

## Tesis de Posgrado

# Aislamiento, caracterización y expresión de factores de crecimiento y transformación y sus receptores en Adenocarcinomas mamarios inducidos por MPA en hembras BALB/c.

Guerra, Fabiana Karina

1994

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](http://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 doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Guerra, Fabiana Karina. (1994). Aislamiento, caracterización y expresión de factores de crecimiento y transformación y sus receptores en Adenocarcinomas mamarios inducidos por MPA en hembras BALB/c.. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2707\\_Guerra.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2707_Guerra.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Guerra, Fabiana Karina. "Aislamiento, caracterización y expresión de factores de crecimiento y transformación y sus receptores en Adenocarcinomas mamarios inducidos por MPA en hembras BALB/c.". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1994. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2707\\_Guerra.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2707_Guerra.pdf)

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

*AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN Y EXPRESIÓN DE FACTORES DE  
CRECIMIENTO Y TRANSFORMACIÓN Y SUS RECEPTORES EN  
ADENOCARCINOMAS MAMARIOS INDUCIDOS POR MPA EN  
HEMBRAS BALB/c.*

*Autora: Fabiana K. Guerra*

*Director: Dr. Eduardo H. Charreau*

*Co-Director: Dra. Patricia V. Elizalde*

*Lugar de trabajo: Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME)*

*Tesis presentada para optar al título de:  
Doctora en Ciencias Químicas*

*Buenos Aires, 1994.*

*Fabiana*

*g.2*

*A mis padres  
A Esteban y a Claudio.*

## AGRADECIMIENTOS

Al *Dr. Eduardo H. Charreau* por todas sus enseñanzas, por haberme iniciado en la investigación científica y por darme la oportunidad de desarrollar este trabajo de investigación en su laboratorio.

A la *Dra. Patricia Elizalde* por la dirección de este trabajo, por todo su apoyo y su ayuda durante estos años de formación científica.

A la *Dra. Claudia Lanari*, al *Dr. Alfredo Molinolo* y a la *Dra. Christiane Dosne Pasqualini* por sus participaciones en el estudio del modelo experimental y por sus aportes en la discusión de los resultados.

A todos los integrantes de la *Sección de Leucemia experimental de la Academia Nacional de Medicina* por su ayuda en la realización de esta tarea.

Al *Dr. Alberto Kornblith* por todas sus enseñanzas en las técnicas de Biología Molecular.

Al *Dr. Juan Saavedra* y a las *Dras. Gladys Ciuffo* y *Alicia Seltzer* del Instituto Nacional de la Salud (NIH, Washington) por sus enseñanzas en la técnica de Autoradiografía cuantitativa *in vitro*.

A la *Dra. Isabel Luthy*, al *Dr. Omar Pignataro* y al *Dr. Leonardo Bussmann* por sus enseñanzas desinteresadas.

A la *Dra. Paula Stein*, *Lic Daniela Conesa*, *Lic. Horacio Daud*, *Lic. Martín Gravano* y demás compañeros de laboratorio del *Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME)* de todos estos años, por su compañía y ayuda para llevar a cabo esta investigación.

A todo el personal del *IBYME e Instituto de Investigaciones de Ingeniería Genética y Biología Molecular (INGEBI)*, por su amistad y ayuda.

A mis amigas *Gabriela Ferraro, Patricia Schmidt, Laura Uhrig y Ana María Gagliardi*, quienes me alentaron en todo momento.

A mi amiga, la *Dra. Silvana Povo*, junto a quien comencé a trabajar en investigación.

Al *Lic. Esteban Vladusic* por su amor, su paciencia y su estímulo diario.

A mi madre *Beatriz V. de Guerra*, a mi abuela *Elena Telechea*, a *Claudio Guerra*, a *Myriam Castro* y a la *Filia Vladusic* quienes me acompañaron en los momentos buenos y malos, transmitiéndome alegría y esperanza.

Y con todo mi corazón, le agradezco especialmente a mi padre *Oscar Guerra* por la confianza que siempre depositó en mí y porque seguramente estaría orgulloso de este nuevo logro.

*Gracias..*

## ABREVIATURAS

GFs	Factores de Crecimiento polipeptídicos
TGFs	Factores de crecimiento de Transformación
EGF	Factor de crecimiento Epidérmico
EGF-R	Receptor para EGF
IGFs	Factores de crecimiento Insulina similares
IGF-I	Factor de crecimiento semejante a la Insulina tipo I
IGF-II	Factor de crecimiento semejante a la Insulina tipo II
IGF-R1	Receptor para IGFs tipo I
IGF-R2	o
Man 6-P/IGF-II R	Receptor para IGFs tipo II
TGF- $\alpha$	Factor de Transformación tipo $\alpha$
TGF- $\beta$ s	Factores de Transformación tipo $\beta$
TGF- $\beta$ 1	Factor de Transformación $\beta$ 1
TGF- $\beta$ -R	Receptores para TGF- $\beta$ s
Ang II	Angiotensina II
Ang II-R	Receptores para Ang II
AT1	Receptores para Ang II tipo 1
AT2	Receptores para Ang II tipo 2
ACE	Enzima convertidora de Angiotensina
E <sub>2</sub>	Estradiol
P	Progesterona
ER	Receptor de estrógenos
PR	Receptor de progesterona
MPA	Acetato de Medroxiprogesterona
SDS	Dodecil sulfato de sodio
BSA	Albúmina sérica bovina
DSS	Disuccinimidil suberato de sodio
[ <sup>125</sup> I]	Este símbolo colocado delante del nombre de una especie representa su marcación con este isótopo radioactivo

## ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>Cancer de mama. Generalidades</b>	<b>2</b>
<b>Progesterona y Progestágenos sintéticos</b>	<b>5</b>
MPA	6
Usos Clínicos	7
Carcinogenicidad del MPA. Modelos experimentales	8
<b>Modelo experimental de adenocarcinomas mamarios inducidos por MPA en hembras vírgenes BALB/c</b>	<b>9</b>
<b>Factores de Crecimiento y Transformación</b>	<b>13</b>
<b>Factores de Crecimiento semejantes a la Insulina</b>	<b>14</b>
IGF-I e IGF-II, Generalidades	14
IGFs y Cancer de mama	17
Acciones Biológicas de los IGFs en Cancer de mama	19
<b>Receptores para IGFs</b>	<b>21</b>
Receptor tipo I, IGF-R1	21
IGF-R1 y Cancer de mama	22
Receptor tipo II, IGF-R2	24
Actividad biológica del CI-Man 6-P/IGF-II R y relación con cancer de mama	27

<b>Familia del Factor de Crecimiento Epidérmico</b>	<b>29</b>
EGF, Generalidades	29
Producción y actividad biológica del EGF	30
Factor de Transformación $\alpha$	32
Producción y actividad biológica del TGF- $\alpha$	33
TGF- $\alpha$ , EGF y Cancer de mama	34
Receptor de EGF, EGF-R	36
EGF-R y Cancer de mama.	38
<b>Factores de Transformación tipo <math>\beta</math></b>	<b>40</b>
Receptores para TGF- $\beta$ s	42
Actividad Biológica de los TGF- $\beta$ s y Cancer de mama	43
<b>Sistema Renina-Angiotensina</b>	<b>47</b>
SRA y cancer	49
<b>OBJETIVOS</b>	<b>51</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>52</b>
<b>1-Tumores experimentales</b>	<b>53</b>
A) Inducción de adenocarcinomas mamarios por MPA.	53
B) Transplantes singeneicos de los adenocarcinomas mamarios inducidos por MPA.	53
<b>2- Cultivos primarios de células epiteliales o fibroblastoideas de los adenocarcinomas mamarios inducidos por MPA.</b>	<b>54</b>



<b>3- Marcación de Factores de crecimiento con [<sup>125</sup>I]</b>	<b>55</b>
A) Marcación y purificación de EGF	55
B) Marcación y purificación de IGF-I e IGF-II	56
C) Marcación y purificación de TGF-β1	56
<b>4- Purificación, Caracterización y Cuantificación de Factores de crecimiento</b>	<b>57</b>
A) Extracción ácida de Factores de crecimiento	57
B) Ensayos de purificación por columnas VILMAFIX RED 3B-HE	57
C) Cromatografía de exclusión molecular	58
D) Radioinmunoanálisis para EGF	58
E) Radioinmunoanálisis para IGF-I	59
<b>5- Estudio de receptores</b>	<b>59</b>
A) Tratamiento de tejidos para la obtención de receptores para hormonas esteroideas	59
B) Tratamiento de tejidos para la obtención de receptores para factores de crecimiento	60
i- Obtención de receptores para EGF de membranas plasmáticas de placentas humanas a término	60
ii- Tratamiento de tejidos tumorales para la obtención de receptores para EGF, IGF-I, IGF-II.	60
#-Obtención de preparados crudos de membranas para la medición de receptores de EGF	60
##-Obtención de preparados de membranas libres de proteínas transportadoras de IGFs	61
C) Estudios de receptores para Hormonas Esteroideas	61
i- Ensayos Radioligando-Receptor	61

D) Estudios de receptores para EGF, IGF-I e IGF-II	62
i- Ensayos Radioligando-Receptor	62
#-Estudios de la unión del EGF a sus receptores en los tumores experimentales	62
##-Estudios de la unión del IGF-I a sus receptores en los tumores experimentales	63
###-Estudios de la unión del IGF-II a sus receptores en los tumores experimentales	63
####-Ensayos de especificidad de IGF-II e IGF-I a sus respectivos receptores	64
ii- Cuantificación del IGF-II por ensayos radioligando-receptor	64
iii- Ensayos de estabilización covalente de los complejos GF-receptor. Estudios con reactivos de entrecruzamiento.	65
#-Caracterización de los receptores IGF-R1 e IGF-R2	65
##-Caracterización de receptores para TGF- $\beta$ 1	65
###-Electroforesis y autoradiografía	66
E) Ensayos de Autoradiografía <i>in vitro</i>	67
i-Preparación del tejido	67
ii Condiciones del Ensayo	67
#Para la localización, cuantificación y caracterización de receptores para Angiotensina II (receptores tipo 1 o AT1 y tipo 2 o AT2)	67
##Para la localización y cuantificación de la Enzima Convertidora de Angiotensina	68
iii- Autoradiografía.	68

<b>6- Estudios de la expresión del ARNm para los distintos Factores de Crecimiento y Transformación</b>	<b>68</b>
A) Extracción de ARN total	68
i- Obtención de ARN total de tejidos	69
ii- Obtención de ARN de cultivos celulares	69
B) Linealización de ADN plasmídico	70
C) Características de las sondas utilizadas	70
i-Sonda de IGF-I	70
ii-Sonda de IGF-II	70
iii-Sonda de TGF- $\beta$	71
iv-Sonda de TGF- $\alpha$	71
v-Sondas de genes constitutivos	71
#-Gen GAPDH	71
##-Gen HumRPL32	71
D) Ensayos de Protección a la digestión por RNAsa A	72
E) Ensayos de Northern Blott	72
<b>7- Otros métodos</b>	<b>73</b>
A) Estudios histológicos	73
B) Cuantificación de proteínas	73
C) Análisis Estadístico	73

<b>RESULTADOS</b>	<b>75</b>
<b>1- Estudio de la presencia de factores de crecimiento semejantes a la insulina (IGF-I e IGF-II) y sus receptores en los adenocarcinomas de mama inducidos por MPA</b>	<b>76</b>
<b>IGF-I</b>	<b>76</b>
Cuantificación de IGF-I	76
Purificación por cromatografía en Bio-gel P-60	77
Expresión de IGF-I ARNm	79
Cuantificación de receptores IGF-R1	81
Estudios de competencia de la unión [ <sup>125</sup> I}-IGF-I al receptor IGF-R1	84
Caracterización estructural de los receptores IGF-R1	85
Localización tisular de IGF-R1	87
<b>IGF-II</b>	<b>88</b>
Cuantificación y caracterización de receptores IGF-R2	88
Caracterización estructural de los receptores IGF-R2	88
Cuantificación de receptores IGF-R2	91
Estudios de competencia de la unión [ <sup>125</sup> I}-IGF-II al receptor IGF-R2	96
Localización tisular de IGF-R2	97
Determinación del contenido de IGF-II	98
Purificación de IGF-II por cromatografía en Bio-gel P60	100
Expresión de IGF-II ARNm	100

<b>Estudio de la presencia del EGF y EGF-R en los adenocarcinomas de mama inducidos por MPA</b>	<b>103</b>
Determinación del contenido de EGF-R	103
Determinación del contenido de EGF	108
Efecto del MPA en los niveles de EGF	108
Efecto de la sialoadenectomía en los niveles de EGF	109
<b>Estudio de la expresión de TGF-<math>\beta</math>1 y TGF-<math>\alpha</math> ARNm y de sus receptores en los adenocarcinomas mamarios inducidos por MPA</b>	<b>110</b>
Estudios de expresión del TGF- $\beta$ 1 ARNm	110
Estudios de la expresión de TGF- $\alpha$ ARNm	113
Receptores para TGF- $\beta$	113
<b>Estudio de la presencia de componentes del sistema Renina-Angiotensina (SRA) en los adenocarcinomas mamarios murinos inducidos por MPA.</b>	<b>115</b>
Localización tisular de receptores para Ang II	115
Localización y cuantificación de la Enzima Convertidora de Angiotensina (ACE)	120
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>122</b>
<b>CONCLUSIONES GENERALES</b>	<b>139</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>142</b>

# *INTRODUCCIÓN*

## CANCER de MAMA

### GENERALIDADES

Se define al cancer como una enfermedad de origen multifactorial dependiente de factores genéticos, hormonales, ambientales y dietéticos (*Strong, 1977; Vorherr, 1980*). En los países occidentales, el cancer de mama es la enfermedad con mayor incidencia en la población femenina y la de mayor tasa de mortalidad. Las estadísticas demuestran que 1 de cada 8 mujeres puede, en algún momento de sus vidas, padecer dicha enfermedad (*Howell y col., 1993*).

Hace casi 100 años, George Beatson (1896), descubrió que la ovariectomía bilateral causaba regresión tumoral en pacientes premenopáusicas. Este fue el primer hallazgo clínico que demostró una cierta intervención de los estrógenos en la regulación de esta enfermedad. Posteriormente, los métodos terapéuticos utilizados se basaron en técnicas quirúrgicas (ooforectomía, adrenalectomía, hipofisectomía, etc), o en agentes farmacológicos encargados de inhibir la síntesis de estrógenos, la unión a su receptor, etc, (Tabla 1).

**Tabla 1: Desarrollo de la terapia Endócrina.** La fecha indicada representa la primer publicación de cada tipo de terapia desarrollada.

1896	Ovariectomía ( <i>Beatson</i> )
1922	Irradiación de ovarios ( <i>De-Courmelles</i> )
1939	Andrógenos ( <i>Ulrich</i> )
1944	Estrógenos sintéticos ( <i>Haddow</i> )
1951	Progestágenos ( <i>Esher</i> )
1952	Irradiación de glándula pituitaria ( <i>Douglas</i> )
1953	Adrenalectomía ( <i>Huggins</i> )
1953	Hipofisectomía ( <i>Luft</i> )
1971	Antiestrógenos ( <i>Cole</i> )
1973	Inhibidores de la Aromatasa ( <i>Griffiths</i> )
1982	Agonistas de LHRH ( <i>Klijn</i> )
1987	Antiprogestágenos ( <i>Romieu</i> )
1993	Antiestrógenos "puros" ( <i>Howell</i> )

Hoy en día existen al menos 10 tipos distintos de terapias endócrinas y en general todos los pacientes presentan respuestas y tiempos de sobrevida similares. Esta observación permite hipotetizar que, todos los tratamientos podrían actuar por un mecanismo en común tal como la privación de la estimulación estrogénica. Esta hipótesis es aún apoyada por el análisis de los supuestos mecanismos de acción para las diferentes terapias endócrinas empleadas. El antiestrógeno Tamoxifeno es un antagonista competitivo del estradiol ( $E_2$ ) por su receptor. La ooforectomía, la inhibición de la aromatasas y la adrenalectomía, reduce la exposición de la célula tumoral a  $E_2$  por disminución de su síntesis. Por otro lado, es interesante recalcar que tanto la adición (en concentraciones farmacológicas) como el bloqueo de los estrógenos (por las terapias nombradas) inhiben la proliferación celular en cáncer de mama (*Reddel y Sutherland, 1984*). Los caminos por los cuales dosis altas de estrógenos producen una disminución del crecimiento tumoral, todavía no se han dilucidado, pero se supone una regulación negativa de la síntesis del ER por  $E_2$ . De igual forma, los mecanismos precisos de la acción de los andrógenos y progestágenos en la regulación del cáncer de mama no se conocen hasta el momento.

En el cáncer de mama, la expresión de receptores para estrógenos (ER) y progesterona (PR) se asocia, en general, con un mejor pronóstico de la enfermedad (*Henderson y col., 1989; Wittliff y col., 1984*). Sin embargo, se observa que algunos pacientes con tumores ER<sup>-</sup> y/o PR<sup>-</sup>, presentan carcinomas mucho más agresivos, que reducen la sobrevida del paciente (*Maas y col., 1980; Wittliff y col., 1984*). Una posibilidad de este comportamiento más agresivo está relacionado por la influencia de otras hormonas tal como las hormonas polipeptídicas y factores de crecimiento. Estos últimos pueden a través de sus efectos autocrinos y/o paracrinos determinar un comportamiento tumoral más agresivo, una mayor velocidad proliferativa y un estado hormono-independiente.

Los estudios efectuados *in vitro* revelaron que los estrógenos (en concentraciones fisiológicas) estimulan la proliferación de las líneas celulares de cáncer de mama humanas controlando un gran número de genes reguladores del crecimiento, entre los que se incluyen a los involucrados en la progresión del ciclo celular (tal como los genes de c-fos, c-myc, ciclinas y ciclinas-quinasas), en la regulación de la respuesta de las células tumorales a los factores de crecimiento y en la producción de factores de crecimiento (*Wilding y col., 1988; Musgrove y*



*col.*, 1993, *Stewart y col.*, 1992). Stewart y col. (1992), demostraron que el tratamiento de las células de cancer de mama humano, MCF-7, con E<sub>2</sub> incrementaba los efectos proliferativos de la Insulina, por medio de un aumento de la expresión del receptor tipo I para los factores de crecimiento semejantes a la Insulina (IGF-R1). Por otro lado, los estrógenos también aumentaban la secreción del factor de transformación  $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ), el cual estimula en forma autocrina la proliferación de las células tumorales, por interacción con el receptor para el factor de crecimiento epidérmico (EGF-R).

A pesar de todas las terapias endócrinas utilizadas, todavía no se observaron modificaciones en la tasa de mortalidad, debido a que inevitablemente luego de un cierto tiempo, los tumores mamarios pueden hacerse resistentes a una primer terapia pero responder a una segunda (tumores parcialmente resistentes) o ser completamente resistentes (*Howell y col.*, 1993). Entre los mecanismos para una resistencia total se incluyen: i)- la ausencia de expresión de ER, ii)- la expresión de una variante de ER con una función anormal, iii) el desarrollo de mecanismos de crecimiento ER-independientes. Entre estos últimos se incluye la sobreexpresión, amplificación, delección o mutación de genes regulatorios.

Por lo tanto, una mejor interpretación de los sistemas involucrados en la regulación del cancer de mama puede resultar de gran importancia en la dilucidación de la biología del crecimiento tumoral, con el fin de obtener nuevas estrategias terapéuticas para la prevención y control de esta enfermedad.

## PROGESTERONA Y PROGESTÁGENOS SINTÉTICOS

Se sabe que la Progesterona es la hormona sexual femenina diferenciante, encargada de inhibir los efectos proliferativos de los estrógenos y de dirigir los tejidos hacia una función diferenciada normal. Por otro lado también es conocida su función en el control de la ovulación y de comportamientos relacionados con la receptividad sexual. Es de considerar también, que el efecto de la progesterona no es siempre antiproliferativo ya que la misma se encarga de la proliferación del estroma uterino necesaria para la implantación del óvulo fecundado y del desarrollo lobuloalveolar de la glándula mamaria para la lactancia (*Clarke y col.*, 1990).

Muchos trabajos destacan el uso de progestágenos sintéticos en farmacología, en forma de anticonceptivos orales administrados para el tratamiento del cancer de mama y de endometrio y en terapias hormonales de mujeres postmenospáusicas.

El **Acetato de Medroxiprogesterona (MPA)** y el **Acetato de Megestrol (MA)** son los progestágenos sintéticos mas utilizados en el tratamiento del cancer de mama. Los mecanismos exactos de la acción antitumoral todavía no se han dilucidado, aunque existen varias explicaciones posibles (*Clarke y col.*, 1990; *Sante y col.*, 1990). En líneas celulares de cancer de mama humanas se demostró una acción antiproliferativa directa de estos progestágenos, lo cual alabaría los beneficios de la progesterona en el tratamiento del cancer, pero todavía es bastante incierto el uso de la misma por grandes períodos de tiempo como anticonceptiva o para profilaxis de la menopausia. Generalmente el uso de la progesterona junto con estradiol en mujeres postmenospáusicas se debe su acción antiestrogénica evitando los efectos secundarios de los estrógenos en el desarrollo de carcinomas de endometrio, pero debido a que la proliferación del epitelio mamario es máxima en la fase luteal, se pensó en la posibilidad de que la administración conjunta de ambas hormonas podría causar ciertos efectos proliferativos inapropiados que deberían ser considerados. Debido a estas incógnitas es necesario dilucidar si la progesterona independientemente de la acción de los estrógenos puede ejercer algún efecto *in vivo* sobre la proliferación celular.

Los trabajos realizados hasta el momento, se relacionan con la administración de progesterona a animales intactos, ovariectomizados o inmaduros y con el estudio de los cambios de sus niveles séricos. Con respecto al desarrollo y crecimiento de tumores mamarios hormono-dependientes, todavía no se dilucidó cuales son los mecanismos por los cuales la progesterona puede controlar la proliferación tumoral.

Algunos modelos experimentales en animales sirvieron para aclarar la relación entre la acción hormonal y la inducción del cancer. Se reportó que la progesterona puede tanto estimular como inhibir el crecimiento de tumores experimentales dependiendo de la dosis y la estrategia experimental utilizada. La estimulación del crecimiento se demostró en tumores de rata inducidos por carcinógenos (*Huggins y col.*, 1962a, b), en tumores mamarios espontáneos de ratón en hembras preñadas (*Matsuzawa y col.*, 1974; *Van Nie y col.*, 1965) y en tumores murinos inducidos por transplantes del lóbulo anterior de la hipófisis (*Loeb y col.*, 1939). Hasta el momento se cuenta con muy poca información acerca de los efectos de la progesterona sobre la síntesis de DNA en carcinomas mamarios. En el tumor murino transplantable MXT, se observó que la progesterona aumentaba la incorporación de timidina similarmente a lo observado luego de un tratamiento con estrógenos (*Kiss y col.*, 1986). Este efecto de muy poco tiempo de duración, se debía tal vez a la rápida metabolización de la progesterona o a la habilidad del esteroide para estimular solamente una sola vuelta de replicación celular.

## MPA

El MPA es un progestágeno sintético derivado del pregnano (17- $\alpha$ -acetoxiprogesterona). Los derivados del pregnano, en particular el MPA, tienen una actividad antiestrogénica muy alta parecida a la de la progesterona (*Tseng y col.*, 1975). Sin embargo, existen estudios que indican que el MPA puede tener propiedades estrogénicas, cuando es aplicado a altas concentraciones, tal como la estimulación de la secreción de prolactina en mujeres tratadas con este progestágeno (*El Etreby y col.*, 1979). Por otra parte, el MPA también puede tener cierta actividad androgénica al unirse a los receptores de testosterona. En las glándulas salivares de ratones hembras y machos castrados este proceso conduciría

a un aumento en la síntesis del factor de crecimiento epidérmico (EGF) (*Bullock y col., 1975*).

## USOS CLINICOS

El MPA es administrado en el tratamiento de la amenorrea secundaria, la metrorragia uterina disfuncional y la endometriosis (*Murad y col., 1975*). En algunos países se lo utiliza como anticonceptivo, en la prevención de abortos espontáneos recurrentes, para el tratamiento de la dismenorrea, tensión premenstrual, infertilidad luteal, pubertad precóz y diagnóstico de embarazo (*Sun, 1984*). También se lo emplea en el tratamiento de carcinomas de mama, de endometrio, de próstata y de ovario (*Campio y col., 1983*). Durante los últimos años se utilizaron dosis altas de MPA para el tratamiento de pacientes con cancer de mama avanzado, obteniéndose respuestas positivas en un 30 al 40% de los casos (*Cortés Funes y col., 1983; Ganzina, 1979; Schulz y col., 1985*). Además se observó una relación directa entre la eficacia de la terapia y la presencia de ER (*Schulz y col., 1985*).

Se han propuesto varios mecanismos para explicar la actividad terapéutica del MPA sobre el cancer de mama avanzado. Fundamentalmente su acción antitumoral se debería a: 1) su interacción con hormonas circulantes y 2) un efecto inhibitorio celular directo.

### 1) Interacción con hormonas circulantes: estrógenos y progesterona:

En los tumores de mama hormono-dependientes, los estrógenos estimularían el crecimiento tumoral y los andrógenos adrenales podrían ser aromatizados y convertidos en estrógenos en el tejido adiposo. Por lo tanto la disminución de los niveles circulantes de ambas hormonas son importantes en la terapia antitumoral. La acción antiestrogénica del MPA tiene lugar a) bloqueando la secreción de gonadotrofinas a nivel de la hipófisis; b) bajando las concentraciones de estradiol intracelular; c) reduciendo la transformación de andrógenos a estrógenos al inducir la 5- $\alpha$ -reductasa hepática la cual aceleraría el catabolismo de los andrógenos (*Robustelli Della Cuna y col., 1986*).

La acción antiandrogénica se ejercería a través de la disminución de los niveles de testosterona circulante por: a) inhibición de la secreción de la hormona luteinizante (LH) hipofisaria; b) aceleración del metabolismo de la testosterona a través de la inducción de la 5- $\alpha$ -reductasa hepática (*Robustelli Della Cuna y col.*, 1986).

2) Efectos a nivel celular: El MPA se une con alta afinidad a los PR, bloquea la síntesis de los ER y se une con menor afinidad a los receptores para andrógenos y corticosteroides. Además se han propuesto efectos citotóxicos directos no mediados por mecanismos endócrinos, que explicarían la actividad inhibitoria de altas dosis de MPA sobre tumores hormono-independientes (*Schultz y col.*, 1985).

*In vitro* se observó que el MPA inhibe en más de un 80% la unión del 17- $\beta$ -estradiol a su receptor y que regula negativamente los PR (*Robustelli Della Cuna y col.*, 1986). Para superar esta regulación negativa, que llevaría a una resistencia al tratamiento, se propone el uso de terapias secuenciales con tamoxifeno (*Namer y col.*, 1980).

