 1979.

A handwritten signature in cursive script, appearing to read "E.M. Spencer", written in black ink.

valuedes
7 = 87