## **CARCINOGENICIDAD DEL MPA. MODELOS EXPERIMENTALES**

En varios sistemas experimentales, el tratamiento con MPA produjo un aumento en la incidencia tumoral. En perros *Beagle* su administración indujo un aumento en el número de hiperplasias lobulillares. Las tres cuartas partes de los perros tratados con dosis altas de MPA desarrollaron tumores metastásicos mientras que en los controles ningún animal presentó tumores malignos (*Concannon y col.*, 1980; *Frank y col.*, 1979). También en monos *Rhesus* se observó la aparición de carcinomas endometriales luego de la administración de altas dosis de MPA (*Sun*, 1984). En los tumores mamarios de rata inducidos por DMBA, un modelo clásico para el estudio de la dependencia hormonal del cancer de mama, el tratamiento con MPA dió lugar a resultados controvertidos. *Danguy y col.* (1980), demostraron que la administración de altas dosis de MPA inhibía el crecimiento tumoral mientras que dosis bajas poseían un efecto opuesto. En cambio, *Russo y col.* (1989) demostraron que el MPA no solo no protegía de la tumorigénesis química cuando se utilizaban dosis similares a las usadas para la

anticoncepción, sino que además, cuando la dosis se aumentaba 10 veces, la diferenciación de la glándula mamaria se inhibía con un consecuente aumento de la incidencia tumoral. Por otro parte, el MPA también aumentó la incidencia tumoral en la cepa SHN, portadora del virus MMTV (*Nagasawa y col.*, 1988)

En monos (*Macaca fascicularis*) se comprobó que la administración de una única dosis de MPA a hembras preñadas tuvo efectos tóxicos específicos sobre los embriones con anomalías en los genitales externos de los fetos y en presencia de la dosis mas alta se observó hipoplasia y/o atrofia de las adrenales (*Prahdala y col.*, 1985).

### **Modelo experimental de adenocarcinomas mamarios inducidos por MPA en hembras vírgenes BALB/c**

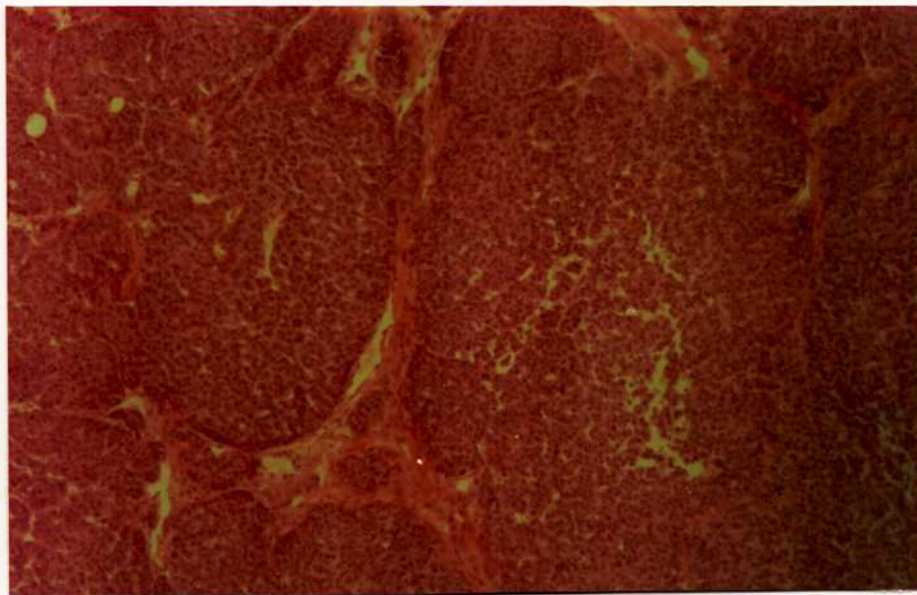
El hallazgo de que el MPA inducía adenocarcinomas mamarios en ratones hembras BALB/c, el modelo estudiado en este trabajo, fue casual. Muchas evidencias indicaban que los progestágenos podían tener un efecto anti-inflamatorio y anti-fibrótico, decidiéndose a estudiar si el MPA podía inhibir el desarrollo de fibrosarcomas inducidos por la implantación subcutánea de un cuerpo extraño (*Lanari y col.*, 1986a). Inesperadamente en el curso de dicha investigación, se registró una alta incidencia de adenocarcinomas de mama en las pocas hembras tratadas con MPA. Tomando como base esta observación, se diseñó un experimento para comprobar si dicho progestágeno tenía capacidad carcinogénica en esta cepa. Durante un año se inocularon, cada dos meses, 40 mg de MPA en *pellets* de liberación continua, a hembras vírgenes y el resultado fue la aparición de tumores de mama con una incidencia actuarial del 76% y una latencia media de  $52 \pm 2$  semanas (*Lanari y col.*, 1986b).

Por análisis histológico de estos tumores mamarios, se demostró que la mayoría eran carcinomas ductales, principalmente quísticos, infiltrativos y con distintos grados de diferenciación (*Molinolo y col.*, 1987). Las lesiones preneoplásicas detectadas fueron, en su mayoría, displasias y carcinomas *in situ* de origen ductal (*Molinolo y col.*, 1987) y un muy pequeño número de las mismas provenían de proliferación lobulillar.

En los ratones portadores o infectados con MMTV, las lesiones preneoplásicas más frecuentes eran las de origen lobulillar (*Nandi y col., 1973*), mientras que en los animales tratados con carcinógenos químicos predominaban las lesiones ductales (*Medina, 1976; Medina y col., 1977*). Por lo tanto las alteraciones morfológicas que producía el MPA en la glándula mamaria eran mas parecidas a las inducidas por los carcinógenos químicos que por el MMTV.

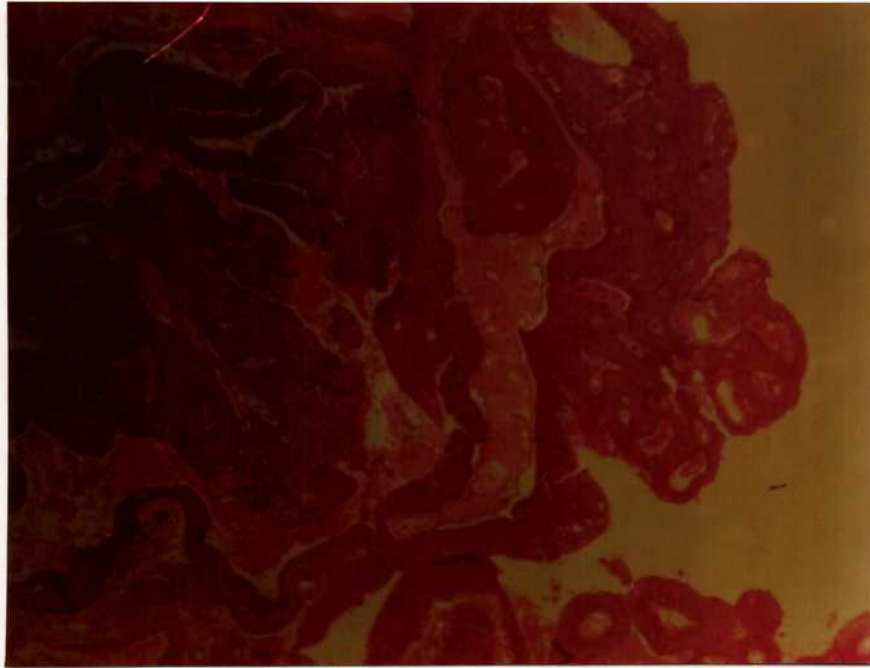
Los carcinomas lobulillares se caracterizaban por estar compuestos de células atípicas redondas o poligonales, con un alto índice mitótico. El estroma era escaso. No se observaron metástasis. En la figura 1, se muestra la imagen característica de un carcinoma lobulillar. Los carcinomas ductales consistían en estructuras quísticas, tapizadas por epitelio glandular con varias capas de células con diferenciación tubular ocasional. El índice mitótico era en general bajo. El estroma era fibroso y mostraba una extensa infiltración linfoplasmocitaria. En la figura 2, se muestra la imagen característica de un carcinoma ductal.

Los niveles de PR y/o ER en los tumores inducidos por MPA fueron superiores a los detectados en tumores de mama espontáneos de hembras multíparas; en cambio los de prolactina fueron similares (*Molinolo y col., 1987*).



**Figura 1:** Carcinoma lobulillar compuesto por grupos de células que diferencian islotes o cordones sólidos y que en áreas tienden a formar tubos glandulares o acinos de luz pequeña. El estroma es fibroblástico y escaso, y el tumor está bien vascularizado (Hematoxilina-Eosina, 40X).



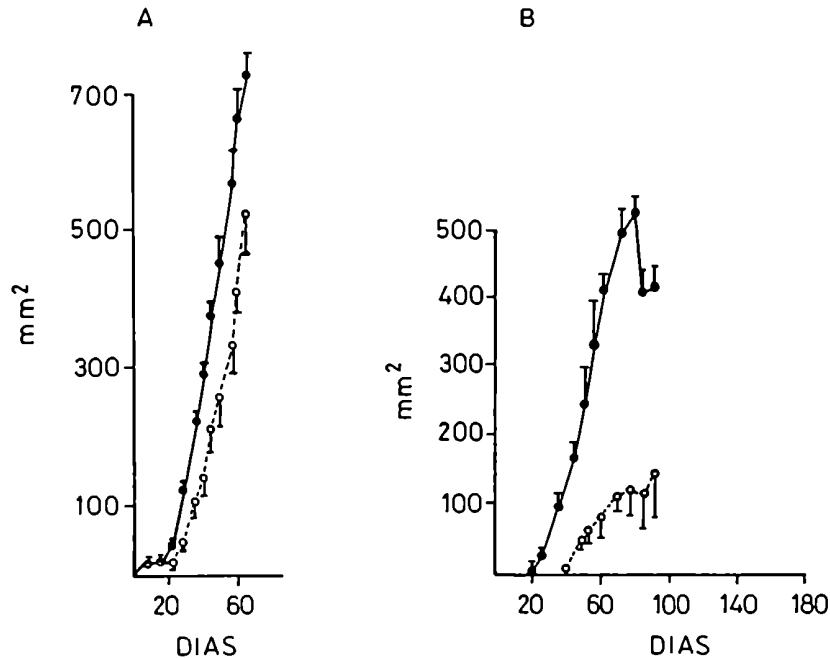


**Figura 2:** Carcinoma ductal. El tumor está compuesto por grupos de células que forman láminas sólidas. Éstas delimitan una cavidad quística irregular que contiene sangre, células descamadas y material amorfo. La lesión infiltra extensamente en el estroma adyacente que es fibroblástico denso. La vascularización es completa (Hematoxilina-Eosina, 40X)

Algunos de los adenocarcinomas inducidos por MPA fueron transplantados en hembras BALB/c vírgenes sin tratamiento hormonal. Los tumores que crecieron a partir de estos trasplantes tuvieron un período de latencia de 4 a 12 meses y dieron origen a varias líneas tumorales que se mantuvieron por sucesivos pasajes en hembras tratadas y no tratadas con MPA. Estas líneas se clasificaron en autónomas u hormono-independientes (HI) y dependientes de MPA (HD) según la respuesta de los tumores transplantados al tratamiento hormonal (figura 1). En las líneas HI los ratones tratados o no con MPA, presentaban tumores de gran tamaño ( $>400 \text{ mm}^2$ ) a los 2 meses del pasaje, mientras que los adenocarcinomas HD alcanzaban tamaños muy pequeños ( $<150 \text{ mm}^2$ ) aún 6 meses después de ser transplantados. Además en estos últimos, entre los animales tratados y no tratados con MPA, existían diferencias significativas en la latencia de aparición como en la velocidad de proliferación tumoral (Lanari y col., 1989).



Luego de varios pasajes sucesivos algunas líneas HD experimentaron un aumento intrínseco de su velocidad proliferativa de forma tal que aparecieron tumores con histología ductal y comportamiento autónomo. Los tumores HI de histología lobulillar o ductal se caracterizaban en general por poseer niveles bajos o variables de ER y PR, respectivamente.



**Figura 3:** Crecimiento tumoral de dos líneas derivadas de un mismo tumor ductal primario inducido por MPA, transplantadas en ratones tratados (●) y no tratados (○) con MPA. En el caso del pasaje 1HD (B) las diferencias en tamaños tumorales eran estadísticamente significativas (Test t de Student,  $p < 0.05$ ), a diferencia de lo observado en la línea tumoral 1HI (A).

El hecho de contar con este modelo tumoral murino *in vivo* inducido por una hormona supuestamente inhibidora de la proliferación celular, como el **Acetato de Medroxiprogesterona**, nos permitió dilucidar algunos de los mecanismos involucrados en la respuesta positiva de los distintos tumores al MPA, como también en aquellos tumores que han "escapado" al control hormonal.

## FACTORES DE CRECIMIENTO Y TRANSFORMACIÓN

Los Factores de crecimiento (GFs) y de Transformación (TGFs), constituyen un grupo de polipéptidos regulatorios involucrados en el control de la proliferación y diferenciación celular (*Bradshaw, 1987*). Se unen a receptores de membrana generalmente asociados a una actividad de tirosina-quinasa. La respuesta mitogénica de estos polipéptidos se produce al permitir a las células en estado quiescentes, en fase Go, entrar y proseguir a través del ciclo celular. Por otro lado, las citoquinas, tal como el TGF- $\beta$  (factor de transformación tipo  $\beta$ ), poseen la capacidad de antagonizar los efectos proliferativos de los GFs (*Aaronson, 1991*).

La relación entre GFs y TGFs y cancer comenzó a principios de 1980, por determinación de la homología existente entre las secuencias aminoacídicas de los GFs o de sus receptores con las proteínas producidas por varios oncogenes virales (*Doolittle y col., 1983; Waterfield y col., 1983*). Por otro lado, por estudios de crecimiento celular en medios libres de suero, se postuló que la expresión desregulada de GFs podía estimular el crecimiento autónomo de las células neoplásicas (*Todaro y col., 1979*).

Adicionalmente se demostró, que tanto los esteroides como los antagonistas esteroideos podían regular el crecimiento de las líneas celulares de cancer de mama influenciando la expresión y secreción de los GFs y TGFs. De esta forma, la estimulación del crecimiento por esteroides podía ser el resultado tanto del aumento en la secreción de factores de crecimiento mitogénicos, como de la disminución de la producción de factores inhibitorios. Por otro lado, la inhibición del crecimiento sería el resultado de los procesos inversos (*Dickson y col., 1986a; Brunner y col., 1989*).

Hasta el momento, se han descrito varias familias de GFs entre las que se incluyen a los factores de crecimiento semejantes a la insulina (IGF-I e IGF-II), al factor de crecimiento epidérmico (EGF y TGF- $\alpha$ ), al factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), al factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), etc, algunas de las cuales se detallarán a continuación.

## **FACTORES DE CRECIMIENTO SEMEJANTES A LA INSULINA**

La familia de factores de crecimiento semejantes a la insulina está compuesta por dos ligandos (factor de crecimiento semejante a la insulina tipo I (IGF-I) y tipo II (IGF-II)), tres receptores (los receptores para IGFs tipo I (IGF-R1) y tipo II (IGF-R2) y el receptor híbrido Insulina/IGF-R1) y 6 proteínas transportadoras de IGFs, conformando un sistema complejo debido a las múltiples interacciones entre todos estos polipéptidos (*Krywicky y col., 1992*).

En la sangre, fluidos extracelulares y en medios de cultivos los IGFs se unen a las proteínas transportadoras específicas, cuya función se supone que consiste en modular sus efectos biológicos, los que se realizan principalmente por medio de los receptores IGF-R1 e IGF-R2 (*Nissley y col., 1984*).

### **IGF-I e IGF-II, GENERALIDADES**

Los factores de crecimiento semejantes a la insulina (IGFs) son péptidos monoméricos con tres puentes disulfuros intracatenarios, presentando un 60% de homología entre sí y un 45% con la proinsulina (*Rinderknecht y col., 1978a y b*).

La organización de intrones y exones de los genes de IGF-I e IGF-II, a lo largo de toda la región codificante, está altamente conservada, con variaciones en la posición de los promotores y largo de los intrones (*Dull y col., 1984*). La expresión de estos genes comparte ciertas características: i) Por transcripción se obtienen ARN mensajeros (ARNm) con un rango de tamaños muy heterogéneo, con secuencias no traducibles 3' y 5' muy divergentes, ii) Por procesos como el "splicing alternativo" y por la presencia de distintos sitios de poliadenilación se sintetizan transcritos de tamaños característicos.

**\*IGF-I:** posee 70 aa con un peso molecular de 7.5 KDa. Es una proteína básica con un punto isoeléctrico de 8.6 (*Humbel y col., 1990; Salmon y col., 1957; Klapper y col., 1983; Daughaday y col., 1989*), que posee cuatro dominios: A, B, C y D. Se determinó que el dominio B es importante en el reconocimiento del sitio de unión al IGF-R1 y que el dominio C determinaría la estructura conformacional necesaria para la mayor efectividad de la unión (*Bayne y col., 1988, De Vroede y col., 1985*).

El IGF-I se sintetiza como un precursor (propéptido) que abarca al péptido maduro (en la zona amino-terminal) y a un dominio adicional E (en la zona carboxi-terminal). Existen dos propéptidos distintos denominados **IGF-Ia** e **IGF-Ib** que difieren en sus dominios E (*Rotwein y col.*, 1986b; *de Pagter y col.*, 1986; *Tobin y col.*, 1990).

Se ha demostrado por estudios de radioligando-receptor, por radioinmunoensayo o por el uso de anticuerpos específicos contra el péptido maduro o contra el dominio E, la presencia de precursores con pesos moleculares de 21, 19, 14, 11, etc KDa en distintos sistemas (*Clemmons y col.*, 1986; *Mills y col.*, 1986; *Powell y col.*, 1987).

**GEN de IGF-I:** Los genes de IGF-I humanos y murinos poseen un arreglo general, comprendiendo al menos 5 exones separados por 4 intrones (*Rotwein y col.*, 1986a; *Shimatsu y col.*, 1987a; *Roberts y col.*, 1987).

Por los ADNc aislados de bibliotecas humanas y murinas, se demostró que hay una posición de *splicing* entre los exones 3/4 y 3/5, que conducirían a la transcripción de las dos formas alternativas de ARNm para IGF-I (IGF-Ia e IGF-Ib). Ambas codificantes del péptido maduro de 70 aa (*Rotwein y col.*, 1986b).

Por ensayos de Northern Blot en distintos tejidos humanos y de roedores, se obtuvieron distintos transcritos de IGF-I con tamaños de 7.0 a 7.8, 1.7 a 2.0, y 0.8 a 1.2 Kilobases (Kb) (*Jansen y col.*, 1987; *Rotwein y col.*, 1986b; *Han y col.*, 1988; *Höpener y col.*, 1988; *Rappolee y col.*, 1989). También se han encontrado especies de menor tamaño.

Los IGF-I ARNm se detectan recién en embriones de ratón de 7.5 días de gestación, sugiriendo una inducción tardía del gen (*Rappolee y col.*, 1989). En roedores adultos y en humanos los mayores niveles de expresión de IGF-I se encuentran en el hígado, lo cual es consistente con su papel como mediador del crecimiento somático a través de sus niveles séricos (*Schoele y col.*, 1982) y con el hecho de que los niveles de IGF-I ARNm hepáticos son regulados por la hormona de crecimiento (GH) (*Mathews y col.*, 1988). Existe también expresión de IGF-I

periferal regulada o no por GH, apoyando el modo de acción autocrino-paracrino del IGF-I.

**\*IGF-II:** posee 67 aa, un peso molecular de 7.5 KDa y es un péptido neutro (pI:7) (*Daughaday y col.*, 1989; *Acquaviva y col.*, 1982; *Yang y col.*, 1985a y b). Está compuesto por 4 dominios: B, C, A y D y se sintetiza como un propéptido con un dominio adicional E. A diferencia del IGF-I, en este último los dominios E son idénticos (*Bell y col.*, 1984; *Soares y col.*, 1985).

Por marcación *in vivo* de proteínas, con [<sup>35</sup>S]-Cys, se detectaron precursores con tamaños de 22 y 20 KDa en células BRL 3A de rata y con tamaños de 15, 8, y 7 KDa en su medio condicionado (*Yang y col.*, 1985a). Moses y col. (1980a y b), demostraron que estos precursores poseían la capacidad de unirse a receptores, a proteínas transportadoras y a anticuerpos específicos y estimular la incorporación de timidina en las células nombradas. Por otro lado, Zumstein y col. (1985), purificaron un precursor de 10 KDa y Gowan y col. (1987), uno de 15 KDa del suero humano.

**GEN de IGF-II:** El gen de IGF-II está localizado cerca de los genes de Insulina y de tirosina hidroxilasa (*Bell y col.*, 1984; *O'Malley y col.*, 1988). Los genes de IGF-II mejor caracterizados son los del humano y de rata, conteniendo la misma organización básica con algunas regiones regulatorias en común (*de Pagter y col.*, 1986 y 1987; *Soares y col.*, 1986; *Ueno y col.*, 1987a).

El gen de IGF-II de rata posee tres exones no-codificantes (exones 1,2 y 3), cada uno con su propio promotor (P1, P2 y P3) y 3 exones codificantes (exones 4,5 y 6) (*Dull y col.*, 1984; *Ueno y col.*, 1987b). El gen de IGF-II humano posee una estructura mas compleja consistiendo en 8 exones y 4 promotores. Los promotores tienen una expresión tejido-específica y dependiente del estadio del desarrollo (*de-Pagter y col.*, 1987).

La transcripción del gen de IGF-II muestra una gran variedad de ARNm los cuales difieren en las regiones 5' y 3' no codificantes (*de-Pagter y col.*, 1986 y 1987; *Soares y col.*, 1986; *LeBouc y col.*, 1987).

El gen de IGF-II se expresa en varios tejidos fetales y neonatales, con niveles de 100-600 veces más abundantes que los de IGF-I ARNm (*Ueno y col.*, 1987a ). En el ratón, los transcritos de IGF-II se detectan durante la preimplantación (*Werb y col.*, 1990; *Rappolee y col.*, 1989 ), mientras que en el humano, el IGF-II ARNm se detecta luego de la implantación (*Ohlsson y col.*, 1989). Se demostró que una supresión de la transcripción del IGF-II endógeno conduce a una disminución del desarrollo fetal (*Werb y col.*, 1990). En contraste con los sistemas murinos, varios tejidos en el humano adulto poseen niveles detectables de IGF-II ARNm, pero aún así la cantidad encontrada en hígado y en riñón es mucho menor que la observada en el estado fetal (*de-Pagter y col.*, 1988).

### **IGFs y CANCER DE MAMA**

En ciertos tumores se demostró la existencia de la maquinaria suficiente para la producción de IGFs. *Reeve y col.* (1985) y *Scott y col.* (1985) demostraron la existencia de niveles de IGF-II ARNm elevados en tumores de Wilms, con respecto a los determinados en riñón normal. Esto mismo se observó en otros sistemas tumorales, tal como el caso de tumores de colon (*Tricoli y col.*, 1986), leiomiomas y leiomiomas (*Hoppener y col.*, 1988), rhabdomiosarcomas, hepatomas (*Gray y col.*, 1987), tumores neuroectodermales (*Tricoli y col.*, 1986; *Gray y col.*, 1987), etc. Utilizando técnicas como radioinmunoensayo o ensayos radioligando-receptor específicos para IGF-II, se determinó la presencia de dicho péptido en los sistemas nombrados.

Con respecto al IGF-I en cáncer de mama, los resultados son muy controvertidos. Se aislaron proteínas semejantes al IGF-I, en medios condicionados de varias líneas celulares de cáncer de mama (*Huff y col.*, 1986; *Minuto y col.*, 1987), demostrándose que las mismas no correspondían a un verdadero IGF-I sino a sus proteínas transportadoras (*Ashmed y col.*, 1989).

La expresión de IGF-I ARNm se estudió en primer lugar por ensayos de Northern Blot y Dot Blot, utilizando una sonda de ADNc del IGF-I humano. Los resultados demostraron que las bandas obtenidas, en las líneas celulares de cáncer de mama testeadas, no correspondían al tamaño de los transcritos observados en hígado normal humano (*Yee y col.*, 1989). Posteriormente con la utilización de un ensayo mucho más sensible y específico, como el de Protección a la digestión por

Ribonucleasa A (RNAsa A), Yee y col. (1989), determinaron que ninguna de las líneas celulares expresaban IGF-I ARNm. Hasta ahora no se han encontrado líneas celulares de cancer de mama que expresen los transcritos auténticos de IGF-I.

En sistemas de xenograft, *in vivo*, se demostró que solamente el denominado T61, de cancer de mama humano, expresaba un transcripto para IGF-I con un tamaño diferente a los detectados en hígado normal humano ( *Tobin y col.*, 1990).

Los resultados obtenidos con biopsias de tumores mamarios humanos, demostraron que el tejido no-epitelial sería el responsable de la expresión observada o que la misma dependería de factores no reproducidos *in vitro*, en cultivo ( *Yee y col.*, 1989). Por estudios de hibridización *in-situ*, se comprobó que la expresión del IGF-I provenía del estroma del tejido normal circundante al tejido tumoral y no del epitelio maligno o del estroma tumoral. Por lo tanto en cancer de mama humano, parecería hasta el momento que el IGF-I actuaría como un factor paracrina producido por el estroma normal, el cual induciría la proliferación celular del epitelio normal o del maligno de la glándula mamaria.

La expresión del IGF-II ARNm se evaluó también en varias líneas tumorales de cancer de mama. *Yee y col.* (1988), estudiaron la presencia de dichos transcritos en 10 líneas celulares de cancer de mama humano ( T47D, ZR75B, MCF-7, MDA-MB 231, Hs578T, BT549, SKBR3, MDS-MB 486, MDA-MB 436 y HBL 100) por ensayos de Protección a la RNAsa A. Solamente en la línea T47D, se detectó la presencia de IGF-II ARNm. También el xenograft T61 expresaba IGF-II ARNm y contenía niveles detectables del péptido ( *Brünner y col.*, 1992).

El estudio de la expresión de IGF-II ARNm en biopsias de tumores mamarios humanos demostró la presencia del auténtico mensaje para IGF-II en todos los casos testeados ( *Yee y col.*, 1988). El tejido de cancer de mama, el tejido mamario normal circundante y fibroadenomas benignos expresaban IGF-II ARNm. El nivel de expresión variaba aproximadamente 20 veces entre las diferentes biopsias malignas analizadas. Por lo tanto, debido a que el IGF-II ARNm se expresaba en los tejidos normales y tumorales y que generalmente dicha expresión no se observaba en líneas celulares epiteliales de cancer de mama, se pensaría que

el IGF-II ARNm podría originarse principalmente en la zona del estroma tumoral. Estos resultados indicarían que el IGF-II, al igual que el IGF-I, sería producido principalmente por el estroma mamario y probablemente tenga algún papel paracrino en la regulación del crecimiento tumoral. Sin embargo, debido a que el auténtico mensaje para IGF-II se expresaba también en al menos una línea celular tumoral y en un xenograft de tumor mamario, se podría pensar que en algunos casos en IGF-II actuaría de forma autocrina.

Cullen y col. (1991), estudiaron la expresión de IGFs en fibroblastos provenientes de biopsias de tumores de mama humanos, benignos y malignos, encontrando que los fibroblastos provenientes de biopsias benignas expresaban principalmente IGF-I ARNm y los provenientes de biopsias malignas IGF-II ARNm. De estos resultados se plantearon dos hipótesis. Por un lado, la diferencia observada podría existir antes de la formación tumoral de forma que la expresión del IGF-II ARNm predisponía hacia una posterior transformación maligna o podría existir una selección específica de los fibroblastos con capacidad de expresar IGF-II ARNm, luego de la aparición del epitelio tumoral. Posteriormente se comprobó la presencia de IGF-II ARNm en cultivos de fibroblastos provenientes de la piel normal (*Singer y col.*, 1992). Estos resultados sugerirían que la expresión de IGF-II ARNm en el estroma tumoral se debería a una selección y expansión de una subpoblación pre-existente de fibroblastos. Observaciones semejantes fueron obtenidas por Paik y col. (1992), mediante ensayos de hibridización "*in-situ*" en biopsias humanas.

En conclusión, parecería ser que la pérdida de expresión de IGF-I por los fibroblastos asociados al epitelio tumoral se debería a una selección clonal de una población específica de estas células y no a una inhibición de la transcripción de dicho gen potenciada por las células epiteliales malignas. Hasta ahora no se sabe la causa de este cambio de expresión de IGFs en los fibroblastos. Existen trabajos que demostrarían cierta intervención del IGF-II en la transformación celular. Por transfección con el gen de dicho GF en células epiteliales, Cullen y col. (1992), demostraron que todos los clones que expresaban IGF-II ARNm, presentaban una pérdida de la dependencia de estrógenos para proliferar y en la capacidad de crecer en agar blando y en suspensión.



## ACCIONES BIOLÓGICAS de los IGFs en CANCER de MAMA

\***MITOGENESIS:** Los factores de crecimiento semejantes a la insulina (IGFs) son considerados como los mitógenos más potentes, tanto para células epiteliales mamarias normales como malignas. La actividad mitogénica del IGF-I se ha descrito en varios tumores tales como osteosarcomas (*Pollak y col.*, 1990), cáncer de páncreas (*Ohmura y col.*, 1990), carcinomas de piel (*Neely y col.*, 1991) y otros. En concentraciones del orden del nM se comprobó que su efecto proliferativo, en fibroblastos, sería mediado por unión al receptor IGF-R1 (*Flier y col.*, 1986). También en varias líneas celulares epiteliales de cáncer de mama humano, tal como MCF-7, HBL 100, T47-D y MDA-MB-231, la incubación con IGF-I, en medio libre de suero, a concentraciones del orden pM-nM inducía proliferación celular (*Furlanetto y col.*, 1984; *Karey y col.*, 1988; *Cullen y col.*, 1990).

Por otro lado, por sobreexpresión del receptor IGF-R1 en células NIH-3T3 e incubación de las mismas con IGF-I o dosis suprafisiológicas de Insulina, se producía transformación neoplásica manifestada por crecimiento celular en agar blando y en ratón *nude* (*Kaleko y col.*, 1990).

Varios trabajos demostraron un efecto mitogénico del IGF-II en cultivos de células epiteliales de cáncer de mama (*Karey y col.*, 1988; *Cullen y col.*, 1990), inhibiéndose parcialmente por incubación en presencia de un anticuerpo monoclonal ( $\alpha$ -IR3) contra el receptor IGF-R1, sugiriendo que tal vez dicho efecto sería mediado por unión al mismo.

\***QUIMIOTAXIS:** En la línea celular de melanoma humano A2058, los IGF-I y II y la insulina inducen un aumento de la movilidad celular (*Strake y col.*, 1988). Anteriormente se publicó, que esta línea celular secretaba una proteína de 55 KDa, denominada factor de movilidad autocrino o AMF (*Liotta y col.*, 1986). En otras líneas celulares, tal como la de carcinoma de mama MDA-MB-231, la de carcinoma de vejiga T24 y la de carcinoma de ovario OVCAR3, se demostró que el ED50 para IGF-I era del orden de 1 nM produciéndose a dicha concentración solamente un 40% de la movilidad observada con AMF. En cambio para el IGF-II, con un ED50  $\leq$  10nM, se observó una movilidad máxima de 75 al 130% de la observada con AMF (*Kohn y col.*, 1990). Por incubación con el anticuerpo  $\alpha$ IR3

se inhibía la movilidad inducida por IGF-I e IGF-II, sugiriendo que dicho efecto sería mediado por IGF-R1 (*Stracke y col.*, 1989; *Kohn y col.*, 1990). Por otro lado, en rhabdomyosarcomas, el IGF-II actuaría como un mitógeno autocrino y quimiotáctico. En este sistema El-Brady y col, (1990), demostraron que la movilidad celular inducida por dicho GF era mediada por unión específica al receptor IGF-R2.

Debido a que los IGFs y la insulina son secretados por los tejidos estromales normales de una gran variedad de órganos, se podría sugerir que serían los encargados de aportar señales importantes para la mitosis y el hospedaje de las células tumorales en los procesos de invasión y metástasis y que la estimulación diferencial de la movilidad y los respectivos mecanismos de acción por los distintos agentes quimioattractantes, explicarían la diversidad de procesos metastásicos observados (*Kohn y col.*, 1990).

## **RECEPTORES para IGFs**

El primer paso en la acción de los IGFs es su unión a receptores específicos de la membrana plasmática (*Rosenfeld y col.*, 1988). Dos tipos de receptores se caracterizaron de acuerdo a sus afinidades relativas por IGF-I e IGF-II y por la capacidad de unir insulina. El receptor para IGFs tipo 1 o IGF-R1, une principalmente IGF-I, IGF-II con una afinidad 2 o 3 veces menor e Insulina con una muy baja afinidad (*Humbel*, 1990). El receptor tipo 2 o IGF-R2, une IGF-II con una afinidad 100 veces mayor que IGF-I y no une Insulina (*Morgan y col.*, 1987; *Mac Donald y col.*, 1988). Como consecuencia del grado de homología estructural entre los distintos ligandos, se produce una reactividad cruzada de receptores, produciendo efectos biológicos similares.

### **Receptor tipo I, IGF-R1**

El IGF-R1 posee una estructura tetramérica similar a la del receptor de Insulina (50 a 60% de homología), indicando un posible ancestro común para ambos genes (*Ullrich y col.*, 1985 y 1986; *Ebina y col.*, 1985; *Chearnusek y col.*, 1981). El mismo posee una configuración  $\alpha_2\text{-}\beta_2$ , con un peso molecular mayor

de 330 KDa. Se sintetiza como un único péptido precursor de 190KDa ( $\alpha\beta$ ), el cual subsecuentemente es glicosilado y clivado en una cadena  $\alpha$  de 130 KDa y una cadena  $\beta$  de 90 KDa. La cadena  $\alpha$  compone el dominio extracelular y está covalentemente unida mediante puentes disulfuro a la cadena  $\beta$ , que es predominantemente intracelular. En la cadena  $\alpha$  se localiza el sitio de unión al ligando, mientras que la cadena  $\beta$  traspasa la membrana plasmática y contiene la zona con actividad de tirosina quinasa (*Ullrich y col.*, 1986; *Steele-Perkins y col.*, 1988).

### **IGF-R1 y CANCER DE MAMA**

La actividad mitogénica de los IGFs sobre varias líneas celulares de cancer de mama, llevó a estudiar la presencia de sus receptores. De esta forma se demostró la existencia de sitios IGF-R1 en las líneas celulares MCF-7, T47D, MDA-MB-231 y HBL-100 (*Peyrat y col.*, 1989; *Pollak y col.*, 1988; *De Leon y col.*, 1988, *Furlanetto y col.*, 1984; *Myal y col.*, 1984; *Osborne y col.*, 1989; *Steward y col.*, 1990; *Freiss y col.*, 1990). Recientemente, Cullen y col. (1990), por ensayos de protección a la Ribonucleasa A demostraron que 11 líneas celulares de cancer de mama, expresaban auténticos ARNm para IGF-R1.

La obtención del anticuerpo  $\alpha$ IR3 por el grupo de Kull y col. (1983), permitió la verificación de la interacción o acción específica mediada por dicho receptor, ya que el  $\alpha$ IR3 es capaz de interaccionar con la subunidad  $\alpha$  del IGF-R1, inhibiendo la unión del IGF-I a este receptor, sin interferir con la del IGF-II al IGF-R2. Mediante el  $\alpha$ IR3 se comprobó *in vitro*, una inhibición total de la unión del IGF-I a células MCF-7, T47D, ZR75-1 y parcial a MDA-MB-231 (75%) y Hs578 (85%) y adicionalmente una inhibición reversible, del crecimiento celular independiente de anclaje (*Arteaga y col.*, 1989a y b; *Rohlik y col.*, 1987). Por otro lado, (*Cullen y col.* 1990), en ensayos de proliferación con MCF-7, demostraron que el  $\alpha$ IR3 era capaz de bloquear en un 80% los efectos mitogénicos del IGF-I e IGF-II pero no los de Insulina, indicando que ambos factores podrían mediar dicha acción via unión al IGF-R1. En el caso del IGF-II la inhibición observada variaba de un 48 al 80% según el sistema estudiado y la concentración de ligando utilizada, no descartando una cierta intervención del IGF-R2 en la

acción mitogénica de este GF (*Mathieu y col., 1990; Cullen y col., 1990; Osborne y col., 1989*).

Por estudios *in vivo* se demostró que el  $\alpha$ IR3 era capaz de inhibir el crecimiento de tumores MDA-MB-231 (ER-) en ratones atímicos, aún cuando los animales eran inoculados con estrógenos (*Arteaga y col., 1989b*), pero no los de MCF-7 (ER+). Por otro lado, *Strake y col. (1989)*, demostraron en células de melanoma humano, que el anticuerpo  $\alpha$ IR3 era capaz de inhibir la quimiotaxis estimulada por IGF-I e IGF-II.

En conclusión, los resultados reportados hasta el momento indicarían, una gran intervención del IGF-R1 como mediador de las acciones de los IGFs sin descartar cierta implicancia del IGF-R2 en las producidas por IGF-II.

Varios autores estudiaron la presencia del ARNm para IGF-R1 y de su proteína, en biopsias de cancer de mama humanos, encontrando un gran porcentaje de tumores IGF-R1+ (*Peyrat y col., 1988a; Bonneterre y col., 1990; Pekonen y col., 1988; Pollak y col., 1987; Foekens y col., 1989*). Por ensayos de Northern Blot se detectaron dos bandas de 11 y 7 Kbases (*Cullen y col., 1990; Peyrat y col., 1990a*) similares a las descritas en placenta humana (*Ullrich y col., 1986*). Por histoautoradiografía realizada en secciones histológicas de 20 tumores primarios de mama humana, 12 biopsias benignas de mama y 2 mamas normales, se determinó que el IGF-R1 estaría localizado principalmente en el componente epitelial (*Peyrat y col., 1990a*).

Entre los parámetros clínicos se demostró que la sobrevida del paciente sin reincidencia tumoral eran mayores en los enfermos IGF-R1+ que en los IGF-R1- (*Bonneterre y col., 1990*). Los receptores para progesterona y estrógenos se encontraron aproximadamente en el 61% (PR) y 71% (ER) de los casos, existiendo una correlación positiva entre IGF-R1+ y ER+ o PR+ (*Pekonen y col., 1988; Foekens y col., 1989; Peyrat y col., 1988a*), incrementada en mujeres postmenopausicas. Estas observaciones resultaron bastante paradójicas ya que era difícil de entender que un tumor IGF-R1+ tuviera un pronóstico mejor que uno que carece de sitios IGF-R1, de tal forma que habría que pensar si la totalidad de los receptores serían capaces de ser estimulados por el IGF-I endógeno o si existiría algún control fisiológico del crecimiento mediado por IGF-I de forma de explicar

el mejor pronóstico observado. Por otro lado, se determinó que la concentración de IGF-R1 era menor en los tumores mamarios benignos que en los malignos y que en el tejido mamario normal o en el adjacente al tumoral los niveles de IGF-R1 eran muy bajos o indetectables, sugiriendo que la expresión de IGF-R1 estaría en cierta forma asociada con la transformación tisular (*Peyrat y col.*, 1988b). Estos resultados junto a la observación de que en los pacientes con cancer de mama los niveles séricos de IGF-I eran mayores que en los individuos controles (*Peyrat y col.*, 1990b), indicarían la importancia de este GF en la génesis y desarrollo de la enfermedad.

Además Berns y col. (1992), encontraron por un estudio de 975 pacientes con cancer de mama que un 2% de los mismos presentaba una amplificación del número de genes para IGF-R1 como también de la cantidad de receptores IGF-R1 medidos por ensayos radioligando-receptor. Estos pacientes con amplificación en el gen para IGF-R1 presentaron un tiempo medio de sobrevida menor.

### **Receptor tipo II, IGF-R2**

El IGF-R2 es un monómero de 270 KDa. Morgan y col. (1987), fueron los primeros en clonar y secuenciar el ADNc del IGF-R2 humano, encontrando sorprendentemente un 80% de homología entre su secuencia y la correspondiente al receptor catión independiente para residuos Man 6-P bovino (CI-Man-6P R). Estudios posteriores demostraron un 99.4% de homología entre el CI-Man-6P R y el IGF-R2 humanos (*Oshima y col.*, 1988) y un 79% entre el CI-Man 6-P R bovino y el IGF-R2 de rata (*Mac Donald y col.*, 1988). Desde ese momento se consideró al IGF-R2 como el receptor **CI-Man-6P/IGF-II R**.

El receptor CI-Man-6P junto con el receptor catión dependiente para residuos Man 6-P (CD-Man-6P R) están involucrados en la distribución de las enzimas lisosomales desde su lugar de síntesis hacia su destino final en los lisosomas (*Dahms y col.*, 1989). Tanto las enzimas lisosomales como las proteínas secretorias y las componentes de membrana se sintetizan en el retículo endoplasmático rugoso y son modificadas post-transcripcionalmente en el Aparato de Golgi (AG) donde reciben determinados marcadores que las clasifica para sus correspondientes destinos. De esta forma, a las enzimas lisosomales se les adiciona grupos fosfomanosilos, por los cuales se unen a receptores para Man 6-P ubicados

en la membrana del AG. El complejo ligando-receptor se desprende del AG en una vesícula recubierta que se fusiona posteriormente con un prelisosoma o endosoma ácido. En el mismo se produce la disociación de las hidrolasas ácidas del Man 6-P/IGF-II R, que son conducidas al compartimento lisosomal. Por otro lado, el receptor es movilizado hacia el AG o hacia la membrana plasmática. Durante este proceso de segregación, hay un 10 al 15% de enzimas lisosomales que son secretadas en vez de ser conducidas hacia los lisosomas. Estas hidrolasas extracelulares se unen a los CI-Man 6-P/IGF-II R ubicados en la membrana plasmática y viajan hacia los lisosomas. Por lo tanto, estos receptores de membrana están en continuo equilibrio con una población intracelular de los mismos y ciclan continuamente entre el AG, compartimientos prelisosomales y lisosomales y la membrana plasmática a una velocidad independiente de la ocupación por ligandos.

Por estudio de la secuencia aminoacídica, combinada con experimentos de proteólisis se confirmó la homología entre el CI-Man 6-P R y el IGF-R2. Ambos poseen un gran dominio extracitoplasmático, un dominio de transmembrana y una región intracitoplasmática corta (*Sahagian y col., 1985; Von figura y col., 1985*) de 2207, 23 y 164 aminoácidos respectivamente en humanos. La región extracitoplasmática está estructurada en 15 unidades contiguas repetitivas. Estas zonas poseen solamente un 20% de homología entre sí pero conservan una organización determinada de 8 residuos cisteínas y de regiones hidrofóbicas cercana a las mismas. Cada unidad posee un largo promedio de 150 aminoácidos con excepción del dominio número 14, que presenta una inserción de 43 aa homólogos a la región tipo II de fibronectina. El dominio intracitoplasmático es hidrofílico e incluye varios sitios potenciales de fosforilación en Tyr, Ser y Threo (*Sahagian y col., 1983; Corvera y col., 1985*).

Todavía no se ha dilucidado que región (o regiones) del dominio extracitoplasmático se encargarían del reconocimiento al IGF-II y/o a Man-6P u otros ligandos. Debido a que el IGF-II no es una molécula glicosilada y al hecho de que en anfibios como en aves el CD Man-6P-R es específico para enzimas lisosomales y no une IGF-II (al contrario de mamíferos), hace pensar que los sitios involucrados deberían ser distintos (*Canfield y col., 1989; Clairmont y col., 1989*). Hay cierta evidencia de que probablemente las unidades repetitivas estarían involucradas en la unión de Man-6P y que la única región distinta entre los

receptores CD y CI sería la responsable del reconocimiento del IGF-II. Dicha zona sería la localizada en el dominio 14, en los 43 aminoácidos con homología a la región tipo II de fibronectina (*Morgan y col., 1987*).

Se demostró que el ligando Man-6P incrementaba en dos veces la unión del IGF-II a su receptor (*Roth y col., 1987; MacDonald y col., 1988*) mientras que las enzimas lisosomales tal como  $\beta$ -galactosidasa o cathepsina D (*Mathieu y col., 1990; Kiess y col., 1989; Nolan y col., 1990*), producían una disminución de esta unión. El IGF-II modificaba la unión y la incorporación celular de las enzimas lisosomales. El efecto inhibitorio del IGF-II se observó en la línea celular BRL 3A de hígado de rata ( 77% de inhibición), en células gliales de rata ( 73%) y en preparados de membrana de tumores mamarios ( 55%) (*Kiess y col., 1989*).

Polychronakos y col. (1988), demostraron que la presencia de un exceso de Man-6P en el medio de incubación anulaba el efecto inhibitorio de las enzimas lisosomales sobre la unión del IGF-II al CI-Man-6P/IGF-II R y viceversa. Esto mismo fue demostrado por MacDonald (1991), concluyendo que el efecto estimulador de la Man-6P sobre la afinidad del IGF-II a su receptor era indirecto, o sea por un desplazamiento de los ligandos inhibitorios endógenos con alta afinidad por el receptor CI-Man-6P/IGF-II R.

Todos estos fenómenos se deberían a la ocupación simultánea de ambos sitios, los cuales estarían localizados en el mismo receptor, de forma tal que la ocupación de uno interferiría en la unión al otro sitio. De esta forma, se propusieron dos posibles mecanismos: a)- la unión de uno de los ligandos podría conducir a un cambio conformacional del receptor de forma tal de modificar la unión del otro ligando y b)- la ubicación de ambos sitios de unión podría ser de forma tal que la unión de uno de los ligandos oculte estéricamente el acceso al segundo sitio. Hasta ahora no se ha podido dilucidar si uno o ambos mecanismos estarían involucrados en los fenómenos observados.

## ACTIVIDAD BIOLÓGICA del CI-Man 6-P/ IGF-II R y relación con CANCER DE MAMA

El hecho de que un mismo receptor una con alta afinidad ligandos totalmente distintos y con diferente actividad biológica hace pensar si existe una señal transduccional específica o conjunta para cada ligando. Por otro lado, es bien conocido el papel de este receptor en la conducción de las enzimas lisosomales a su sitio final de acción ya sea por biosíntesis o por endocitosis. Sin embargo, aún es controvertida su función en la acción mitogénica del IGF-II.

El receptor CI-Man 6-P/ IGF-II R comparte varios rasgos estructurales con el grupo de receptores involucrados en el transporte celular de nutrientes, tal como los receptores de transferrina, LDL, etc. Dichas similitudes son: a)- la carencia de una actividad tirosina-quinasa en su dominio intracitoplasmático, b)- el reciclamiento constitutivo que es independiente de la ocupación por ligando y c)- la distribución subcelular representada por una mayor cantidad de receptores en las membranas de los compartimientos intracelulares que en la membrana plasmática. Por estos motivos, se podría considerar que la asociación del IGF-II al CI-Man-6P/IGF-II R estaría más relacionada a una posterior degradación del ligando que a una señal transduccional específica. En cultivo de células de adipocitos de rata, se demostró que la degradación del IGF-II sería mediada por la unión e internalización del receptor CI-Man-6P/IGF-II R (*Oka y col.*, 1985).

Por otro lado, se han reportado algunas respuestas biológicas propias del receptor CI-Man-6P/IGF-II R. En la línea celular de hepatocito humano Hep G2, el IGF-II estimulaba la síntesis de glucógeno y dicho efecto era parcialmente inhibido por incubación con el anticuerpo  $\alpha$ IR3 y mimetizado por incubación con un anticuerpo anti-IGF-R2 (*Hari y col.*, 1987). En la línea celular de eritroleucemia humana K562, defectiva en receptor IGF-R1 pero no de IR y IGF-R2 se demostró un aumento de la proliferación celular por incubación con IGF-II (*Tally y col.*, 1987; *Blanchard y col.*, 1988). En fibroblastos de ratón 3T3 pretratados con PDGF y EGF, la incubación con IGF-II estimulaba el influjo de  $Ca^{2+}$  (*Nishimoto y col.*, 1987). En el mismo sistema se demostró la posible intervención de una proteína G, ya que el tratamiento con toxina pertusis bloqueaba la estimulación del influjo de  $Ca^{2+}$  y con GTP- $\gamma$ S se inhibía la unión del IGF-II a membranas de células Balb/c 3T3 (*Nishimoto y col.*, 1989). Utilizando



un anticuerpo contra CI-Man 6-P/IGF-II R (R-II PAB1) en reemplazo al IGF-II, se obtuvieron resultados idénticos (*Osborne y col.*, 1989; *Hari y col.*, 1987). Varios investigadores propusieron que esta estimulación de  $\text{Ca}^{2+}$  sería una señal desencadenante de la síntesis de ADN ya que a bajas concentraciones de IGF-II (1nM) se observaba un aumento de la incorporación de [ $^3\text{H}$ ]-Timidina en el ADN de células Balb/c 3T3. Por otro lado, en sistemas celulares de cancer de mama se demostró que el IGF-II era mucho menos potente que el IGF-I en la estimulación de la síntesis de ADN y que por incubación con el anticuerpo  $\alpha\text{IR3}$  anti-IGF-R1 o anticuerpo anti-receptor de insulina, no se bloqueaba completamente la respuesta biológica mediada por IGF-II (*Osborne y col.*, 1989; *Cullen y col.*, 1990; *Mathieu y col.*, 1990). Existen trabajos donde se demostró también, que la Cathepsina D era capaz de estimular la proliferación de distintos sistemas celulares de cancer de mama *in vitro* pero todavía no se ha probado un efecto directo via receptor tipo II (*Vignon y col.*, 1986).

Por otro lado, Nielsen y col. (1990), demostraron que la Man 6-P estimulaba la proliferación de células precursoras neuronales, efecto que era mimetizado por otras enzimas fosforiladas y bloqueado por incubación con un anticuerpo anti-IGF-R2.

Todos estos resultados sugerirían que parte de la respuesta inducida por IGF-II podría estar asociada con un camino transduccional propio del receptor CI-Man-6P/IGF-II R, tal vez relacionado con la proliferación celular. Mathieu y col. (1991), demostraron en varias líneas celulares de cancer de mama humano cierta actividad mitogénica producida por IGF-II, que sería mediada por el receptor IGF-R2, especialmente a bajas concentraciones de dicho GF (<0.5 nM), pero estaría acoplada al receptor IGF-R1a medida que se incrementaba la concentración de dicho ligando.

## **FAMILIA DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDERMICO**

La familia del EGF está formada por distintos mitógenos clasificados de acuerdo a sus capacidades para mimetizar las acciones biológicas del EGF, para competir por la unión a su receptor (EGF-R) y por poseer una secuencia aminoacídica semejante a la del EGF. En esta familia se incluyen, además del EGF, al TGF- $\alpha$ , a la Amfiregulina y a los Pox virus growth factor (Vaccinia growth factor, Shope growth factor y Myxoma growth factor).

### **EGF, GENERALIDADES:**

El EGF se lo aisló por primera vez (Cohen, 1962), de glándulas submaxilares de ratones macho y luego de orina humana donde recibió el nombre de urogastrona (Gregory, 1975). Es un polipéptido de 53 aminoácidos con tres puentes disulfuros intracatenarios y un peso molecular de 6045 Da. Posee un punto isoeléctrico ácido, estabilidad a pH ácido y a altas temperaturas. La homología de dicho péptido entre las distintas especies es de un 50% (Carpenter, 1981).

Los grupos de Scott y col. (1983), y Gray y col. (1983), clonaron el ADNc murino, determinando que el EGF se sintetiza en forma de una molécula precursora (pro-EGF). Por otro lado, Bell y col. (1986), describieron la secuencia del precursor del EGF humano. Ambos péptidos poseen tamaños (1200 aa., 130000 Da) y organización estructural similar, con la secuencia aminoacídica del EGF maduro localizada cerca del extremo C-terminal del precursor.

Los precursores poseen dos grupos de secuencias hidrofóbicas, una ubicada cerca de la zona N-terminal y relacionada con su proceso de biosíntesis y otra localizada cerca del extremo C-terminal. Esta última, está flanqueada por una zona rica de aminoácidos básicos, semejante a las secuencias *stop transfer* indicadoras de la finalización del traspaso de las proteínas integrales de membrana. Estos datos sugerirían que el precursor del EGF podría comportarse como una proteína de transmembrana (Bell y col., 1986; Mroczkowski y col., 1988).

Entre las funciones biológicas de dicho precursor, además de la producción del EGF maduro, Mroczkowski y col. (1989), demostraron su capacidad de competir con el [<sup>125</sup>I]-EGF en la unión a su receptor, como así también de inducir el crecimiento celular.

**Gen de EGF:** Bell y col. (1986) estudiaron la organización del gen del EGF humano, determinando que el mismo abarcaba 120 kb, incluyendo 24 exones y 23 intrones. Solamente 2 exones contienen la secuencias del EGF maduro (exones 20 y 21).

El transcripto primario precedido por su ADNc, determinó un tamaño de 110 Kb, mientras que por ensayos de Northern Blot los transcriptos obtenidos variaban de 4.7 a 4.9 Kb (*Bell y col.*, 1986; *Gubits y col.*, 1986). Hasta el momento no se conocen los factores que regulan la transcripción de dicho gen solo se sabe que la misma ocurre preferencialmente en ciertos tejidos.

### **PRODUCCIÓN y ACTIVIDAD BIOLÓGICA del EGF**

En los murinos, la mayor expresión del ARNm de EGF se localiza en las glándulas submaxilares, siendo el ratón macho el que posee niveles 10 veces mayores de EGF ARNm en las hembras. En riñón también se observó un nivel alto de expresión de dicho GF, del orden de un 50% al reportado en la glándula submaxilar (*Rall y col.*, 1985).

Los niveles de estos transcriptos son dependientes del estadio del desarrollo, siendo no-detectables dentro de los primeros 10 días del nacimiento y aumentando hasta niveles normales luego de los 20 días (*Greslik y col.*, 1985; *Popliker y col.*, 1987). En el estado fetal no se encontró EGF ARNm, considerando una inactividad de este gen durante el período gestacional. En otros tejidos, como en la glándula mamaria, páncreas, pulmón, duodeno, cerebro, ovario, etc, de animales adultos, los niveles de EGF ARNm son bajos (*Rall y col.*, 1985).

Por radioinmunoensayo, se determinó la cantidad de EGF presente en tejidos y fluidos. En general los niveles encontrados en los tejidos son bajos y

muchas veces se piensa que el EGF podría provenir de contaminaciones aportadas por los líquidos que los rodean, los cuales son muchos mas ricos en este factor de crecimiento.

Altas concentraciones de EGF se detectaron en glándula salival, riñón, pancreas, duodeno e hígado de roedores adultos. A diferencia de esto, en el humano adulto los mayores niveles de EGF se localizan en el riñón (*Byyny y col.*, 1972; *Hirata y col.*, 1979). No hay que olvidar, la existencia de cantidades apreciables de EGF en la glándula mamaria en el estadio de lactancia y en próstata (*Moran y col.*, 1983; *Jacobs y col.*, 1988). Tanto en humanos como en roedores, los resultados obtenidos indicaron una producción local y secreción directa a saliva, orina, leche y fluidos prostáticos (*Elson y col.*, 1984; *D'Cruz y col.*, 1989; *Olsen y col.*, 1984). Esto fue comprobado debido a que la sialoadenectomía de los animales no producía cambios apreciables en la concentración de EGF presente en la leche (*Carpenter*, 1980; *Grueters y col.*, 1985; *Beardmore y col.*, 1983). En la leche existe también una concentración mucho menor de TGF- $\alpha$  (*Connolly y col.*, 1988).

En el tejido mamario, los niveles de EGF ARNm son indetectables durante la preñez y aumentan marcadamente durante la lactancia, con la producción de pro-EGF como una proteína integrante de membrana de las células de los alvéolos de la glándula mamaria (*Brown y col.*, 1989). La principal función del EGF de la leche se centra en el desarrollo tisular y funcional del sistema gastrointestinal y en la apertura de los ojos del neonato (*Widowson*, 1985; *Oka y col.*, 1983). El EGF posee también cierto papel en la maduración de la glándula mamaria, estimulando el desarrollo lobulo-alveolar, la morfogénesis ductal y la proliferación de células epiteliales (*Richards y col.*, 1982; *Tonelli y col.*, 1980). Se comprobó que estos efectos eran mediados por unión al EGF-R (*Ederly y col.*, 1985). Debido a que durante la gestación los niveles de EGF ARNm de la glándula mamaria son bajos y los de EGF-R altos, es de destacar que cualquiera de los efectos mencionados anteriormente serán efectuados por el EGF extramamario (*Ederly y col.*, 1985).

## FACTOR DE TRANSFORMACIÓN $\alpha$

El TGF- $\alpha$  se lo descubrió como un péptido con actividad biológica semejante al EGF, en fibroblastos de ratón transformados con oncogenes (*Todaro y col.*, 1976; *DeLarco y col.*, 1978). Posteriormente se lo aisló de preparaciones de sarcomas y se determinó su secuencia observándose una gran similitud con la del EGF (*Anzano y col.*, 1983). La homología entre las secuencias aminoacídicas de ambos péptidos oscila en un 42% en humanos y un 36% en rata. Entre las distintas especies la conservación de la secuencia del TGF- $\alpha$  es de un 90%, especialmente entre la de humanos y la de roedores.

Derynck y col. (1984), en humanos y Lee y col. (1985b), en rata, clonaron el ADNc del TGF- $\alpha$ , determinando que al igual que el EGF, dicho péptido se sintetizaba en la forma de un precursor de 160 y 159 aminoácidos respectivamente, o sea de tamaño mucho menor al pro-EGF. Estos precursores están compuestos por dos dominios hidrofóbicos de los cuales, el mas cercano a la zona C-terminal, está rodeado por una secuencia rica en aminoácidos básicos indicando la posible actuación del mismo como una proteína integral de membrana.

En varios trabajos se demostró la presencia de moléculas precursoras de TGF- $\alpha$  de 25 kDa, 21 kDa y 17-19 kDa, en medios condicionados de células transformadas como en la orina de pacientes portadores de masas tumorales. Recientemente se caracterizó una glicoproteína de 17-19 kDa, que interaccionaba con anticuerpos contra el TGF- $\alpha$  maduro pero no con un anticuerpo que reconocía el dominio citoplasmático del precursor. Se supone que dicha proteína podía ser eliminada al medio de cultivo luego de ser clivada por proteasas endógenas (*Ignotz y col.*, 1986a; *Bringman y col.*, 1987; *Gentry y col.*, 1987). Por lo tanto, las células transformadas serían capaces de producir a la proteína integrante de membrana, al precursor de TGF- $\alpha$  de 25 KDa, a un fragmento soluble de 18-21 KDa y al péptido maduro de TGF- $\alpha$  de 6 KDa. Este fragmento de 18 KDa era biologicamente activo y podría ser generado por actividad de proteasas en dos sitios posibles de proteólisis (*Ignotz y col.*, 1986a; *Teixido y col.*, 1988).

**Gen de TGF- $\alpha$ :** El gen del TGF- $\alpha$  humano está compuesto por 6 exones (*Derynck y col.*, 1985a), siendo los exones número 3 y 4 los codificantes para el péptido maduro. De igual forma que para el EGF, el exón 4 codifica para la mitad de la zona C-terminal del TGF- $\alpha$  maduro y para la secuencia hidrofóbica de transmembrana.

Por deducción del ADNc del TGF- $\alpha$  humano, se estimó el tamaño de su transcrito primario siendo de 70 a 100 Kb (*Derynck*, 1988a), mientras que por ensayos de Northern Blot el mismo oscila aproximadamente en 4.8 Kb (*Derynck y col.*, 1984; *Lee y col.*, 1985 a y b).

### **PRODUCCIÓN y ACTIVIDAD BIOLÓGICA del TGF- $\alpha$**

Pocas líneas celulares no transformadas expresan TGF- $\alpha$  ARNm, entre las que se destacan los cultivos primarios de queratinocitos y de macrófagos (*Smith y col.*, 1987). En tejidos humanos, el TGF- $\alpha$  ARNm se expresa en epidermis normal y psoriática (con un nivel 5 veces mayor que el encontrado en el correspondiente tejido normal), en mucosa gástrica, en tumores y en cerebro (*Derynck y col.*, 1987; *Bates y col.*, 1988. *Lee y col.*, 1985a; *Coffey y col.*, 1987).

A diferencia del EGF, el gen para TGF- $\alpha$  puede expresarse discontinuamente antes del nacimiento, pero los resultados obtenidos hasta el momento son bastante controvertidos (*Rapolee y col.*, 1989; *Lee y col.*, 1985a).

Tal como el EGF, el TGF- $\alpha$  posee la capacidad de estimular varios efectos no-mitogénicos (*Stern y col.*, 1985) La administración de TGF- $\alpha$  en animales produce respuestas semejantes a las efectuadas por el EGF, tal como la apertura precóz de los ojos, retardo del crecimiento del pelo, inducción de la ornitina descarboxilasa testicular en el ratón recién nacido, inhibición de la secreción de ácido gástrico, reparación del tejido epitelial dañado y angiogénesis (*Smith y col.*, 1985; *Tam*, 1985; *Nakhla y col.*, 1985; *Schultz y col.*, 1987).

Muchos trabajos no encontraron diferencias significativas en las actividades relativas entre ambos factores, pero se ha reportado que el TGF- $\alpha$  es mucho mas

potente que el EGF en promover el proceso de angiogénesis (*Schreiber y col.*, 1986; *Stern y col.*, 1985).

### **TGF- $\alpha$ , EGF y CANCER DE MAMA**

El EGF estimula la proliferación de varias líneas celulares de cancer de mama como también la de cultivos de epitelio mamario normal (*Fitzpatrick y col.*, 1984b; *Osborne y col.*, 1980). Por otro lado, la presencia continua de EGF o de TGF- $\alpha$  en fluidos y tejidos normales es incapáz de inducir la proliferación celular. También en muchas líneas tumorales productoras de TGF- $\alpha$ , no se observó un cambio en el fenotipo transformante al incubarlas en presencia de anticuerpos anti-TGF- $\alpha$ . Todas estas observaciones hicieron suponer que el TGF- $\alpha$  secretado por dichas células sería el responsable de ejecutar otras funciones tales como angiogénesis (*Schreiber y col.*, 1986).

Debido a que los cultivos de fibroblastos normales no producían cantidades significativas de TGF- $\alpha$ , se utilizaron en ensayos de transfección con genes para EGF o TGF- $\alpha$ . Los resultados obtenidos fueron contradictorios. Por un lado, usando células NIH 3T3 o células normales de riñón de rata NRK, con el gen del TGF- $\alpha$ , no se observó ninguna adquisición de un fenotipo transformante (*Finzi y col.*, 1987; *Watanabe y col.*, 1987). Por otro lado, Rosenthal y col. (1986), utilizando fibroblastos murinos Rat-1, demostraron que el TGF- $\alpha$  era capáz de actuar como un oncogén induciendo el crecimiento *in vitro* independiente de anclaje y la formación de tumores en ratones *nude*. Resultados semejantes se obtuvieron por transfección del gen de EGF utilizando fibroblastos FR3T3 (*Rosenthal y col.*, 1986). A pesar de las discrepancias encontradas estos resultados confirmarían la contribución del TGF- $\alpha$  y/o EGF en la proliferación celular. Todavía queda por dilucidar si la expresión de TGF- $\alpha$  y/o EGF produce una alteración del fenotipo celular hacia un estado transformado o si permite una selección de una población celular transformada.

En varias líneas celulares de cancer de mama humano, se detectaron especies de TGF- $\alpha$  de 30 kDa, con capacidad de competir por la unión al EGF-R, inducir un fenotipo transformante en fibroblastos NRK y ser reconocidas por anticuerpos anti TGF- $\alpha$  maduro (*Bates y col.*, 1986, *Dickson y col.*, 1986b;

*Perroteau y col.*, 1986). Todavía no está claro si esta proteína está relacionada con la forma precursora de TGF- $\alpha$  de 17-19 kDa producida por fibroblastos transformados (*Ignatz y col.*, 1986a; *Gentry y col.*, 1987), si se trataba de un producto obtenido por *splicing alternativo* del TGF- $\alpha$  ARNm o si era una modificación por glicosilación o palmitilación del péptido maduro (*Bringman y col.*, 1987). Estas especies de TGF- $\alpha$  de 30 kDa se inducían por tratamiento con estrógenos en las líneas celulares ER+ tal como MCF-7, T47D y ZR-75-1, en un rango de 2 a 14 veces dependiendo del ciclo celular y de las condiciones del cultivo (*Bates y col.*, 1986; *Dickson y col.*, 1986b y 1987, *Perroteau y col.*, 1986).

Por ensayos de protección a la digestión por Ribonucleasa A para TGF- $\alpha$  ARNm, se detectaron transcritos de 4.8 Kb en la línea celular MCF-7 como en otras líneas celulares de cancer de mama humanos y en biopsias tumorales humanas con bajo o alto contenido de ER (*Denryck y col.*, 1987; *Bates y col.*, 1988). Al menos un 70% de las biopsias, contenían TGF- $\alpha$  ARNm. Por otro lado, en la línea celular Hs578T (ER-), los niveles de TGF- $\alpha$  ARNm y de la proteína relacionada eran indetectables, pero no así en las demás líneas celulares ER- (*Bates y col.*, 1986 y 1988).

En la línea celular de cancer de mama humano, MCF-7 se demostró que la expresión de TGF- $\alpha$  era regulada por los estrógenos. En presencia de E2, se observó *in-vitro* y en ratones atímicos, un aumento de 2 a 3 veces en los niveles de TGF- $\alpha$  ARNm. Observaciones semejantes se obtuvieron en tumores mamarios de ratón hormono-dependientes (*Liu y col.*, 1987), tal es así que por el uso de anticuerpos dirigidos contra el TGF- $\alpha$  o el EGF-R, se observó una supresión del crecimiento independiente de anclaje (*Bates y col.*, 1988). Por lo tanto, los resultados obtenidos considerarían al TGF- $\alpha$  como un factor de crecimiento autocrino en cancer de mama.

En orina de pacientes como en ratones *nude* con tumores de mama u otros carcinomas es posible detectar niveles altos de TGF- $\alpha$  considerándolo como un marcador de la presencia y progresión tumoral (*Kimball y col.*, 1984). La principal desventaja de esta determinación se atribuiría a la presencia de factores relacionados al EGF, en niveles muy altos, aún en la orina normal.



Con respecto al EGF, Kurachi y col. (1985b), demostraron la implicancia de este GF en la inducción y posterior desarrollo tumoral. Usando una línea de ratón con susceptibilidad a la aparición de tumores espontáneos, comprobaron que la sialoadenectomía reducía la incidencia y la velocidad de crecimiento tumoral, la cual se recuperaba luego de la administración de EGF al animal. Resultados contradictorios se obtuvieron usando un modelo tumoral inducido por DMBA (Ravdin y col., 1987). Por lo tanto, estas observaciones atribuirían al EGF, ciertas funciones endócrinas relacionadas con el desarrollo y mantenimiento de un estado tumoral.

### **RECEPTOR de EGF (EGF-R)**

Todos los miembros de la familia del EGF se unen al receptor EGF-R con el fin de llevar a cabo funciones biológicas específicas. El EGF-R se aisló por primera vez de la línea celular de carcinoma humano, A-431. Esta línea celular sobreexpresa al EGF-R en una relación 30 a 50 veces mayor de la observada en otros sistemas celulares ( $\approx 2 \times 10^6$  sitios/célula) (Cohen y col., 1980, 1982a). El EGF-R se aisló también de hígado murino normal (Cohen y col., 1982b). Consiste en una glicoproteína de transmembrana de 170 KDa compuesta de un dominio extracelular un dominio interno hidrofóbico y una región citoplasmática. El dominio extracelular posee un gran número de residuos cys (10%) y de sitios de N-glicosilación (30% de la masa de todo el dominio). Todderud y Carpenter (1988), reportaron la presencia de grupos manosa- $P0_4^{3-}$  característicos de las enzimas lisosomales y no de las proteínas componentes de la membrana plasmática, sugiriendo una cierta implicancia de estos residuos en el ciclo que experimenta el receptor.

El EGF-R posee una actividad tirosina-quinasa localizada en la región C-terminal de su cadena polipeptídica. Existe una gran homología entre el EGF-R humano y el oncogén v-erb B de aves proveniente del EGF-R de gallina (Ullrich y col., 1984. Yamamoto y col., 1983). La actividad tirosina-quinasa es inducida por la unión del EGF al receptor, produciendo la autofosforilación del EGF-R y adicionalmente la fosforilación de sustratos celulares entre los cuales se incluyen a la fosfolipasa A2, la fosfolipasa C-II que estimula el camino de los fosfoinosítidos activando a la fosfolipasa C, la quinasa S6, la proteína quinasa FA, la caseína

quinasa II, etc (*King y col.*, 1988; *Chan y col.*, 1988). En el mismo dominio del EGF-R existen sitios adicionales de fosforilación que podrían ser sustratos de otras proteínas quinasas que todavía no se han identificado, a excepción de la PKc que es capaz de fosforilar al residuo Thr 654, modulando de esta forma su actividad (*Carpenter*, 1987; *Gill y col.*, 1987). Como resultado de la unión del EGF al EGF-R se estimulan una gran cantidad de fosforilaciones en tirosina, serina y treonina desencadenando una variedad de eventos celulares entre los que se incluye un rápido aumento de la actividad del canal intercambiador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> de la membrana plasmática con alcalinización del citosol celular, un aumento de la concentración intracelular de Ca<sup>++</sup> y un aumento del transporte de glucosa y de aminoácidos. Por otro lado, existe también estimulación de la síntesis de ADN, replicación celular y transformación. Para los efectos mitogénicos se necesita una ocupación persistente, de hasta 8 horas, de los sitios EGF-R. No se sabe aún si los eventos intracelulares persisten durante este tiempo a través de los complejos ligando-receptor internalizados (*Carpenter*, 1987).

La expresión del EGF-R ocurre en casi todos los tejidos adultos a excepción de la células del sistema hematopoyético. No se conoce con exactitud, cuales son los eventos regulatorios de la transcripción, procesamiento y maduración del respectivo ARNm.

Luego de ser sintetizado y procesado los receptores se distribuyen al azar en la membrana plasmática (*Haigler y col.*, 1979). La unión del EGF a su receptor induce una agrupación de los EGF-R, con su posterior internalización en forma de vesículas recubiertas. En los compartimentos lisosomales se produce la disociación del ligando del EGF-R (*Stoschek y col.*, 1984). Algunos autores sugieren que el EGF induce en 10 veces la degradación de su receptor, mientras que otros apoyan la idea de que existe un reciclamiento del receptor internalizado (*Dunn y col.*, 1986; *Murthy y col.*, 1986). El mecanismo por el cual un receptor es elegido para tomar una vía u otra, todavía no se ha dilucidado. Por otro lado, la presencia de los residuos Man-6P en el EGF-R sugeriría que el reciclamiento de este receptor se realizaría en forma semejante al experimentado por las enzimas lisosomales desde el aparato de golgi o del compartimiento extracelular (*Todderud y col.*, 1988).

## EGF-R y CANCER DE MAMA

Existen dos evidencias importantes que apoyarían la relación existente entre el EGF-R y el proceso de transformación celular. Una de las mismas se relaciona con la gran homología existente entre el EGF-R humano y el producto del oncogén v-erb B de aves (*Ullrich y col.*, 1984), los cuales poseen un 90% de homología en sus dominios citoplasmáticos. La proteína v-erb B posee dos deleciones, una en la región N-terminal abarcando casi todo el dominio extracelular y otra en la zona C-terminal correspondiente al primer sitio de autofosforilación del receptor (*Yamamoto y col.*, 1983).

Otro punto de destacar es la presencia de una sobreexpresión de EGF-R en varias líneas celulares de cancer de mama y en biopsias de tumores de mama murinos y humanos, generalmente relacionada con un comportamiento mas agresivo en comparación con el observado en sistemas con niveles menores o normales de EGF-R (*Fitzpatrick y col.*, 1984a y b). Se comprobó que muchas de las líneas celulares con niveles apreciables de EGF-R, disminuían su proliferación en presencia de EGF (*Gill y col.*, 1981; *Kamata y col.*, 1986), mientras que eran estimuladas al ser crecidas en agar blando o en ratones *nude* (*Lee y col.*, 1987; *Ozawa y col.*, 1987). Cuando a estos animales se les administraba EGF, se observaba un aumento del tamaño tumoral de 2.6 a 6.3 veces. De esta forma, la inhibición del crecimiento celular nombrada anteriormente, en presencia de EGF, parecería ser un artificio de las condiciones del cultivo utilizadas.

Por estudios de transfección con el gen del EGF-R en sistema celulares, se confirmó que su sobreexpresión podía estar relacionada con la adquisición de un fenotipo transformado. Usando fibroblastos NIH 3T3 transfectados y expresando un gran número de EGF-R ( $\approx 200000$  receptores/célula) se observó un incremento de la proliferación celular y de la formación de colonias en agar blando en presencia de EGF (*DiFiore y col.*, 1987; *Riedel y col.*, 1988). Estos transfectantes a su vez desarrollaban tumores en ratones *nude*, demostrándose que la administración de EGF a los animales disminuía en dos veces la latencia tumoral.

Los trabajos de Xu y col. (1984) y Derynck y col. (1987), presentan la gran cantidad de tejidos tumorales y líneas celulares tumorales con sobreexpresión del EGF-R.

En tumores de mama humanos la presencia de EGF-R está relacionada, en clínica, con un mal pronóstico y en sistemas experimentales con una velocidad de crecimiento tumoral mayor. La presencia del EGF-R se reportó en un 60% (*Spitzer y col.*, 1988), 47 % (*Fitzpatrick y col.*, 1984a), 20-42% (*Sainsbury y col.*, 1985a,b,c), 22% (*Delarue y col.*, 1988), 32% (*Cappelletti y col.*, 1988), 28% (*Nicholson y col.*, 1988) y 14 % (*Macias y col.*, 1987) de los casos estudiados. En todos estos trabajos se encontró una correlación negativa entre los niveles de EGF-R y los receptores para hormonas esteroideas ER Y PR.

En el trabajo de *Klijn y col.* (1992), por estudio de 5232 pacientes, se demostró la presencia de mayores niveles de EGF-R en los carcinomas de histología ductal frente a los de histología lobulillar. También existía una asociación positiva entre el nivel de EGF-R con el grado y tamaño tumoral.

## FACTORES DE TRANSFORMACIÓN TIPO $\beta$

Los factores de transformación recibieron tal nombre en relación a su capacidad de inducir un fenotipo transformado en células mesenquimales (*Moses y col.*, 1981; *Roberts y col.*, 1981y 1983b). Hoy en día se sabe que estos péptidos poseen varias funciones distintas en diferentes tipos celulares, involucrándolos en la mayoría de los procesos fisiológicos y patológicos.

El TGF- $\beta$ 1 fue purificado a homogeneidad de varias fuentes biológicas tal como plaquetas (*Assoian y col.*, 1983 ) y placenta humanas (*Frolik y col.*, 1983) y riñón bovino (*Roberts y col.*, 1983a), detectándose su presencia mediante su capacidad para inducir, junto con el EGF, el crecimiento y formación de colonias en agar blando de fibroblastos normales NRK (de riñón de rata) (*Roberts y col.*, 1981). El péptido maduro aislado es un homodímero de 25 KDa. *Derynck y col.* (1985b), fueron los primeros en clonar el ADNc del TGF- $\beta$  humano y de determinar la estructura primaria de su precursor. Posteriormente mediante el uso de este ADNc en el análisis de otras bibliotecas de distintos órganos, se identificaron 4 nuevas formas de TGF- $\beta$  denominadas: TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3, TGF- $\beta$ 4 y TGF- $\beta$ 5.

El TGF- $\beta$ 2 se purificó de varios tejidos incluyendo plaquetas porcinas, tejido óseo bovino, células de glioblastoma humano y células de mono BSC-1 (*Cheifetz y col.*, 1987; *Hanks y col.*, 1988; *Seyedin y col.*, 1985). De las secuencias de sus respectivos ADNc se identificó que todos los TGF- $\beta$ s eran sintetizados en forma de precursores. Los precursores para el TGF- $\beta$ 1 y el TGF- $\beta$ 2 poseían 390 y 412 aminoácidos respectivamente y un péptido señal de 20-23 aminoácidos ubicado en el extremo N-terminal del precursor (*Derynck y col.*, 1985b; *De Martin y col.*, 1987).

Los péptidos TGF- $\beta$  3-5 todavía no han sido purificados de fuentes naturales. Por ensayos de Northern Blot se demostró en distintos tejidos la presencia de sus respectivos ARNm.

El TGF- $\beta$ 3 ARNm se detectó en varias líneas de carcinomas humanos (A673, A549, A483), en distintas líneas celulares de origen mesenquimal de

humanos y roedores, en cordón umbilical humano y en embriones de gallina siendo este último el tejido con el mayor nivel de TGF- $\beta$ 3 ARNm (*Jakowlew y col.*, 1988a; *Derynck y col.*, 1988b; *Ten Dijke y col.*, 1988).

Los ADNc de TGF- $\beta$ 4 y TGF- $\beta$ 5 se clonaron de bibliotecas de condriocitos de gallina y de oocitos de rana respectivamente (*Jakowlew y col.*, 1988b; *Kondaiah y col.*, 1990). Tal como el TGF- $\beta$ 1 y el TGF- $\beta$ 2, estos nuevos TGF- $\beta$  se sintetizan también en forma de precursores con tamaños de 412, 304 y 382 aminoácidos para TGF- $\beta$ 3, TGF- $\beta$ 4 y TGF- $\beta$ 5 respectivamente. Todos los precursores para TGF- $\beta$  son procesados en un péptido maduro de 112 aminoácidos y la homología entre los mismos varía entre un 60 al 80%.

La fuente natural mas concentrada en TGF- $\beta$ 1 son las plaquetas (20mg/Kg) (*Van den Eijnden-van Raaij y col.*, 1988). El TGF- $\beta$ 1 es secretado por casi todas las células, en una forma biológicamente inactiva sin capacidad de unirse a receptores celulares y de ser reconocida por anticuerpos específicos para este péptido (*Miyazono y col.*, 1988; *Pircher y col.*, 1986). Se comprobó *in vitro*, que el TGF- $\beta$ 1 latente puede ser activado por acidificación, alcalinización o por la acción de agentes caotrópicos (*Lawrence y col.*, 1985; *Lyons y col.*, 1988), siendo un proceso importante para su acción autocrina/paracrina.

Recientemente se determinó la estructura de este complejo latente consistiendo en tres componentes: 1) una proteína moduladora de 125 a 160 KDa, 2) una proteína de 75 KDa denominada gp75, abarcando a la molécula precursora clivada del péptido señal de 29 aa y del TGF- $\beta$ 1 maduro, en estado dimérico, y 3) el TGF- $\beta$ 1 maduro de 112 aminoácidos también en forma dimérica (*Miyazono y col.*, 1988; *Wakefield y col.*, 1988). Los dímeros de gp75/TGF- $\beta$ 1 maduro se mantendrían unidos mediante puentes disulfuros entre las dos cadenas peptídicas. A su vez un puente disulfuro adicional une covalentemente la proteína moduladora al dímero gp75. No se conoce todavía si este último posee una actividad biológica propia una vez que ha sido eliminado del complejo. Se sabe que en este complejo latente existirían secuencias aminoacídicas muy conservadas entre las distintas especies y zonas de reconocimiento para integrinas (a excepción del TGF- $\beta$ 2).

Todavía no se han dilucidado los mecanismos fisiológicos responsables de la activación del complejo latente. Miyazono y Heldin (1989) demostraron que los

sitios de N-glicosilación ubicados en la proteína gp75 son necesarios para la mantención del estado latente de este complejo. Por otro lado, Lyons y col. (1988), demostraron que este péptido podía ser activado parcialmente por proteasas tal como plasmina, cathepsina D, etc. En ciertas condiciones, la formación de microambientes naturales ácidos podrían contribuir a la activación del complejo, tal es el caso de las heridas donde los macrófagos activados secretan sialisidasas y proteasas que provocarían una disminución del pH local (*Silver y col.*, 1988).

En el suero, la forma latente del TGF- $\beta$ 1 consiste en un complejo formado solamente por el dímero del TGF- $\beta$ 1 maduro y la macroglobulina- $\alpha$ 2 (*O'Connor-McCourt y col.*, 1987). Se supone que esta proteína sería la responsable de secuestrar al péptido activado frente a un exceso del mismo.

**Genes de TGF- $\beta$ s:** El precursor del TGF- $\beta$ 1 humano está codificado por 7 exones (*Derynck y col.*, 1987). Las posiciones de los exones están conservadas en los TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3 (*Derynck y col.*, 1988b). La secuencia codificante de todos los TGF- $\beta$  ARNm abarca aproximadamente 1200 nucleótidos, pero las especies detectadas por ensayos de Northern Blots poseen un tamaño de 1.7 a 6.5 Kb.

En humanos el transcripto detectado para el TGF- $\beta$ 1 posee un tamaño de 2.5 Kb, para el TGF- $\beta$ 2 de 4.1, 5.1 y 6.5 Kb y para el TGF- $\beta$ 3 de 3.0 Kb. En el caso del TGF- $\beta$ 4 en gallina se detectó un transcripto de 1.7 Kb y para el TGF- $\beta$ 5 en sapo uno de 2.5 Kb.

### **RECEPTORES para TGF- $\beta$ s**

La acción de los TGF- $\beta$ s se realiza mediante su unión a receptores específicos de membrana. Por estudios de estabilización covalente con [ $^{125}$ I]-TGF- $\beta$ , se determinaron distintos tipos de sitios receptores, siendo solamente los de clase I y II los considerados como moléculas transductoras. En todos los sistemas estudiados, los componentes clase I poseen un tamaño de 65 KDa, mientras que los de clase II de 85 KDa en células de roedores, de 95 KDa en células de humanos y de 110 KDa en gallina. Las afinidades de los TGF- $\beta$ s a las clases I y II de receptores, son TGF- $\beta$ 1 > TGF- $\beta$ 2 (*Cheifetz y col.*, 1988a, b) y en

contraste, ambos se unen con igual afinidad al receptor clase III. Este último es un dímero compuesto por subunidades de proteoglicano de 250-350 KDa (*Massagué, 1985*). Cada subunidad está compuesta por cadenas de glicosaminoglicano heparán sulfato y pequeñas cantidades de condrotina o dermatán sulfato unidas a una proteína central de aproximadamente 100-140 KDa, donde reside el sitio de unión para el TGF- $\beta$  (*Segarini y col., 1988; Cheifetz y col., 1988a*). Un descubrimiento interesante es que los receptores clase III pueden unirse a componentes de la matriz celular como también de mediar la organización del citoesqueleto, funciones que están relacionadas con la actividad biológica del TGF- $\beta$  en algunas líneas celulares mesenquimales. Se sugirió que este receptor puede controlar la disponibilidad de TGF- $\beta$  activo, en el microambiente local extracelular y así controlar la cantidad del mismo a ser presentada al receptor que llevará la respectiva señal transduccional.

Generalmente todas estas clases de receptores coexisten en las células y hasta ahora no se comprobó una regulación de estos sitios por sus ligandos, sino que son rápidamente reciclados a la membrana.

Massagué y col. (1985), sugirieron que el receptor clase III, es capaz de mediar todas las funciones en las cuales tanto el TGF- $\beta$ 1 como el TGF- $\beta$ 2 son equipotentes, lo que incluye la regulación de la matriz extracelular como también la mayoría de los efectos sobre el crecimiento y diferenciación (*Cheifetz y col., 1988a y b*). Por otro lado, los mismos autores proponen que la actividad biológica específica del TGF- $\beta$ 1, tal como el efecto inhibitorio sobre la proliferación celular, es mediada por los receptores clase I y II.

### **ACTIVIDAD BIOLÓGICA de los TGF- $\beta$ s y CANCER de MAMA**

El TGF- $\beta$  es uno de los factores de crecimiento multifuncionales (*Sporn y Roberts, 1988a y b*), ya que la naturaleza de sus acciones depende de varios parámetros tal como del tipo celular, del estado de diferenciación y del crecimiento y presencia de otros factores de crecimiento. Tal es así que:, a- el TGF- $\beta$ 1 es capaz de estimular el crecimiento en agar blando de células NRK en presencia de EGF y de inhibirlo y antagonizar la acción mitogénica del EGF, cuando estos fibroblastos son cultivados en monocapas (*Roberts y col., 1985*); b-



el TGF- $\beta$ 1 puede estimular o inhibir el crecimiento en agar blando de células 3T3 de rata Fisher transfectadas con el oncogén myc, dependiendo de la presencia de PDGF o EGF, respectivamente, en el ensayo (Roberts y col., 1985); c- el TGF- $\beta$ 1 puede estimular la diferenciación de ciertos tipos celulares tal como de células epiteliales de bronquios (Masui y col., 1988) y precondriocitos (Seyedin y col., 1985) e inhibir la de adipocitos (Igotz y col., 1986b) y mioblastos (Massagué y col., 1986).

Una de las acciones naturales del TGF- $\beta$  es el aumento en cantidad de la matriz extracelular. Este efecto se produce: a- por activación de la expresión, síntesis y secreción de proteínas de la matriz extracelular (aumentando la transcripción de los genes para fibronectina, colágeno, etc); b- por inhibición de la síntesis de enzimas proteolíticas encargadas de degradar las proteínas de la matriz extracelular (serina, tiol y metaloproteasas) y por aumento de la síntesis de inhibidores de proteasas encargados de bloquear la actividad de las mismas (inhibidor del activador del plasminógeno- PAI, inhibidor tisular de metaloendoproteasas-TIMP); y c- por aumento de la transcripción, transducción y procesamiento de los receptores celulares para las proteínas de la matriz extracelular (subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de integrinas, etc) (Igotz y col., 1986b, 1987; Roberts y col., 1988).

Por otro lado, el TGF- $\beta$ 1 y el TGF- $\beta$ 2 son considerados como potentes agentes inmunoregulatorios, aumentando la función de los monocitos y suprimiendo la proliferación y función de los linfocitos (Kehrl y col., 1986a,b, 1989). Poseen una actividad "anti-interleuquina" oponiéndose a las acciones de las interleuquinas y a la de otros agentes inmunoregulatorios tal como el TNF y el Interferon (Rook y col., 1986).

Los TGF- $\beta$ s están involucrados en procesos tal como embriogénesis, inflamación y reparación, y carcinogénesis dependientes de otros procesos tal como el de angiogénesis. En varios sistemas *in vivo*, el TGF- $\beta$ 1 actúa como un agente angiogénico, sin conocerse hasta el momento si su efecto es directo sobre las células endoteliales o si depende de su acción sobre otras células tal como macrófagos capaces de estimular indirectamente a las células endoteliales (Roberts y col., 1985). En general los resultados obtenidos *in vitro* demostraron que el TGF- $\beta$ 1 contrarresta la acción del FGF inhibiendo la proliferación y la movilidad de las

células endoteliales y modulando la expresión de genes que conducen a un aumento de la síntesis de proteínas de la matriz extracelular (*Baird y col.*, 1986; *Müller y col.*, 1987).

Por otro lado, la mayoría de las líneas celulares epiteliales en cultivo, experimentan una inhibición del crecimiento en presencia de TGF- $\beta$  (*Moses y col.*, 1985; *Fine y col.*, 1985), existiendo algunas excepciones (*Gabrielson y col.*, 1988). Dicha inhibición es acompañada generalmente por diferenciación celular. Silberstein y Daniel (1987), utilizando implantes de TGF- $\beta$  en mamas de ratones, demostraron una inhibición local del crecimiento y de la morfogénesis tisular, con un bloqueo en la formación de los ductos.

En líneas celulares de cancer de mama y en el epitelio mamario normal el TGF- $\beta$  actúa como un inhibidor autocrino del crecimiento celular (*Wang y col.*, 1986). Algunas de estas líneas celulares secretan un péptido semejante al TGF- $\beta$  con capacidad de unirse a receptores específicos y de inducir un fenotipo transformado en los fibroblastos NRK y AKR-2B (*Knabbe y col.*, 1987). Por otro lado, todas las líneas de cancer de mama expresan TGF- $\beta$ 1 ARNm de 2.5 Kb (*Derynck y col.*, 1987). En la línea celular de cancer de mama humano, MCF-7, el tratamiento con estradiol e Insulina inhibe la secreción de TGF- $\beta$ 1 mientras que los glucocorticoides y antiestrógenos la potencian (*Knabbe y col.*, 1987).

En general las evidencias indican que el TGF- $\beta$  actúa controlando el crecimiento de varias líneas celulares epiteliales y linfoides normales pero en muchos sistemas transformados (células NIH3T3 y 3T3 de rata Fisher transformadas con el oncogén ras, células de leucemia, de retinoblastomas, etc ) se demostró una pérdida de su capacidad inhibitoria (*Anzano y col.*, 1985; *Stern y col.*, 1986; *Kimchi y col.*, 1988; *Keller y col.*, 1988) .

En algunos casos la falta de respuesta al TGF- $\beta$ 1 se relacionó con la ausencia de receptores específicos para este factor de transformación. Tal es el caso de las células de feocromocitomas PC-12 de rata, células de retinoblastomas humanos y varias líneas celulares de leucemias (*Kimchi y col.*, 1988; *Keller y col.*, 1989).

Por otro lado, existen algunos sistemas celulares no-respondedores con niveles normales o elevados de receptores para TGF- $\beta$ , sugiriéndose la presencia de alteraciones en el mecanismo trasduccional de su/s receptor/es específico/s (*Chimkers, 1987*).

En muchas células tumorales se observó una expresión elevada de TGF- $\beta$  en comparación con los tejidos normales del cual provienen (*Derynck y col., 1987*).

Adicionalmente, debido a que muchas células tumorales han perdido la capacidad de responder a este péptido, se sugirió que TGF- $\beta$  puede actuar en forma paracrina sobre el stroma tumoral conduciendo a procesos, tales como los descritos anteriormente, sobre el sistema inmune, en la neovascularización y en la elaboración de tejido conectivo. De esta forma el tumor, secretando continuamente TGF- $\beta$ , puede utilizar los mecanismos naturales de reparación para apoyar el crecimiento y controlar las reacciones producidas por el sistema inmune del hospedador.

## SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA

La Angiotensina II (Ang II), es un octapéptido sintetizado en los gonadotropos de la hipófisis anterior. Al sistema periférico completo de síntesis y metabolización de la Ang II se lo denominó Sistema Renina-Angiotensina (SRA), basándose en la enzima limitante, Renina, y en el péptido activo, Ang II.

En el clásico SRA, un péptido precursor de 14 aminoácidos, el angiotensinógeno, originado en el hígado, es clivado por la Renina produciendo un un deca péptido Angiotensina I (Ang I). La Renina es una Aspartil-proteasa, sintetizada y liberada a la circulación por las células yuxtglomerulares del riñón. Posteriormente, la Ang I es convertida a Ang II por la Enzima Convertidora de Angiotensina (ACE) (*Vallotton, 1987*). Toda esta cascada metabólica ocurre en la sangre circulante, y la Ang II actúa sobre sus receptores de alta afinidad localizados principalmente en las paredes de los vasos sanguíneos, en la zona glomerulosa de la glándula adrenal y en el riñón produciendo: vasoconstricción, liberación de Aldosterona y retención de  $\text{Na}^+$  respectivamente.

Como es sabido, este SRA periférico es un sistema hormonal con importantes funciones en la regulación de la homeostasis, principalmente de la presión sanguínea.

Durante los últimos años se localizaron los componentes del SRA en una gran variedad de tejidos, tal como la pared arterial, riñón, glándula adrenal, corazón, glándula pituitaria, cerebro, gónadas (*Phillips, 1987; Hall, 1991; Millan y Aguilera, 1988; Bumpus y col., 1988; Dzan, 1988*). Estos hallazgos, sugirieron la existencia de SRA locales que estarían involucrados en la regulación fina individual de cada tejido, en forma independiente del componente circulatorio.

La hormona vasopresora, Angiotensina II posee un papel crucial en el mantenimiento de la homeostasis de electrolitos y en la función cardiovascular por medio de su acción en numerosos sistemas orgánicos, incluyendo pared vascular, gónadas, riñón, cerebro, etc. Además de estas funciones nombradas, la Ang II participa también en la neurosecreción, proliferación y diferenciación celular. Estos últimos efectos hacen considerar a la Ang II como un factor de crecimiento,

capáz de inducir hipertrofia en el miocardio y en el músculo esquelético (*Katz, 1990*).

Existen dos clases farmacológicamente distintas de receptores para Ang II, el denominado AT1 y el AT2, siendo el primero el responsable de las funciones mas conocidas de la Ang II. El papel fisiológico del AT2 todavía no ha sido dilucidado (*Wong y col, 1992*).

Con el uso de antagonistas no peptídicos tal como Losartán (DuP#753) y PD123177, fue posible bloquear solamente la acción de la Ang II a nivel del receptor específico, sin tener efectos agonistas o indeseables tal como los obtenidos con el uso de inhibidores de la Enzima Convertidora de Angiotensina (ACE) (Captopril o Enalapril). Los sitios AT1 son sensibles al bloqueo por Losartán, mientras que los AT2 al de PD123177 (*Smith y col, 1992*).

Por estudios del ADNc del receptor AT1, de varias especies, se demostró que el mismo codifica para una proteína de 359 aminoácidos y 41 KDa, con 7 dominios de transmembrana, acoplado a un camino transduccional vía proteína G, fosfolipasa C, inositoles fosfatos y movilización de Ca<sup>++</sup>.

Los sitios AT2 de mamíferos, se clonaron recientemente demostrando que poseen 7 dominios hidrofóbicos de transmembrana con una homología menor a un 30% con el receptor AT1 (*Sandberg y col. , 1994*). El receptor AT1 es menor (58KDa), que el tipo AT2 de 68 KDa y además es insensible al ditiotreitol y no utiliza el camino de los inositoles fosfatos/Ca<sup>++</sup> (*Wong y col., 1992*).

Se han detectaron también distintas subclases de receptores AT1 y AT2, determinando la gran heterogeneidad de los mismos.

El papel mitogénico de la Ang II, estimulando el crecimiento de las células del músculo esquelético (*Campbell y col., 1991*), cardíaco (*Morgan y col., 1991*) y de otras células (*Schelling y col., 1991*) en cultivo, se demostró por el uso de inhibidores del SRA (inhibidores de ACE o antagonistas de receptores para Ang II). La presencia del SRA en varias líneas celulares, sugirió la existencia de su efecto autocrino-paracrino en la regulación del crecimiento celular. Las

experiencias con el uso de Losartán, confirmaron la presencia de interacciones complejas entre la Ang II y otros factores promotores del crecimiento.

En cultivos quiescentes de células vasculares de músculo esquelético, se demostró que el tratamiento con Ang II producía una inducción temprana, a nivel transcripcional, de los genes *c-fos*, *c-myc* y *c-jun* y un aumento de la secreción del factor de crecimiento autocrino proliferativo, PDGF-AA y del factor antiproliferativo TGF- $\beta$  (Naftilan, 1992; Gibbons y col., 1992).

Todos estos resultados concluyen que la Ang II es capaz de estimular tanto un mecanismo proliferativo como uno antiproliferativo.

### SRA y Cancer

Otra de las funciones del SRA, es la formación de nuevos vasos sanguíneos, proceso conocido con el nombre de angiogénesis. El crecimiento progresivo de tumores sólidos es dependiente de la habilidad para inducir el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos. Las células tumorales poseen mayor ventaja de entrar en el ciclo mitótico cuando están ubicadas cerca de los capilares. La falta de vascularización produce isquemia tisular, resultando en un arresto de la división celular y necrosis.

La presencia de la enzima Renina en varios tipos de neoplasias altamente vascularizadas, sugiere que esta enzima, a través de la Ang II, esté implicada en la angiogénesis tumoral (Ariza y col., 1988). Con estos resultados, es de considerar el uso de terapias con antagonistas del SRA.

Por otro lado, la efectividad de la quimioterapia dependería de un aumento selectivo de distribución de las drogas antitumorales al tejido maligno. Este hecho podría efectuarse mediante el uso de compuestos que incrementasen el flujo sanguíneo en la masa tumoral. Suzuki y col. (1981), demostraron que la administración continua de Ang II, en ratas DONRYU transplantadas subcutáneamente con células de hepatomas AH272, sensibles a mitomicina, producía un aumento selectivo del flujo sanguíneo tumoral sin afectar al del tejido normal. Este efecto potenciaba la acción antitumoral de la droga nombrada. Estudios similares se efectuaron en pacientes con cancer de mama, encontrándose

resultados efectivos por administración intraarterial de agentes antitumorales y Ang II (*Noguchi y col.*, 1988; *Koyama y col.*, 1983).

Por lo tanto, con respecto a estas observaciones y teniendo en cuenta la habilidad de la **Angiotensina II** en promover tanto el crecimiento celular como la síntesis de proteínas, se ha propuesto que la misma podría actuar como un GF, regulando la proliferación de las células malignas y modificando mediante el aumento del flujo sanguíneo, la velocidad del crecimiento tumoral (*Ariza A.*, y *col.*, 1988; *Schelling y col.*, 1991).

En la investigación presente también se estudió la presencia de los componentes del SRA en los adenocarcinomas mamarios murinos inducidos por MPA.

## **OBJETIVOS**

Los objetivos de este trabajo fueron:

- 1- Aislamiento, purificación y caracterización del EGF, IGF-I e IGF-II en los adenocarcinomas mamarios murinos inducidos por MPA.
- 2- Estudio de la expresión a nivel ARNm de los factores de crecimiento nombrados y de TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\alpha$ .
- 3- Determinación de la influencia del MPA en la transcripción (ARNm) y traducción (proteína) de los factores de crecimiento insulina similares, epidérmico y factores de transformación.
- 4- Determinación de la participación del EGF endócrino en la inducción y crecimiento de los tumores experimentales.
- 5- Estudio de la presencia de receptores para EGF, IGF-I, IGF-II y TGF- $\beta$ s en los adenocarcinomas mamarios murinos inducidos por MPA.
- 6- Caracterización de los EGF-R, IGF-R1, IGF-R2 y TGF- $\beta$ -R presentes de los tumores experimentales.
- 7- Determinación de la influencia del MPA en los niveles y propiedades de los sitios receptores para EGF, IGF-I, IGF-II y TGF- $\beta$ 1.
- 8- Determinación de la presencia de componentes del Sistema Renina-Angiotensina en los adenocarcinomas mamarios inducidos por MPA.



## ***MATERIALES Y MÉTODOS***

## **1-Tumores experimentales**

### **A) Inducción de adenocarcinomas mamarios por MPA**

Se utilizaron ratones hembras de la cepa BALB/c de dos meses de edad obtenidos del bioterio de la *Sección de 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 (Farlutale 500, Farmitalia), en forma de *pellets* subcutáneos de liberación continua, cada 2 meses durante un año, ii) 40 ratones fueron inoculados de la misma manera con el exipiente de la hormona. Los animales fueron controlados semanalmente. Cuando los tumores comenzaban a aparecer los ratones eran separados. El sacrificio de los animales se efectuaba cuando los tumores poseían un tamaño de aproximadamente 1 cm<sup>3</sup>. Se consideró arbitrariamente como fecha de aparición de un tumor (latencia tumoral), la fecha en la cual el tumor era palpable. Algunas muestras tumorales fueron conservadas a -70°C y otras transplantadas en ratones singeneicos. En todos los casos se realizaron autopsias completas.

El porcentaje de incidencia tumoral se calculó utilizando el método descrito por Lanari y col (1986a), teniendo en cuenta el riesgo de desarrollar tumor que tuvieron los animales que murieron durante el transcurso del experimento.

### **B) Transplantes singeneicos de los adenocarcinomas de mama inducidos por MPA**

Varios de los tumores primarios inducidos por MPA, que habían crecido luego de varios meses de inoculación (4 a 12 meses), fueron elegidos para los distintos estudios efectuados. Cada uno se transplantó sucesivamente en 8 ratones de los cuales 4 fueron inoculados subcutáneamente con un *pellet* de 20 mg de MPA. Los transplantes se efectuaron por medio de un trocar (trozos de 1 a 2 mm<sup>3</sup>) en la zona inguinal derecha del animal, contralateralmente al inóculo de MPA. El crecimiento del tumor se midió cada tres días con un calibre Vernier (largo y

ancho). Aquellos pasajes tumorales que crecieron solamente en presencia de MPA o que experimentaron un aumento significativo de su tamaño se los denominó HD, mientras que los que no modificaron su velocidad de crecimiento tumoral, en animales tratados como en no tratados con MPA, se los denominó HI. De los primeros solamente se transplantó aquellos que habían crecido en animales tratados con MPA. Cada muestra tumoral se guardó a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta efectuar los ensayos respectivos.

## **2-Cultivos primarios de células epiteliales o fibroblastoideas de los adenocarcinomas mamarios inducidos por MPA**

Los tumores de 50 a 100 mm<sup>2</sup>, obtenidos aproximadamente a los 15 días del trasplante, se extirparon esterilmente y se lavaron varias veces en medio DMEM/F12 (1:1) + 5% de antibiótico antimicótico. Posteriormente se los cortó en trozos pequeños los que se incubaron por 20 minutos en la solución enzimática (Tripsina 0,25% + Colagenasa Tipo II 0,25% + albúmina sérica bovina (BSA) 0,5%, en PBS). El sobrenadante resultante se recogió y se resuspendió con 20 ml de medio básico (DMEM/F12 + 1% antibiótico + 5% SFB (Gibco BRL) adsorbido previamente con carbón (SFBch)). Los trozos de tumor restantes se incubaron adicionalmente por 20 minutos con la solución enzimática y el sobrenadante obtenido se lo unió al anterior.

Para separar células epiteliales de los fibroblastos se utilizó la técnica descrita por Pandis y col. (1992), con algunas modificaciones. Luego de la disgregación enzimática, el tejido disgregado se transfirió a dos tubos de centrifuga, se adicionó 10 ml de medio básico a cada tubo, centrifugándolos a 200 g durante 10 minutos. El sobrenadante resultante se descartó y los precipitados se unieron en 5 ml de medio básico. La suspensión obtenida se dejó sedimentar por 15 a 20 minutos. Las células sedimentadas dieron origen a la fracción enriquecida en células epiteliales (Ep) y las que quedaron en suspensión a la fracción fibroblástica (Fb). Ambas fracciones se separaron en 2 tubos de 50ml Falcon y el procedimiento se volvió a repetir varias veces. En el caso de la fracción epitelial se eligió el material sedimentado el cual se volvió a procesar y mientras que para la fracción fibroblástica se eligió el sobrenadante. Después de

repetir este procedimiento la mayor cantidad de veces (hasta que en el sobrenadante correspondiente a la fracción epitelial no existieran células) se pudo considerar una separación exitosa de ambas poblaciones las cuales se sembraron en frascos de cultivo o en placas de 24 hoyos.

Los Fb fueron sembrados en el medio de cultivo con 10% de SFB y luego de 2 horas de incubación, en incubadora gaseada (5% CO<sub>2</sub>) a 37°C, se descartó la población no adherente. Los cambios de medio se realizaron cada 48 horas. A los 5-7 días los cultivos estaban en semiconfluencia, momento en que fueron usados para los distintos experimentos

Por otro lado, en el caso de los cultivos epiteliales se permitió la adherencia de los agregados celulares al frasco de cultivo por 24 horas, luego de las cuales se recogió cuidadosamente el sobrenadante y se agregó 5 ml de medio de crecimiento. Este último sobrenadante, conteniendo aún agregados celulares que no se habían adherido, fueron trasvasados a otro frasco de cultivo. Luego de todo este procedimiento, los cultivos resultantes se componían casi exclusivamente de células epiteliales (95%). El medio fue reemplazado por medio fresco cada 48 horas, y al cabo de 7 a 10 días, cuando las islas epiteliales estuvieron superpobladas, los cultivos fueron tripsinizados con solución de tripsina (Tripsina 0,25% en PBS ). De acuerdo a las observaciones de que los fibroblastos tardaban mucho para despegarse con tripsina, las células que se despegaron primero no fueron juntadas con las células que tardaron mayor tiempo en despegarse.

### **3-Marcación de factores de crecimiento con <sup>125</sup>I**

#### **A) Marcación y purificación de EGF**

El EGF murino (Collaborative research, receptor grade) se marcó por adición consecutiva de varias alícuotas de 5 µl de una solución diluída de Cloramina T (0.006%) a 10 µl de *buffer* fosfato, pH 7.4, conteniendo 1 mCi de Na<sup>125</sup>I (Carrier free, New England) y 5 µg de EGF. La iodinación se detuvo

cuando se alcanzó una actividad específica de  $150 \mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ , determinada por precipitación con TCA. La mezcla de reacción se transfirió a una columna de Sephadex G-25 de  $0.9 \times 10$  cm, equilibrada previamente con *buffer* PBS Dulbecco conteniendo 0.2% de albúmina sérica bovina (BSA). La actividad específica final se determinó por estudios de autodesplazamiento (*Calvo y col.*, 1983) y la máxima capacidad de unión mediante el uso de membranas de placenta humanas a término cuya obtención se describe posteriormente.

## **B) Marcación y purificación de IGF-I e IGF-II**

El IGF-I e IGF-II humanos recombinantes ( Chiron Corporation, Emeryville, CA) se marcaron con el mismo procedimiento descrito anteriormente para el EGF. Las purificaciones se realizaron en columnas de Sephadex G-50 de  $0.9 \times 10$  cm, equilibradas previamente con *buffer* fosfato 0.05 M, NaCl 0.1M, EDTA 0.01M con Azida 0.005% y Tween-20 0.05% (v/v). La actividad específica final obtenida fue del orden de 150-175 uCi/ug para ambos péptidos y la máxima capacidad de unión se determinó por el uso de preparados de membranas de placentas humanas a término.

## **C) Marcación y purificación de TGF- $\beta$ 1**

El TGF- $\beta$ 1 se marcó por el método de Cloramina T de forma semejante a la desarrollada para el EGF. La purificación del péptido marcado se llevó a cabo en columnas de Sephadex G-25 de  $0.9 \times 10$  cm equilibradas con HCl 4 mM adicionado con NaCl 75 mM y BSA 0.1%. Fracciones de 0.5 ml eluidas con la misma solución, se recogieron en un tubo de polipropileno conteniendo 0.5 ml de una solución de HCl 4 mM con BSA 1%. Los tubos que contenían al [ $^{125}\text{I}$ ]-TGF- $\beta$ 1, se juntaron y se diluyeron a una relación de  $15 \mu\text{Ci}/\mu\text{g}$  guardándolos en pequeñas alícuotas a  $-70^\circ\text{C}$  hasta su uso posterior.

## **4- Purificación, caracterización y cuantificación de Factores de Crecimiento**

### **A) Extracción ácida de Factores de Crecimiento**

Los tejidos tumorales (600-1000 mg) se homogeneizaron en una relación 1:4 (p/v) en ácido acético 2M con PMSF (fenilmetilsulfonilfluoruro) 0.5 mM, ZPCK (N-CBL-L-fenilalanina clorometil cetona) 0.025 mM, TLCK (N $\alpha$ -p-Tosil-L-lisina clorometil cetona) 0.025 mM y TPCK ( N-tosil-L-fenilalanina clorometil cetona) 0.025 mM. Las muestras se extrajeron durante 12 horas a 4°C y posteriormente se centrifugaron a 5000 g por 30 minutos. El precipitado resultante se reextrajo durante 4 horas a 4°C con la misma solución acética. Ambos sobrenadantes se juntaron (4-5 ml vol final) y alícuotas de los mismos se sembraron en columnas VILMAFIX RED 3B-HE o se liofilizaron y se guardaron hasta su posterior utilización. En este último caso, los extractos secos se disolvieron en 400  $\mu$ l de HCl 4 mM neutralizándolos con 240  $\mu$ l de *buffer* fosfato 0.5M, pH 7.4. El porcentaje de recuperación, utilizando [ $^{125}$ I] IGF-I o [ $^{125}$ I] IGF-II con esta técnica, fue de un 85%.

### **B) Ensayos de purificación por columnas VILMAFIX RED 3B-HE**

Los distintos extractos tumorales ácidos se purificaron por columnas (0.7x2.5 cm) de Sephadex G-50 acopladas al colorante diazoico Vilmafix Red 1001 (Vilmax), equilibradas con ácido acético 0.05M, Tween 0.05%. Se sembraron 0.5-1 mg/100  $\mu$ l de proteínas de cada extracto tumoral, eluyéndose con NaOH 0.1N y posteriormente con *buffer* fosfato 0.05 M, pH 7.5. El porcentaje de recuperación por este método se determinó por el uso de [ $^{125}$ I] IGF-I o [ $^{125}$ I] IGF-II, obteniéndose un valor total del 75 al 80%.

La verificación de la ausencia de proteínas transportadoras de IGFs en los eluidos de las distintas purificaciones realizadas, se determinó por incubaciones de alícuotas de cada columna con [ $^{125}$ I] IGF-I o [ $^{125}$ I] IGF-II (40,000 dpm) en *buffer* Tris 25 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM. pH 7.4, por 12 horas a 4°C. La separación del ligando radioactivo unido del libre se efectuó por el agregado de carbón activado de la forma descrita por Moses y col. (1979), y la posible radioactividad

remanente en el sobrenadante se cuantificó con un contador sólido  $\gamma$ , Beckman 4000.

### **C) Cromatografía de exclusión molecular**

Los extractos acídicos de un *pool* de tumores HD (provenientes de animales tratados o no tratados con MPA) y de tumores HI, obtenidos según la técnica descripta anteriormente se liofilizaron y se disolvieron en ácido acético 1M. Alícuotas conteniendo 100 mg de proteínas de cada extracto se sembraron en columnas de Bio-Gel P-60 (2.6x90 cm) equilibradas con ácido acético 1M. Las eluciones se efectuaron con la misma solución a un flujo de 15 ml/h a temperatura ambiente. El volúmen colectado en cada fracción fue de 3 ml y alícuotas de cada una se liofilizaron para su posterior uso en los correspondientes ensayos de RIA para IGF-I y RRA para IGF-II.

### **D) Radioinmunoanálisis para EGF**

Dicho ensayo se efectuó en un volúmen final de 300  $\mu$ l compuesto por 100  $\mu$ l de EGF murino standard (Collaborative Res. ) o de las muestras a analizar, 100  $\mu$ l de anti-EGFm de conejo apropiadamente diluído (1:100,000 dilución final, Collaborative Research) y 100  $\mu$ l de [ $^{125}$ I]-EGFm (20000 dpm) en *buffer* PBS con Azida 0.005% y BSA 0.2%. Los tubos se incubaron a 4°C durante 12 horas luego de la cual se adicionaron 100  $\mu$ l de suero normal de conejo (1:3 v/v) y 100  $\mu$ l de segundo anticuerpo (IgG anti-conejo) con una incubación adicional de 12 horas. Luego de centrifugarlos a 3000 g por 15 minutos, los sobrenadantes se descartaron y los precipitados se contaron en un contador sólido  $\gamma$ , Beckman 4000. Las determinaciones de las muestras se realizaron por triplicado. El límite de detección del ensayo fue de 25 pg.

## **E) Radioinmunoanálisis para IGF-I**

La base de la metodología utilizada fue similar a la de la cuantificación de EGF detallada anteriormente a diferencia de que el volumen final de incubación en este caso se compuso de 100 µl de IGF-I standard o de las muestras a analizar, 100 µl de anticuerpo anti-IGF-I de conejo apropiadamente diluido (1:1000 dilución final ) y 100 µl de [<sup>125</sup>I] IGF-I (30000 dpm) en *buffer* fosfato 0.5M, NaCl 0.1M, EDTA 0.01M con Tween-20, 0.05% y azida 0.05%. Las incubaciones se realizaron a 4°C por 12 horas luego de la cual se agregó el suero normal de conejo (1:3 V/V) y el segundo anticuerpo ( IgG anti-conejo) y se dejó 12 horas a la misma temperatura. Luego de centrifugarlos a 3000 g por 15 minutos, los sobrenadantes se descartaron y los precipitados se cuantificaron en un contador sólido γ, Beckman 4000. Las determinaciones de las muestras se realizaron por triplicado. El límite de detección del ensayo fue de 19.5 pg.

## **5- Estudio de Receptores**

### **A) Tratamiento de tejidos para la obtención de receptores para hormonas esteroideas**

Todos los procedimientos se realizaron a 0-4 °C. Las muestras tumorales fueron pesadas y homogeneizadas, en relación 1/4 p/v, en *buffer* Tris-ClH 20 mM , pH 7.4, conteniendo EDTA 1.5 mM, DTT 0.25 mM, Molibdato de sodio 20 mM y Glicerol 10% v/v. La homogeneización se llevó a cabo con un homogeneizador Ultraturrax (IKA Instruments) por 15 segundos con intervalos de 1 minuto. Luego de una centrifugación del mismo a 800 g por 15 minutos, el sobrenadante resultante se centrifugó en primer lugar a 12000 g por 30 minutos y luego a 105000 g por 40 minutos en una ultracentrífuga Beckman L2-65B. La fracción sobrenadante final se utilizó para los estudios de receptores de hormonas esteroideas.



## **B) Tratamiento de tejidos para la obtención de receptores para factores de crecimiento**

### **i- Obtención de receptores para EGF de membranas plasmáticas de placentas humanas a término**

El tejido de placenta libre de corion, amnios, cordón y grandes vasos se homogeneizó en relación 1/10 p/v. en *buffer* Tris 25 mM , pH 7.4, conteniendo Sacarosa 0.25 M, PMSF ( fenilmetilsulfonilfluoruro) 0.5 mM, ZPCK (N-CBZ-L-fenilalanina clorometil cetona) 0.025 mM, TLCK (N $\alpha$ -p-Tosil-L-lisina clorometil cetona) 0.025 mM y TPCK (N-tosil-L-fenilalanina clorometil cetona) 0.025 mM. Se utilizó un homogeneizador Ultraturrax (IKA instruments). Este homogenato se centrifugó a 600g durante 10 minutos y el sobrenadante resultante a 10000g por 30 minutos. Este último sobrenadante se ajustó a una concentración de NaCl 0.1 mM y MgSO<sub>4</sub> 20 mM y se centrifugó a 48000g por 40 minutos en una ultracentrífuga Beckman L2-65B. El precipitado resultante se resuspendió en PBS-Dulbecco, pH 7.4 a una concentración final de 5-10 mg proteína/ml y se utilizó como fuente de receptores para EGF.

### **ii- Tratamiento de tejidos tumorales para la obtención de receptores para EGF, IGF-I e IGF-II**

#### **#-Obtención de preparados crudos de membranas para la medición de receptores de EGF**

Esta técnica como la siguiente consiste en el tratamiento de los tejidos con un *buffer* de pH:3, el cual permite la disociación del factor de crecimiento endógeno de los receptores de membrana.

Los tumores fueron removidos de los animales y procesados inmediatamente. Todos los procedimientos se realizaron a 4°C. Los tejidos tumorales se homogeneizaron en relación 1/4 (p/v) con un *buffer* Glicina 50 mM, NaCl 100 mM, pH 3, conteniendo PMSF 0.5 mM, ZPCK 0.025 mM, TLCK 0.025 mM y TPCK 0.025 mM. El homogenato resultante se filtró por membrana de Nitex y se centrifugó a 5000g por 30 min. El precipitado obtenido se

resuspendió en el volumen original de *buffer* Tris 25 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, pH 7.4, e inhibidores de proteólisis a una concentración final de aproximadamente 1 µg de proteína/µl de solución.

### **##-Obtención de preparados de membranas libres de proteína transportadoras de IGFs**

Se utilizó el método descrito por Barenton y col. (1988). Los tejidos tumorales se homogeneizaron en relación 1/4 (p/v) con un *buffer* glicina 50 mM, NaCl 100 mM, pH 3, con los inhibidores de proteólisis descritos anteriormente. El homogenato resultante se filtró por membrana de Nitex y se centrifugó a 105000g por 30 min. El precipitado obtenido se resuspendió en el volumen original de *buffer* Tris 10 mM, pH 7.4, con Sacarosa 0.25 M, EDTA 1mM e inhibidores de proteólisis y se centrifugó a 5000g por 10 min. El sobrenadante se diluyó al medio con *buffer* Tris 25 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, pH 7.4, e inhibidores de proteólisis y se centrifugó a 105000g por 1 hora. Al precipitado obtenido se lo denominó fracción microsomal, la cual se resuspendió en el último *buffer* y se incubó durante 12 horas a 4°C con agitación. Luego se la centrifugó nuevamente a 105000g por 45 min y se resuspendió a una concentración final de 1 µg/µl utilizándosela para los ensayos radioligando-receptor para IGF-I e IGF-II y para la caracterización de sus receptores.

En todos los casos la cuantificación de la concentración de proteínas de los preparados de membranas se determinó por el método de Lowry y col. (1951), mediante previa solubilización de alícuotas de las distintas fracciones microsomales en NaOH 0.5M a 90°C durante 30 min.

## **C) Estudios de receptores para Hormonas Esteroideas**

### **i- Ensayos Radioligando-Receptor**

El método utilizado se basa en el original descrito por Korenman y Dukas (1970), modificado por Calandra y col. (1980). Alícuotas de 100 µl de la fracción citosólica de cada adenocarcinoma estudiado, se incubaron con una serie de concentraciones de [<sup>3</sup>H]-Estradiol ({ 2,4,6,7-3H} estradiol , 169 µCi/mmol, New

England Nuclear Corp. Boston, Ma) (0.2-30 nM); o de [<sup>3</sup>H]-R5020 ({17- $\alpha$ -metil-3H}R5020, 87  $\mu$ Ci/mmol, New England Nuclear Corp.) (0.2-30 nM), con o sin un exceso de 100 veces en molaridad de DES (Dietilestilbestrol) o R5020 (New England Nuclear Corp.). La unión inespecífica del Estradiol y el R5020 a la globulina transportadora de hormonas sexuales o a la de cortisol se eliminó mediante un agregado de un exceso de 200 veces en molaridad de DHT (Dihidrotestosterona) y Cortisol respectivamente. Los datos obtenidos se analizaron por el método de Scatchard (1949). Tanto para ER como para PR los resultados obtenidos se expresaron en fmol/mg de proteína.

## **D) Estudios de receptores para EGF, IGF-I e IGF-II**

### **i- Ensayos Radioligando-Receptor**

#### **#-Estudios de unión de EGF a sus receptores en los tumores experimentales**

Los estudios de unión del EGF a sus receptores de membrana se realizaron en *buffer* PBS- Dulbecco, pH 7.4, conteniendo 2% de albúmina sérica bovina. El volumen final de incubación fue de 250  $\mu$ l. Una alícuota de los distintos preparados de membrana de aproximadamente 100  $\mu$ g de proteína, se incubaron con una concentración saturante de [<sup>125</sup>I]-EGFm 2 nM, por 2 horas a temperatura ambiente o 12 horas a 4°C. La unión inespecífica se determinó mediante el agregado adicional de un exceso de 500 ng de EGF. La incubación se detuvo por el agregado de 2 ml de *buffer* fosfato 0.05M, NaCl 0.1 M conteniendo azida 0.05% y albúmina 0.2%, separando la hormona unida de la libre por centrifugación a 3000 g por 15 min. La radioactividad retenida en el precipitado se cuantificó en un contador sólido  $\gamma$ , Beckman 4000. Todas las determinaciones en cada muestra tumoral se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron en fmol/ mg de proteína de membrana.

## **##-Estudios de la unión del IGF-I a sus receptores en los tumores experimentales**

La metodología utilizada fue idéntica a la descrita para EGF. Una alícuota de 50-100 µg /100 µl de proteína de los distintos preparados de membrana tumorales se incubaron con 100 µl de [<sup>125</sup>I]-IGF-I ( 33-1000 pM) en un volumen final de 250 µl de *buffer* Tris 25 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, pH 7.4. La unión inespecífica se determinó en presencia de un exceso de 500 ng de IGF-I. La separación de la hormona unida de la libre se realizó por dilución y centrifugación. Los ensayos se realizaron por triplicado y los datos obtenidos se analizaron por el método de Scatchard (1949).

Otras experiencias se determinaron en presencia de una concentración saturante de [<sup>125</sup>I]- IGF-I, 1.58 nM.

## **###-Estudios de unión del IGF-II a sus receptores en los tumores experimentales**

La base de la metodología es similar a la utilizada para IGF-I y EGF. En este caso los ensayos radioligando-receptor se realizaron en presencia de una concentración de [<sup>125</sup>I]-IGF-II constante (0.9 nM) y cantidades crecientes de IGF-II no marcado (0.01-10 nM) en un volumen final de 250 µl en *buffer* Tris 25 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, pH 7.4. La incubación se efectuó durante 12 horas a 4°C y la separación de la hormona unida de la libre se realizó por dilución y centrifugación. Las determinaciones se efectuaron, en cada tipo tumoral, por triplicado analizándose los datos de competencia de la unión del [<sup>125</sup>I]-IGF-II al IGF-R2 por el método de Scatchard (1949). Los datos se expresaron como la media ± desviación standard.

Algunas mediciones se realizaron en presencia de una concentración saturante de [<sup>125</sup>I]-IGF-II. Debido a la gran cantidad de sitios receptores IGF-R2, fue necesario modificar la Actividad específica de dicho ligando por el agregado de IGF-II no marcado a una concentración final de 20 nM.

## **#### Ensayos de especificidad de IGF-II e IGF-I a sus respectivos receptores**

Para los estudios de especificidad del IGF-R2 y del IGF-R1 se realizaron ensayos radioligando-receptor paralelos, semejantes a los descritos anteriormente. Concentraciones variables de IGF-II (0.01-100 nM), IGF-I (0.01-100 nM) e Insulina (0.1-80 nM) y fijas de [ $^{125}\text{I}$ ]-IGF-II o [ $^{125}\text{I}$ ]-IGF-I (0.6 nM) se incubaron con 40-60  $\mu\text{g}$  de proteínas de membrana de las distintas líneas tumorales estudiadas, en un volúmen final de 0.3 ml. Los ensayos se realizaron por triplicado y los datos obtenidos se graficaron como fracción de la unión específica máxima (B/Bo) (unión en presencia /ausencia de ligandos no marcados) vs la concentración nM de los distintos ligandos.

### **ii- Cuantificación del IGF-II por ensayos Radioligando-Receptor**

El IGF-II presente en las fracciones de las columnas de Bio-gel P-60 o en los extractos ácidos tumorales se cuantificó indirectamente por medio de un ensayo Radioligando-Receptor para IGF-II utilizando preparados microsomales de adenocarcinomas mamarios inducidos por MPA, debido a la gran cantidad de receptores tipo II que presentan y a la capacidad de los mismos a unir principalmente IGF-II antes que IGF-I. Los ensayos se realizaron en presencia de una concentración fija de [ $^{125}\text{I}$ ]-IGF-II (0.6 nM) y de proteína de membrana (40-60  $\mu\text{g}$ ) y cantidades variables de IGF-II standard (0.01-100 nM) o de muestras a analizar. La separación de la hormona libre de la unida se realizó por dilución y centrifugación. Los datos obtenidos se analizaron y se calcularon los ng de IGF-II/g tejido presentes en cada muestra analizada. El límite de detección de este ensayo fue de 0.2 ng.

### **iii-Ensayos de estabilización covalente de los complejos GF-receptor. Estudios con reactivos de entrecruzamiento**

#### **#-Caracterización de los receptores IGF-R1 e IGF-R2**

Para dicho ensayo se utilizaron preparados de membrana de los distintos tipos tumorales estudiados, obtenidos según las técnicas descritas anteriormente. Alícuotas de 500 µg de proteína de membrana se incubaron con [<sup>125</sup>I]-IGF-I (1.58 nM) o [<sup>125</sup>I]-IGF-II (2-3 nM) en presencia y ausencia de 500 ng (220 nM) de IGF-I o IGF-II en *buffer* Tris 25 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, pH 7.4 . La incubación se llevó a cabo durante 12 horas a 4°C luego de la cual las muestras se diluyeron con *buffer* PBS y se centrifugaron a 12000 g por 2 minutos. Los precipitados resultantes se resuspendieron en 195 µl del mismo *buffer* a los cuales se les adicionaron 5 µl de una solución de Disuccinimidil Suberato (DSS, Pierce) disueltos en dimetilsulfóxido (concentración final de DSS 0.2 mM). La reacción de entrecruzamiento se realizó durante 15 min a 0°C y se detuvo por dilución con *buffer* Tris 1M, EDTA 1 mM, pH 7.4. Luego de 5 minutos, la muestra se centrifugó a 12000 g por 2 minutos y el precipitado resultante se analizó por electroforesis en un gel de poliacrilamida 7.5 % con Dodecilsulfato de Sodio (SDS).

#### **##-Caracterización de receptores para TGF-β1**

La caracterización de receptores para TGF-β1 se llevó a cabo en cultivos primarios provenientes de los adenocarcinomas mamarios inducidos por MPA. En primer lugar las células (aproximadamente 200000 células/hoyo) fueron lavadas dos veces con una solución compuesta por Hepes 50 mM (pH 7.5), NaCl 128 mM, KCl 5 mM, CaCl<sub>2</sub> 1.2 mM y MgSO<sub>4</sub> 5 mM adicionado con BSA 5 mg/ml. La incubación se realizó por 4 horas a 4°C con agitación constante en presencia de [<sup>125</sup>I]-TGF-β1 (0.15 nM), en un volúmen final de 1.5 ml. La unión inespecífica se determinó por el agregado de un exceso de TGF-β1 no marcado (67 nM). Luego de la incubación, las células se lavaron 3 veces con la misma solución y se efectuó la reacción de entrecruzamiento por 15 minutos a 0°C con el agregado de DSS disuelto en DMSO a una concentración final de 0.2 mM. Transcurrido dicho tiempo, la reacción se detuvo por aspiración del medio y

lavado con un *buffer* compuesto por Tris 10 mM, Sacarosa 1 mM y EDTA 1 mM, pH 7.4, con inhibidores de proteólisis. Las células se despegaron y se lisaron por incubación a 4°C por 40 minutos con un *buffer* Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7.4 con Triton X-100 1%. La mezcla de lisis se centrifugó y el sobrenadante (40 ul) se analizó por electroforesis en geles de poliacrilamida 5.5 % con SDS.

### ###-Electroforesis y autoradiografía

Las muestras tratadas para la caracterización de los receptores para TGF- $\beta$ , se diluyeron al medio por el agregado de 40 ul de *buffer* Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 6.8 con glicerol 20%, SDS 4% y  $\beta$ -mercaptoetanol 5%, mientras que las del estudio de IGF-R1 e IGF-R2 se disolvieron con 70  $\mu$ l de la misma solución diluída al medio. Ambas se calentaron a 100°C durante 3 minutos y luego se centrifugaron a 12000 g por 5 minutos, con el fin de eliminar el material insoluble. El sobrenadante resultante, previa adición de Azul de Bromofenol (concentración final 0.005%), se sembró en un gel de poliacrilamida al 7.5% (para IGF-R1 e IGF-R2) o 5.5% (para TGF- $\beta$ -R) con SDS (SDS-PAGE). La electroforesis se realizó utilizando el sistema discontinuo de Laemmli (1970). Los marcadores de PM utilizados fueron: Miosina (cadena H), PM 200,000; Fosforilasa B, PM 97,400; Albúmina sérica bovina, PM 68,000; Ovoalbúmina, PM 43,000; Quimiotripsinógeno, PM 25,700;  $\beta$ -lactoglobulina, PM 18,400; Lisozima, PM 14,300 (Bethesda Research Laboratories).

Luego de la electroforesis, los geles fueron fijados y las proteínas teñidas con Coomassie Blue R250 (Bio-Rad) al 0.1% en metanol 40% y ácido acético 10%. La decoloración se llevó a cabo en primer lugar con una solución compuesta por metanol 50% y ácido acético 10% pasando posteriormente a una de metanol 5% y ácido acético 7%. El secado de los geles se realizó por 2 horas a 80°C y la exposición de los mismos se efectuó a -70°C por el tiempo indicado en cada experiencia, utilizando películas Kodak XAR-5 y pantallas amplificadoras Dupont.

## **E) Ensayos de Autoradiografía *in vitro***

### **i-Preparación del tejido**

El tumor extirpado del animal se congeló inmediatamente sobre hielo seco y se cortó en un crióstato en secciones de 16  $\mu\text{m}$  de espesor, las cuales se montaron sobre portaobjetos pretratados con gelatina. Las muestras obtenidas se secaron en un desecador al vacío a 4 °C por 12 horas luego de la cual se guardaron a -70°C hasta su uso posterior.

### **ii-Condiciones del ensayo**

#### **#-Localización, cuantificación y caracterización de receptores para Angiotensina II (receptores tipo 1 o AT1, y tipo 2 o AT2)**

La preincubación se realizó por 15 minutos a 22°C en *buffer* fosfato, pH 7.4, conteniendo NaCl 120 mM, EDTA 5mM, Bacitracina 0.005 % y BSA 0.2%, seguida por una incubación de 2 horas a la misma temperatura con una solución conteniendo [ $^{125}\text{I}$ ]-Sar<sup>1</sup>-AngII, 0.5 nM (Peninsula, Belmont, CA iodinado por New England Nuclear, Wilmington, DE; Actividad específica 2200 Ci/mmol) en el mismo *buffer*. Secciones consecutivas se incubaron de la misma manera pero en presencia de un antagonista selectivo de los receptores AT1, Losartán 10  $\mu\text{M}$  (DuP 753, Dupont) con el fin de determinar el número de receptores AT2 o de los receptores AT2, PD 123177 10  $\mu\text{M}$  {ácido, 1-(4-amino-3-metilfenil)metil-5-difenil-acetil-4,5,6,7-tetrahidro-1H-imidazo[4,5-c]piridina-6-carboxílico-2HCl, Parke-davis, Ann Arbor,MI} con el fin de determinar el número de receptores AT1. La unión inespecífica se determinó en secciones consecutivas en presencia de Ang-II no marcada a una concentración 5  $\mu\text{M}$ . Luego de la incubación, las secciones se lavaron 4 veces, por 1 minuto, con *buffer* Tris-HCl 50 mM, pH 7.6, seguidas por un lavado de 30 minutos con agua destilada a 0°C.



## **##-Localización y cuantificación de la Enzima Convertidora de Angiotensina (ACE)**

La preincubación se realizó por 30 min a 22 °C en *buffer* Tris-HCl 50 mM, pH 7.4 conteniendo NaCl 100 mM seguida por una incubación de 2 horas a temperatura ambiente en la misma solución conteniendo un inhibidor específico de dicha enzima marcado como ligando, [<sup>125</sup>I]-351A 2 nM (Actividad específica 2200 Ci/mmol, New England Nuclear). Las secciones consecutivas utilizadas para la determinación de la unión inespecífica se preincubaron en la misma solución conteniendo MK-521, 0.1 μM mientras que en la incubación se utilizó un exceso de 2 μM del mismo compuesto. Transcurrido el tiempo de incubación, todas las secciones se lavaron 4 veces por 1 minuto, a 4°C, en *buffer* Tris-HCl 50 mM, pH 7.4, seguidas por un lavado por 30 segundos en agua destilada.

### **iii- Autoradiografía**

Luego de los lavados, en todos los casos las secciones se secaron bajo una corriente de aire frío y posteriormente se expusieron junto con secciones de 16 μm de standards de radioactividad <sup>125</sup>I para autoradiografía (Amersham), por 3-7 días utilizando placas Hyperfilm-<sup>3</sup>H (Amersham). Luego de dicho tiempo, las placas se revelaron y los autoradiogramas se analizaron por microdensitometría computarizada utilizando un sistema RAS-R1000 Research Analysis System (Loats Associates, Inc., Westminster, MD).

## **6- Estudios de la expresión del ARNm para los distintos Factores de Crecimiento y Transformación**

### **A) Extracción de ARN total**

Se utilizó el método de Chomczynski y Sacchi (1987), adaptado tanto para el uso de tejidos tumorales provenientes de adenocarcinomas mamarios inducidos por MPA y de tejidos normales de roedores, como también para obtención de

ARN total de distintos cultivos celulares utilizados como controles positivos en los respectivos ensayos.

En todos los casos con el fin de evitar la degradación de la muestra de ARN por la presencia de ribonucleasas (RNAsas) fue necesario mantenerlas continuamente en hielo durante la extracción, usar guantes y utilizar reactivos y elementos en general, libres de RNAsas.

#### **i- Obtención de ARN total de tejidos**

Una vez que el tejido se ha extraído del animal, este deberá ser congelado y guardado inmediatamente a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso posterior. El mismo se homogeneizó en relación 1:10 (p/vol) con una solución D compuesta por Isotiocianato de Guanidinio 4M, Citrato de sodio 25 mM (pH 7.0),  $\beta$ -mercaptoetanol 100 mM y Laurilsarcosina 0.5%, posteriormente adicionando Acetato de sodio 2M (en relación 0.1 ml/ ml solución D), Fenol saturado con agua (1 vol/1 vol de solución D) y Cloroformo (0.2 ml/ml solución D). Luego de cada agregado se procedió a mezclar por inversión y la solución total se dejó reposar en hielo por 15 minutos centrifugándola luego a 10000 g , 20 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . El sobrenadante resultante se extrajo nuevamente con Fenol/Cloroformo y el ARN existente en el mismo se precipitó por el agregado de 2 vol de etanol absoluto (1 hora,  $-20^{\circ}\text{C}$ ). El precipitado de ARN obtenido nuevamente se disolvió en la solución D y se precipitó. Este último *pellet* se solubilizó en 100-500  $\mu\text{l}$  de agua desionizada tratada con dietilpirocarbonato (DEPC) y autoclavada. La cuantificación del ARN se realizó espectrofotométricamente por absorbancia a 260 nm.y su integridad se evaluó en un minigel de agarosa al 1% con 2.2M de formaldehído.

#### **ii- Obtención de ARN de cultivos celulares**

Luego de aspirar el medio de cultivo, las monocapas celulares ( $15\text{-}20 \times 10^6$  células/frasco), mantenidas sobre hielo, se lavaron 2 veces con *buffer* PBS esteril a  $4^{\circ}\text{C}$  (25 ml/ frasco) y se resuspendieron en solución D, en relación 0.1 ml/ $10^6$  células. El lisado celular total se trató de la misma forma que la detallada en el

punto i) de esta sección, adicionando las soluciones de Acetato de sodio, Fenol y Cloroformo en las relaciones nombradas.

## **B) Linealización de ADN plasmídico**

En todos los casos el ADN plasmídico se trató con las distintas enzimas de restricción en relación 10 U de enzima/ $\mu$ g ADN utilizado, en un volumen final de 0.2 ml. La reacción se llevó a cabo por 2 horas a 37°C y se detuvo por enfriamiento a 0°C, analizándose los productos de la misma en un minigel de agarosa al 1% junto a marcadores de ADN de distintos tamaños.

## **C) Características de las sondas utilizadas**

### **i- Sonda de IGF-I**

Fue cedida por el Dr Peter Rotwein ( Washington University School of Medicine, St Louis). El fragmento (BamH1-Eco R1) del ADNc del IGF-I murino clonado en el plásmido pGem4 (Promega) se linealizó con BamH1 dando un templado adecuado para la obtención de una ribosonda con la secuencia de la cadena antisentido de dicho fragmento, de aproximadamente 870 bases por transcripción mediada por el promotor de la T7 ARN polimerasa. El fragmento protegido a la digestión por RNAsa A, luego de incubarla con las distintas muestras de ARN murino, era de 185 bases.

### **ii- Sonda de IGF-II**

Fue cedida por el Dr Peter Rotwein ( Washington University School of Medicine, St Louis). El fragmento BamH1-Pst1 del ADNc del IGF-II murino clonado en el plásmido Bluescript II (Stratagene) se linealizó con BamH1 dando un templado para la obtención de una ribosonda con la secuencia antisentido de dicho fragmento de 720 bases por transcripción mediada por el promotor para la T3 ARN polimerasa. El fragmento protegido a la digestión por RNAsa A, luego de incubarla con las distintas muestras de ARN murino, era de 152 bases.

### **iii-Sonda de TGF- $\beta$ 1**

El fragmento BamHI-BamHI del TGF- $\beta$ 1 humano de 277 pares de bases clonado en el plásmido pGEM4 (Promega), fue linealizado con Hind III y transcrito bajo dirección del promotor de la SP6 ARN polimerasa por incorporación de [ $^{32}$ P]-rUTP (Amersham, SA, 3000 Ci/mmol).

### **iv-Sonda de TGF- $\alpha$**

El fragmento SPh I-Apa I del TGF- $\alpha$  humano de 152 pares de bases inserto en el plásmido pGEM7zf, fue linealizado con EcoRI y transcrito bajo el promotor de la T7 ARN polimerasa.

Se utilizó también una sonda de ADNc de TGF- $\alpha$  marcada con [ $^{32}$ P]-dCTP (Amersham, SA, 3000 Ci/mmol), por el método de Random Primed (Boehringer Mannheim Kit).

### **v-Sondas de genes constitutivos**

#### **#-Gen GAPDH**

El fragmento Hind III-Hind III de 104 pares de bases del gen GAPDH humano, inserto en el plásmido pGEM7zf+, fue linealizado con Bam HI y transcrito bajo el promotor de la T7 ARN polimerasa.

#### **##-Gen HumRPL32**

Fue cedida por el Dr Rosemary Rochefort (The Scripps Research Institute). El fragmento EcoR1-HindIII del ADNc de la proteína ribosomal humana RPL32, clonada en el plásmido pGem 4 (Promega) se linealizó con EcoR1 dando el templado adecuado para la obtención de una ribosonda con la secuencia antisentido de dicho fragmento de 92 bases, por transcripción mediada por el promotor para la T7 ARN polimerasa. Por comparación de las secuencias de este ADNc humano con el correspondiente RPL32 ADNc murino se verificó un gran porcentaje de homología entre ambos, encontrándose solamente una modificación de 6 pb. Estas pequeñas variaciones permitieron que dicha secuencia humana pueda ser utilizada como señal constitutiva en los ensayos de Protección a la

digestión por Ribonucleasa A con muestras murinas, conduciendo a la aparición de un fragmento protegido de 76 bases.

#### **D) Ensayos de Protección a digestión por RNasa A**

Las muestras conteniendo de 30 a 60 µg de ARN total provenientes de tumores sólidos o cultivos celulares, se hibridaron durante 16 horas a 50°C con  $2 \times 10^5$  cpm de cada ribosondas marcadas con [ $^{32}\text{P}$ ]-rUTP (Amersham, SA, 3000 Ci/mmol), según el protocolo de Promega, detallado anteriormente, en 30 µl de una solución compuesta por 80% formamida, 40 mM piperazine-N,N'bis(2-ethanesulfonic acid), EDTA 0.1 M y NaCl 4M. Posteriormente se las incubó con 40 µg/ml de RNasa A, durante 30 min a 25°C y la digestión se detuvo con proteinasa K y SDS. Las muestras se extrajeron con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (20:20:1) y se precipitaron con 2 volúmenes de etanol por 30 min a -70°C. Los precipitados resultantes se resuspendieron en 5 µl de un *buffer* con 80% de formamida y se resolvieron en un gel de secuenciación de poliacrilamida al 6% con urea 8 M. Los marcadores de peso molecular se prepararon por marcación terminal de fragmentos del plásmido PFH3 digeridos con Hinf I (*Gutman y col.*, 1986)

En el caso del estudio de la expresión de IGF-I e IGF-II, el control positivo utilizado fue ARN total de hígado de ratón BALB/c adulto y de recién nacido respectivamente, mientras que en ambos casos el control negativo consistió en 20 µg de ARNt.

#### **E) Ensayos de Northern Blot**

20 µg de ARN total se desnaturalizaron a 65°C en una solución conteniendo formamida 50% (v/v) y formaldehído 2.2 M y se corrieron en un gel de agarosa al 1% con formaldehído 2.2 M. El producto de dicha electroforesis fue transferido a membranas de Nylon (Nytran, Schleicher and Schuell, Keene, NH) y fijado a las mismas por irradiación con luz UV o por calentamiento de 2 horas a 80°C. Las hibridaciones con las distintas sondas radioactivas se realizó a 65°C durante 12 horas, con aproximadamente  $2 \times 10^6$  dpm/ml de una solución compuesta por

Formamida 50%, Fosfato de sodio 0.05 M, pH 6.5, NaCl 0.8 M, EDTA 0.01 M, Denhardtts 2.5 X, RNAt de levadura 340 ug/ml, SDS 0.2% y ADN de esperma de salmón desnaturalizado 100 ug/ml. Los lavados se efectuaron con una solución de SSC 0.1X y SDS 0.1% a 65°C en el caso de utilizar sondas de ADN (como la de TGF- $\alpha$ ) o a 75°C para las ribosondas. Las exposiciones de los *blots* se efectuaron a -70°C por tiempos variables, usando placas Kodak XAR5 (Eastman Kodak, Rochester NY) y pantallas amplificadoras Chronex quanta III (Dupont Wilmington, DE). Las intensidades de las bandas, de las correspondientes autoradiografías, se cuantificaron utilizando un densitómetro LKB Ultrosan XL.

## **7- Otros métodos**

### **A) Estudios histológicos**

Todas las muestras tumorales se fijaron en FAM (Formaldehido-Ácido Acético-Metanol) o en Alcohol Etílico 95% e incluídos en Parafina. Los cortes efectuados de 5 $\mu$ m se colorearon con Hematoxilina-Eosina.

En el caso de los estudios de Autoradiografía *in vitro* los cortes tisulares de 16  $\mu$ m se colorearon con la misma técnica.

### **B) Cuantificación de proteínas**

Se utilizó el método de Lowry y col. (1951), utilizando como patrón una solución de albúmina sérica bovina de 1 mg/ml. Las lecturas se efectuaron a 700 nm y a temperatura ambiente.

### **C) Análisis Estadístico**

Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  desviación standard. Para comparar las latencias de aparición, tamaños tumorales y niveles de receptores entre 2 muestras se utilizó el test "t" de Student. Para la comparación entre niveles de GFs o sus receptores entre las distintas líneas tumorales se utilizó el test de Tukey.

Correlaciones entre histología, hormono-dependencia y número de receptores mediante el test de Fisher.

Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas con un  $p < 0.05$ .

## ***RESULTADOS***



Los resultados siguientes, se obtuvieron en distintas líneas tumorales ductales HD (líneas 1HD, 5HD, 9HD; provenientes de animales con o sin tratamiento con MPA) y HI (líneas 1HI, 5HI, 9HI) y en ciertos casos se incluyeron adenocarcinomas mamarios autónomos con histología lobulillar.

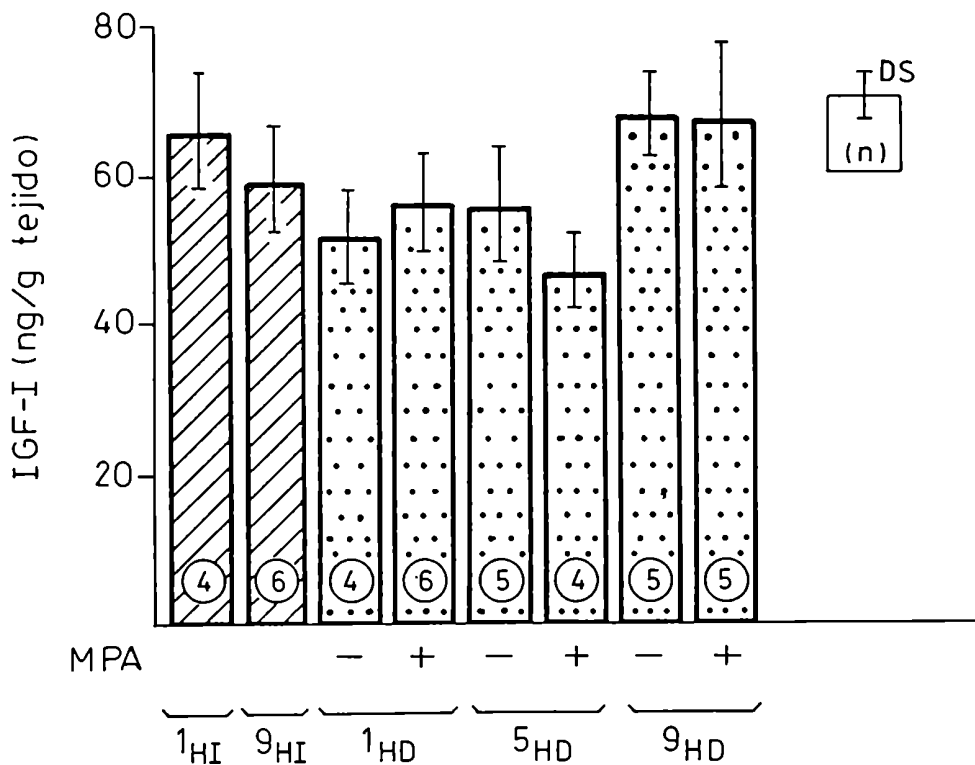
**\*Estudio de la presencia de factores de crecimiento semejantes a la insulina (IGF-I e IGF-II) y sus receptores en los adenocarcinomas de mama inducidos por MPA**

**IGF-I**

**-Cuantificación de IGF-I**

El IGF-I se cuantificó en extractos ácidos obtenidos de muestras individuales de 3 líneas tumorales hormono-dependientes (HD) de animales tratados y no-tratados con MPA y 2 líneas hormono-independientes (HI), todas con histología ductal.

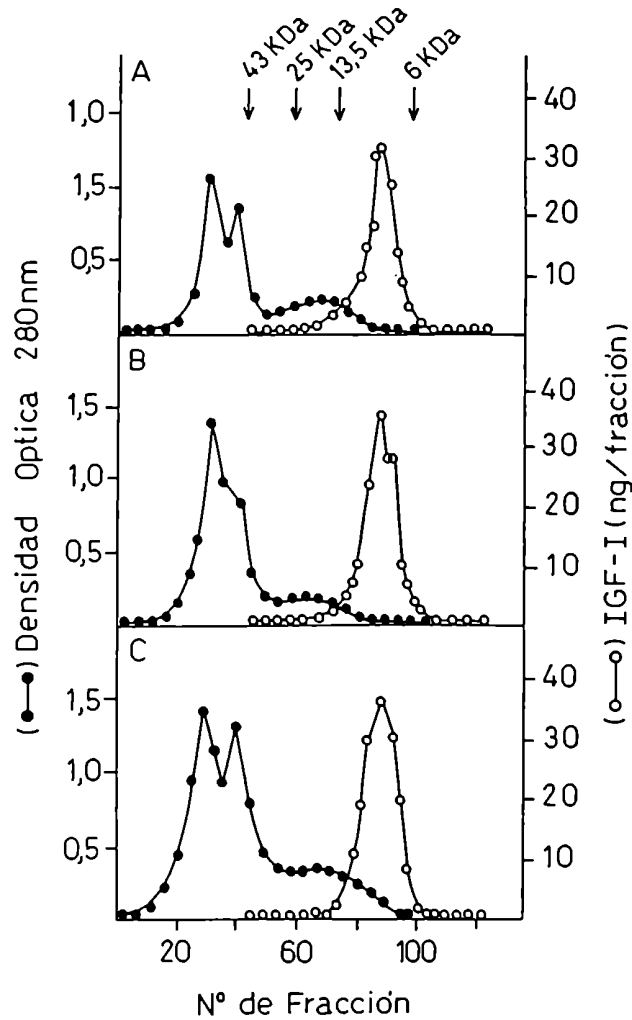
Los datos obtenidos se presentan en la figura 4. Como puede observarse, los niveles tumorales de IGF-I, no se modificaron por el tratamiento con MPA de los ratones portadores de adenocarcinomas HD. Por otro lado, tampoco se observó ninguna diferencia significativa en los valores encontrados para este GF entre las líneas HD y las HI.



**Figura 4 : Contenido de IGF-I en los extractos ácidos de los adenocarcinomas mamarios inducidos por MPA.** En los extractos ácidos de cada muestra tumoral HI y HD se midió el contenido de IGF-I por radioinmunoanálisis. Los datos representan media  $\pm$  desviación standard. n: número de determinaciones individuales.

#### **-Purificación por cromatografía en Bio-gel P-60**

Se cromatografiaron 100 mg de proteínas de los extractos ácidos de las líneas 1HD, 1HD+MPA y 1 HI, por columnas de Bio-gel P-60 y se cuantificó el IGF-I en alícuotas de las fracciones obtenidas. En la figura 5 se observa que el IGF-I eluyó en el rango de PM correspondiente al péptido maduro.

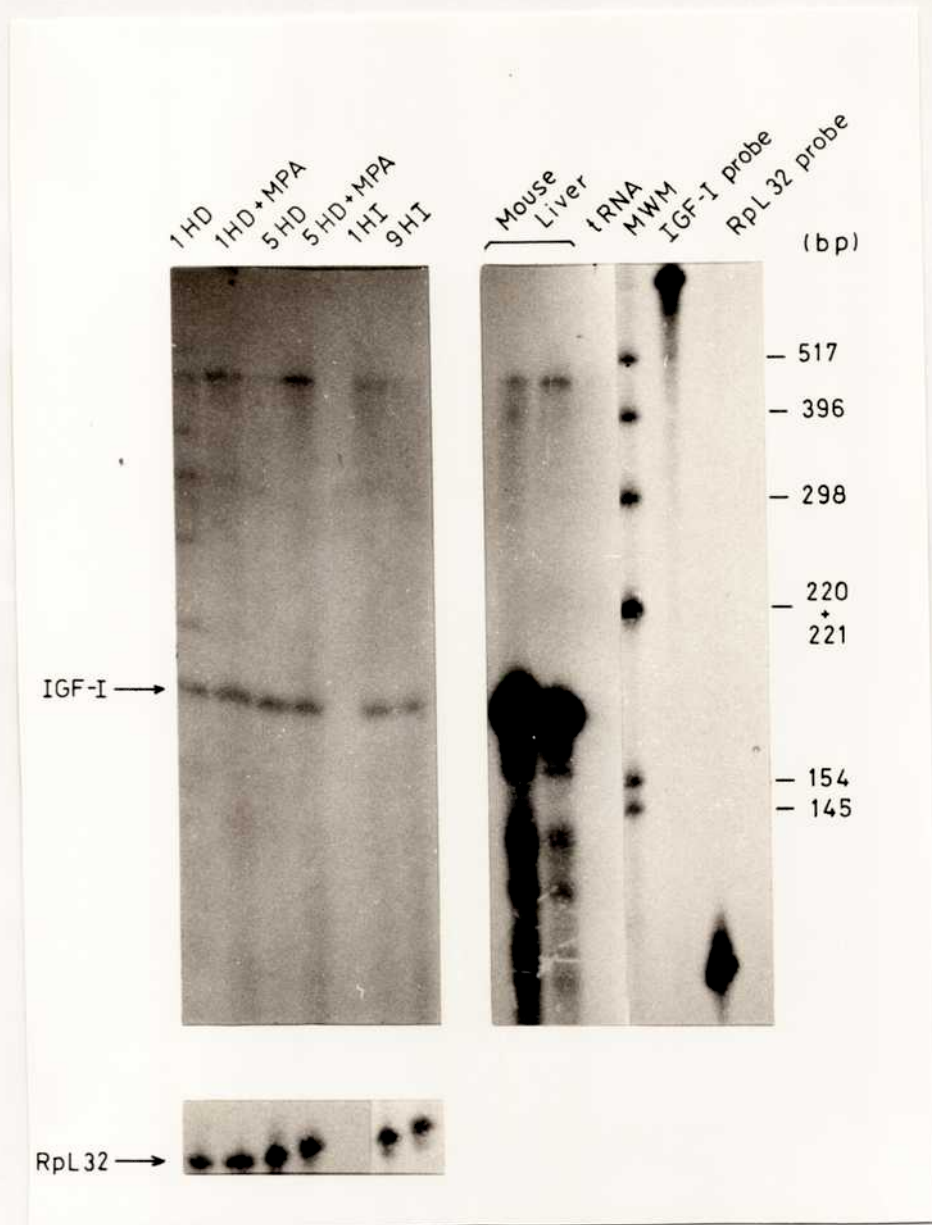


**Figura 5 : Caracterización del IGF-I presente en los extractos ácidos tumorales.** Las fracciones impares colectadas de las columnas de Bio-gel P-60 liofilizas y disueltas en ClH 4 mM, se neutralizaron posteriormente con *buffer* fosfato. Alícuotas de cada una se utilizaron en un RIA específico para IGF-I. Los marcadores de PM utilizados fueron: Ovoalbúmina (43 KDa), Quimotripsinógeno (25 KDa), Ribonucleasa A (13.5 KDa) e Insulina (6 KDa). A: 1HD, B: 1HD+MPA, C: 1HI.

## **-Expresión de IGF-I ARNm**

Los ensayos de Protección a la Ribonucleasa A (RNAsa A), se realizaron con el fin de dilucidar una posible regulación por MPA en los niveles del IGF-I ARNm. El hecho de utilizar este ensayo frente a uno de Northern Blot se debió a que el primero es 100 veces mas sensible que el segundo, ya que se requiere un 100% de homología entre la sonda radioactiva utilizada y el transcripto presente en la muestra de ARN a analizar.

Los resultados obtenidos con el estudio de 2 líneas HD y 2 líneas HI se presentan en la figura 6. Como puede observarse, todos los tumores ensayados ya sean HD (provenientes de ratones tratados y no tratados con MPA) o HI expresaron niveles similares de ARNm para IGF-I, no encontrándose regulación de los mismos por MPA.



**Figura 6 : Estudio de la expresión del IGF-I ARNm en los adenocarcinomas mamarios inducidos por MPA:** Una muestra de ARN total (60  $\mu$ g) de cada línea tumoral se hibridizó durante 12 horas a 50°C con dos ribosondas conteniendo las secuencias *antisense* del IGF-I murino (182 bp) o del fragmento EcoR1-Hind III del gen constitutivo RPL32 humano (76 bp). La figura muestra los fragmentos protegidos luego de la digestión por RNasa A. Como control positivo y negativo se utilizaron 50  $\mu$ g de ARN total de hígado murino (Mouse liver) y 20  $\mu$ g de ARN de transferencia de levadura (tRNA) respectivamente. Los marcadores utilizados (MWM) se prepararon por marcación terminal de los fragmentos del plásmido PFH3 digeridos con Hinf I. IGF-I probe y RPL32 probe representan las dos ribosondas empleadas en el ensayo.

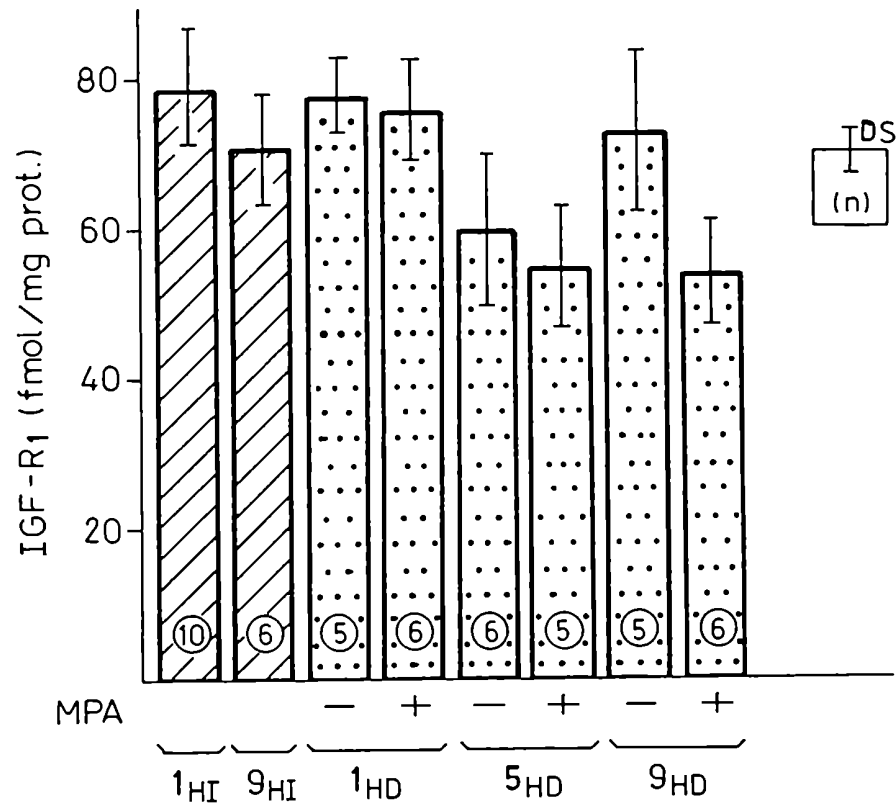
## **-Cuantificación de receptores IGF-R1**

Debido a que los adenocarcinomas mamarios de nuestro modelo experimental producían IGF-I de forma no regulada por MPA a nivel transcripcional ni traduccional, decidimos estudiar la presencia de receptores para este GF y dilucidar su posible regulación por el progestágeno.

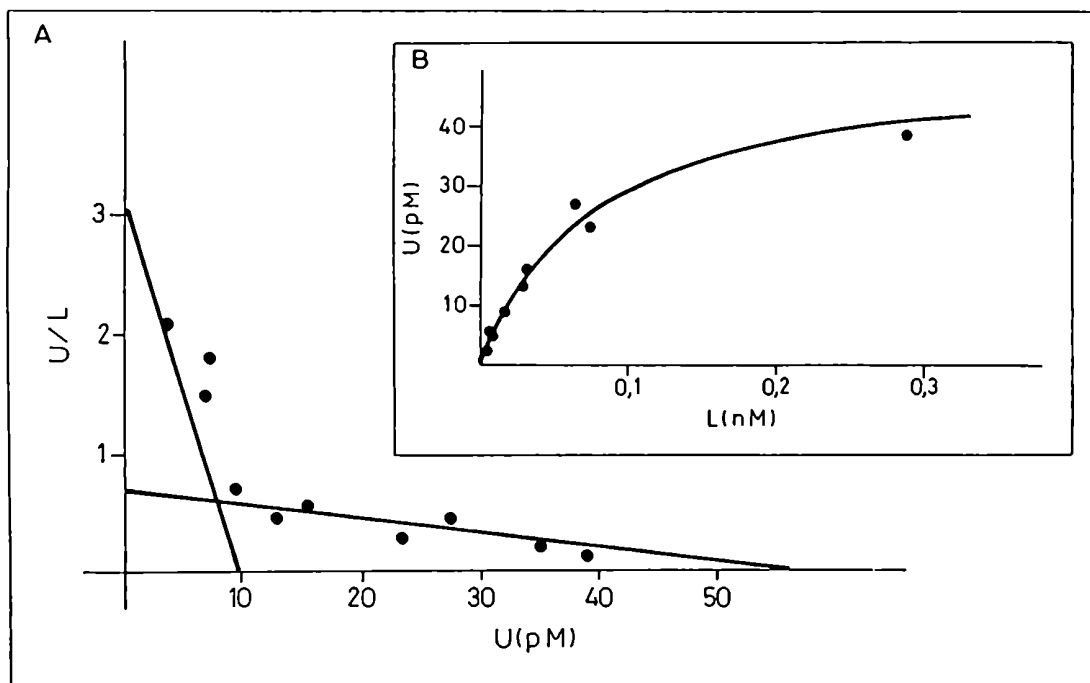
Se desarrolló una metodología apropiada con el fin de obtener preparados de membranas carentes de proteínas transportadoras de IGFs, las cuales interferirían en los ensayos efectuados, conduciendo a la aparición de falsos positivos. La técnica utilizada presenta un procesamiento adicional con *buffer* Gly-NaCl a pH ácido que produce la disociación de todo factor endógeno de los posibles sitios receptores. De esta forma se cuenta con un material adecuado, para la determinación del número de receptores y la afinidad de los mismos.

Tal como se observa en la figura 7, tanto en las líneas tumorales HD como las HI se demostró la presencia de sitios IGF-R1, cuyos niveles no estaban modulados por MPA.

Para el estudio de la afinidad de los sitios IGF-R1, se realizaron los ensayos radioligando-receptor con membranas provenientes de un *pool* de fracciones microsomales de tumores 1HD+MPA y 1HI. El análisis de los datos por el método de *Scatchard* (figura 8) demostró la existencia de dos poblaciones diferentes de sitios de unión para [<sup>125</sup>I]-IGF-I. El sitio de mayor afinidad presentó una Kd de  $3.4 \times 10^{-12}$  M y una capacidad de 14 fmol/mg de proteína, mientras que el segundo sitio se caracterizó por tener una menor afinidad (Kd:  $1.3 \times 10^{-10}$  M) y una mayor capacidad (Q: 79.33 fmol/mg de proteína).



**Figura 7 : Cuantificación de IGF-R1 en los adenocarcinomas mamarios inducidos por MPA.** En preparados de microsomales de cada muestra tumoral se midió el contenido de IGF-R1 por medio de un ensayo radioligando-receptor, en condiciones de saturación. Los datos obtenidos expresados en fmoles/mg proteínas, representan media  $\pm$  desviación standard. n: número de determinaciones individuales obtenidos por triplicados de cada una.

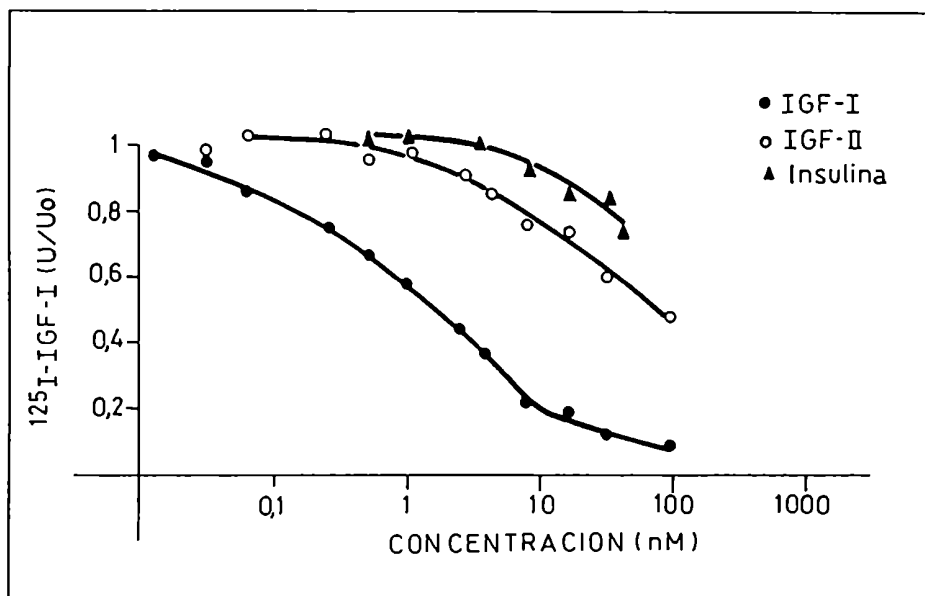


**Figura 8 : Unión de  $[^{125}\text{I}]\text{-IGF-I}$  a membranas de los adenocarcinomas mamarios inducidos por MPA: (A) Gráfico de *Scatchard*, (B) Curva de saturación. Alícuotas de un *pool* de membranas provenientes de los adenocarcinomas mamarios 1HI y 1HD+MPA, se incubaron con concentraciones crecientes de  $[^{125}\text{I}]\text{-IGF-I}$ , determinándose la unión inespecífica en presencia de IGF-I no marcado. La figura demuestra los resultados de un experimento representativo.**



## -Estudios de Competencia de la unión de [ $^{125}$ I]-IGF-I al receptor IGF-R1

Para dilucidar el grado de especificidad de la interacción del IGF-I a su receptor, se realizaron ensayos radioligando-receptor con alícuotas provenientes de un *pool* de preparados de membranas de los adenocarcinomas mamarios 1HD, 1HI y 1 HD+MPA, en presencia de una concentración fija de [ $^{125}$ I]-IGF-I y cantidades variables de IGF-I, IGF-II e Insulina. La figura 9 muestra la unión específica del IGF-I al IGF-R1, obteniéndose un 50% de desplazamiento de la unión máxima con una concentración 1.25 nM de este GF y 71 nM de IGF-II. La Insulina a concentraciones de 40 nM produjo solamente un 30 % de inhibición de la unión máxima.

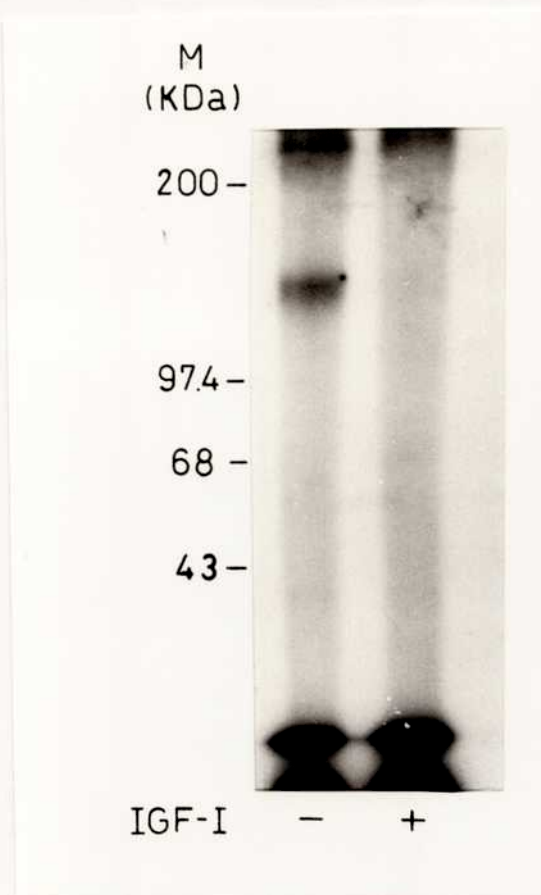


**Figura 9 :** Estudio de la especificidad de la unión del [ $^{125}$ I]-IGF-I al IGF-R1. La fracción U/Uo (unión de [ $^{125}$ I]-IGF-I en presencia de concentraciones nM variables de ligandos no radioactivos/ unión en ausencia de los mismos) corresponde al promedio de incubaciones realizadas por triplicado de un experimento representativo.

## **-Caracterización estructural de los receptores IGF-R1**

Luego de realizar los ensayos de unión del IGF-I a su receptor de membrana, se estudiaron las características estructurales del mismo. Para ello se llevaron a cabo ensayos de estabilización covalente de los complejos [<sup>125</sup>I]-IGF-I-Receptor, utilizando el reactivo de entrecruzamiento disuccinimidilsuberato (DSS). Previo tratamiento con β-mercaptoetanol los complejos GF-receptor se analizaron en un gel de poliacrilamida. El ensayo se efectuó con alícuotas de 500 μg de proteína de membrana perteneciente a un *pool* de fracciones microsomales de la líneas tumorales 1HD, 1HD+MPA y 1HI.

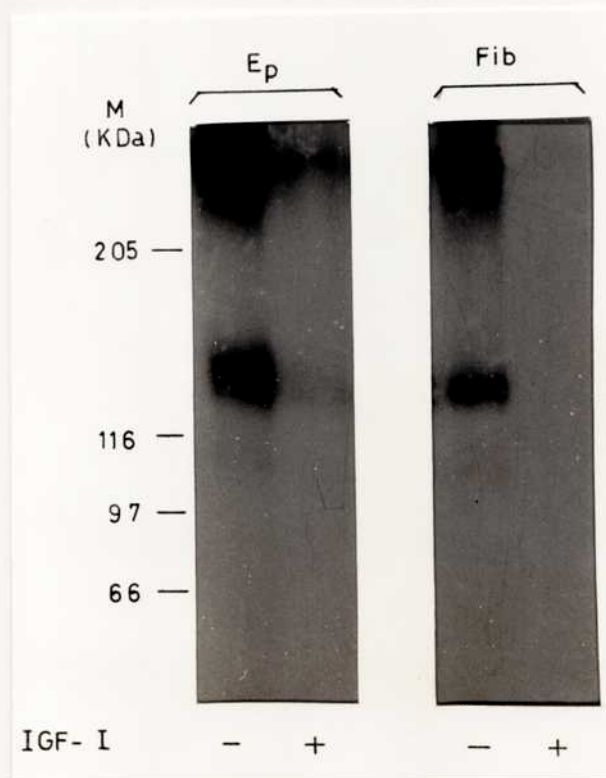
Los datos obtenidos se muestran en la figura 10, en la que se presenta la autoradiografía obtenida. Se observaron dos bandas específicas de gran intensidad. Una con un PM de aproximadamente 135 KDa, correspondiente a la subunidad α del IGF-R1 y la segunda, de menor intensidad, con un PM mayor a 240 KDa.



**Figura 10 :** Estabilización covalente de los complejos  $[^{125}\text{I}]\text{-IGF-I-Receptor}$  utilizando preparados de membranas de los adenocarcinomas mamarios inducidos por MPA. Autoradiografía del gel fijado y secado obtenido luego de 14 días de exposición. 500  $\mu\text{g}$  de proteínas de membranas de los adenocarcinomas estudiados se incubaron con  $[^{125}\text{I}]\text{-IGF-I}$  durante 16 horas a  $4^\circ\text{C}$  y luego se realizó la reacción de entrecruzamiento con DSS por 15' a  $0^\circ\text{C}$ . El producto resultante se disolvió en un *buffer* con  $\beta$ -mercaptoetanol y se analizó en un gel de poliacrilamida al 7.5% con SDS. Los carriles + y - representan incubaciones paralelas en presencia y ausencia de un exceso de IGF-I no marcado. M representa los marcadores de PM utilizados en KDa.

## -Localización tisular de IGF-R1

Teniendo en cuenta la presencia de IGF-R1 y la producción de IGF-I en los adenocarcinomas mamarios inducidos por MPA, se decidió estudiar la posible localización tisular de estos sitios receptores. Para ello se realizaron ensayos de estabilización covalente de los complejos IGF-I-receptor en cultivos primarios de células epiteliales y de fibroblastos del tumor 5 HD. Como puede observarse en la figura 11, se comprobó la presencia de los sitios IGF-R1 tanto en los cultivos de células epiteliales malignas como en los de fibroblastos.



**Figura 11** : Estabilización covalente de los complejos [ $^{125}\text{I}$ ]-IGF-I-Receptor utilizando cultivos primarios de células epiteliales (Ep) o de fibroblastos (Fib) del tumor 5HD. Autoradiografía del gel fijado y secado. Los cultivos primarios se incubaron con [ $^{125}\text{I}$ ]-IGF-I durante 4 horas a  $4^{\circ}\text{C}$  y luego se realizó la reacción de entrecruzamiento con DSS. Posteriormente las monocapas celulares se lavaron, se disolvieron en un *buffer* con Tritón X-100 y se analizaron en un gel de poliacrilamida al 5.5% con SDS. Los carriles - y + representan las incubaciones paralelas en ausencia y presencia de un exceso de IGF-I no marcado. M representa los marcadores de PM utilizados en KDa.

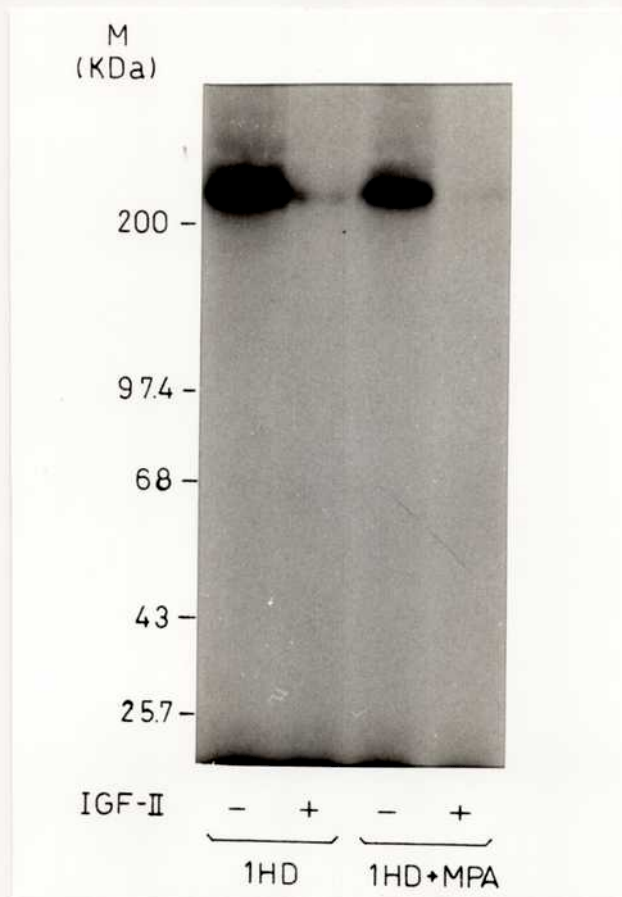
## **IGF-II**

### **Cuantificación y caracterización de receptores IGF-R2**

Todos los estudios de caracterización y cuantificación receptores para IGFs de tipo II, se realizaron en las fracciones microsomales lavadas de los distintos tipos tumorales, con el fin de eliminar toda posible interferencia por la presencia de proteínas transportadoras de IGFs.

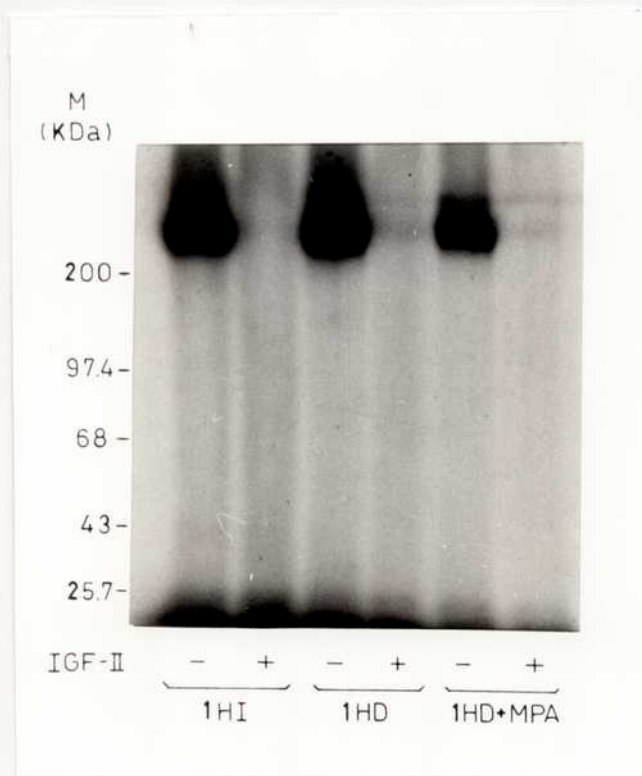
#### **-Caracterización estructural de los receptores IGF-R2**

Debido a que se contaba con la metodología necesaria para la caracterización de IGF-R1 se decidió aplicar la misma al estudio de receptores IGF-R2. Los primeros ensayos realizados fueron los de estabilización covalente de los complejos IGF-II-Receptor. Los mismos se efectuaron en presencia de 500  $\mu$ g de proteína de membrana de las líneas tumorales 1 HI, 1HD y 1 HD+MPA y [ $^{125}$ I]-IGF-II. Los ensayos se realizaron tanto en condiciones reductoras o sea en presencia de  $\beta$ -mercaptoetanol, como en no reductoras. En las figuras 12 y 13 se muestran las autorradiografías obtenidas. Se observó una banda específica de sitios IGF-R2 de 230 KDa (figura 12), que experimentaba una leve modificación a aproximadamente 260 KDa en condiciones reductoras (figura 13). Por otro lado, la elevada intensidad de las bandas, obtenida en tan poco tiempo de exposición, revelaba la gran abundancia de sitios IGF-R2.



**Figura 12 : Estabilización covalente de los complejos  $[^{125}\text{I}]$ -IGF-II-Receptor utilizando preparados de membranas de los adenocarcinomas mamarios inducidos por MPA.** Autoradiografía del gel fijado y secado. 500  $\mu\text{g}$  de proteínas de membranas de los adenocarcinomas estudiados se incubaron con  $[^{125}\text{I}]$ -IGF-II durante 16 horas a  $4^\circ\text{C}$  y luego se realizó la reacción de entrecruzamiento con DSS por 15' a  $0^\circ\text{C}$ . El producto resultante se analizó en un gel de poliacrilamida al 7.5% con SDS. Los carriles representados como + y - corresponden a incubaciones paralelas en presencia y ausencia de un exceso de IGF-II no marcado respectivamente. M representa los marcadores de PM utilizados en KDa.





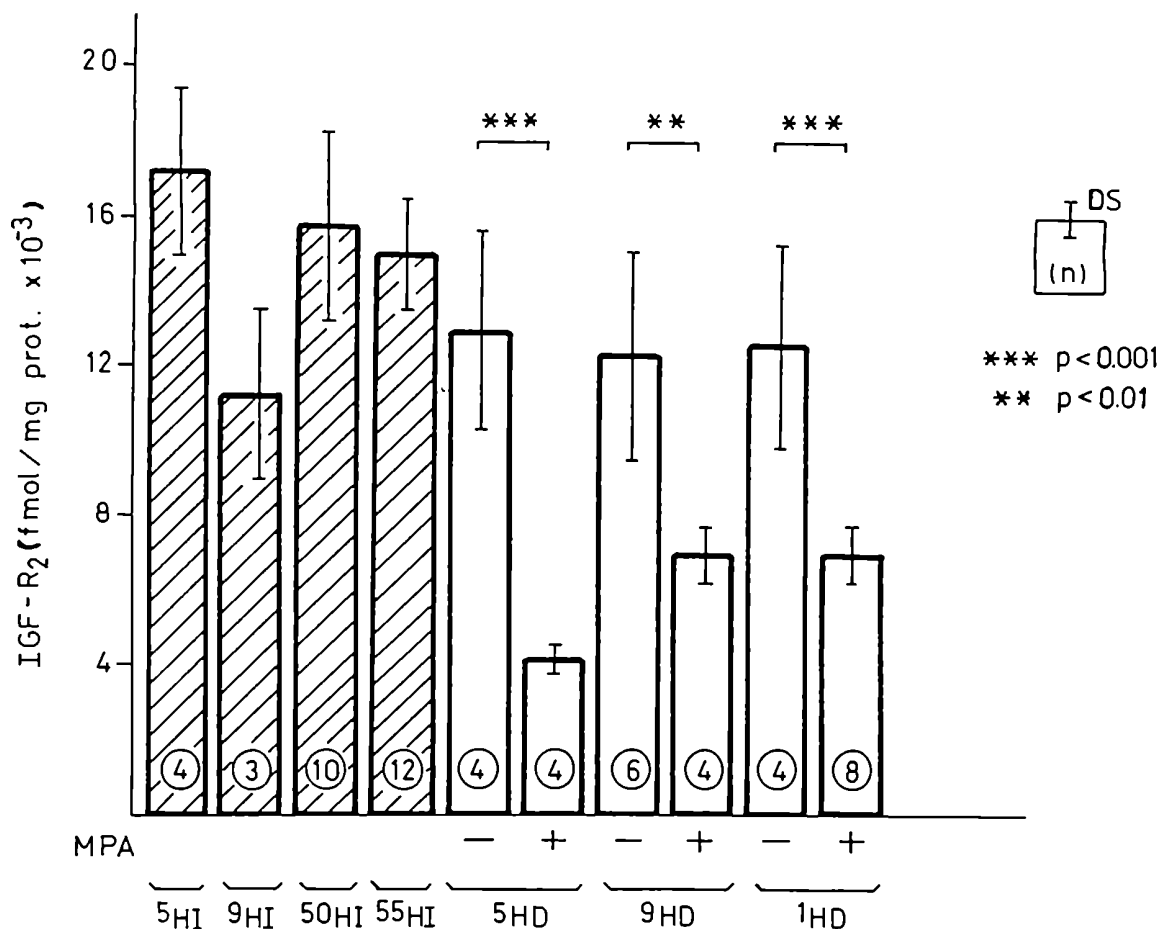
**Figura 13 : Estabilización covalente de los complejos  $[^{125}\text{I}]$ -IGF-II-Receptor utilizando preparados de membranas de los adenocarcinomas mamarios inducidos por MPA.** Autoradiografía del gel fijado y secado. 500  $\mu\text{g}$  de proteínas de membranas de los adenocarcinomas estudiados se incubaron con  $[^{125}\text{I}]$ -IGF-II durante 16 horas a  $4^\circ\text{C}$  y luego se realizó la reacción de entrecruzamiento con DSS por 15' a  $0^\circ\text{C}$ . El producto resultante se resuspendió en un *buffer* con  $\beta$ -mercaptoetanol y se analizó en un gel de poliacrilamida al 7.5% con SDS. Los carriles representados como + y - corresponden a incubaciones paralelas en presencia y ausencia de un exceso de IGF-II no marcado respectivamente. M representa los marcadores de PM utilizados en KDa.

## **-Cuantificación de receptores IGF-R2**

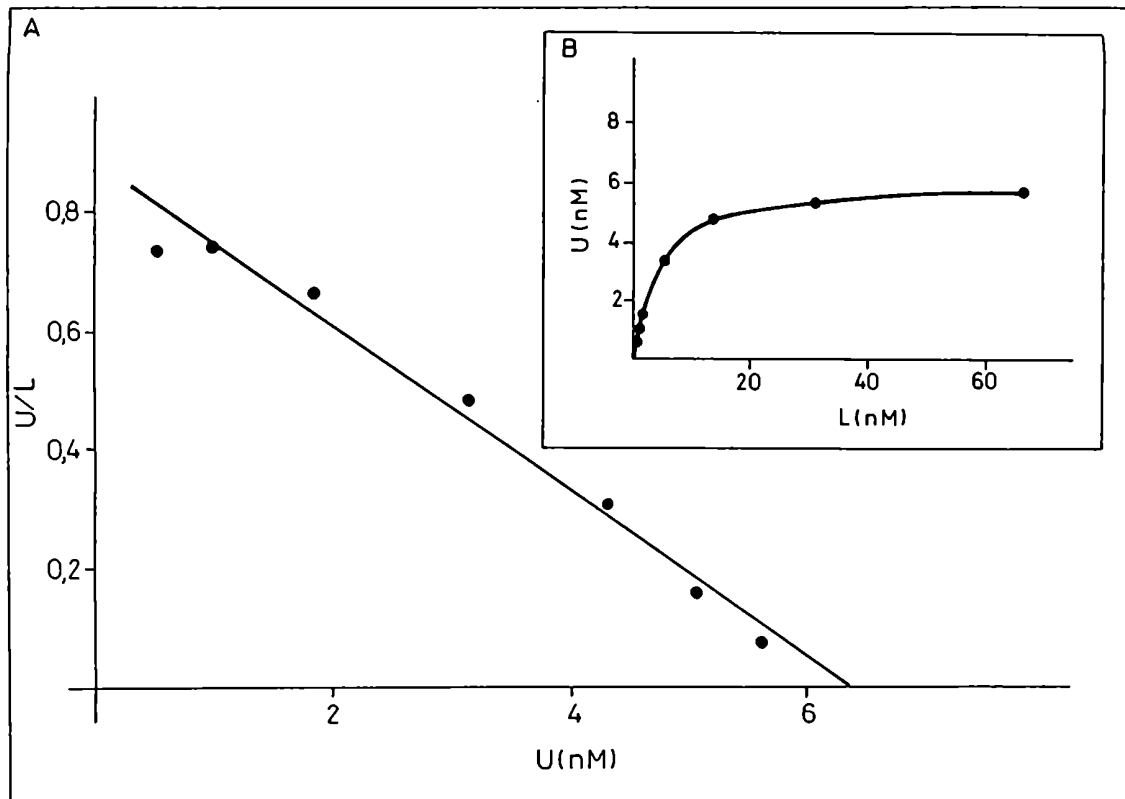
La cuantificación del número de sitios receptores IGF-R2, se efectuó por ensayos radioligando-receptor en presencia de alícuotas de preparados de membranas pertenecientes a las distintas líneas tumorales y de una concentración fija y saturante de [<sup>125</sup>I]-IGF-II. La unión inespecífica se determinó de la forma detallada en el punto anterior. Los valores obtenidos se presentan en la figura 14. Como era de esperar todos los adenocarcinomas estudiados ya fueran HD o HI, presentaban una unión específica apreciable de [<sup>125</sup>I]-IGF-II, destacándose niveles similares de IGF-R2 entre las líneas HD (provenientes de animales sin tratamiento hormonal) y HI (ya sean de histología ductal, líneas 5 y 9, como de histología lobulillar, líneas 50 y 55). Por otro lado se observó que el tratamiento con MPA de los ratones portadores de tumores HD producía una disminución significativa del número de sitios IGF-R2, ( $p < 0.01$ , Test de Tukey).

Con el fin de dilucidar si la modificación, mediada por MPA, del nivel de IGF-R2 en los adenocarcinomas mamarios HD se debía a una variación en la afinidad o en la capacidad de los mismos, se efectuaron ensayos radioligando-receptor en membranas de las líneas tumorales 5 HI, 5 HD y 5 HD+MPA. El análisis de los datos según el método de *Scatchard* mostró la existencia de un solo tipo de sitios de unión para IGF-II, con afinidades semejantes en las tres líneas tumorales estudiadas (5 HD,  $K_d: 7.14 \times 10^{-9} \text{ M}$ ; 5 HD+MPA,  $K_d: 10 \times 10^{-9} \text{ M}$ ; 5 HI,  $K_d: 4.35 \times 10^{-9} \text{ M}$ ). Estos datos revelaron que el efecto del MPA en los tumores HD producía una modificación apreciable en el número total de los sitios IGF-R2 (5 HD,  $Q: 6.38 \text{ nM}$ ; 5 HD+MPA,  $Q: 1.14 \text{ nM}$ ; 5 HI,  $Q: 8.35 \text{ nM}$ ) (figuras 15, 16, 17).



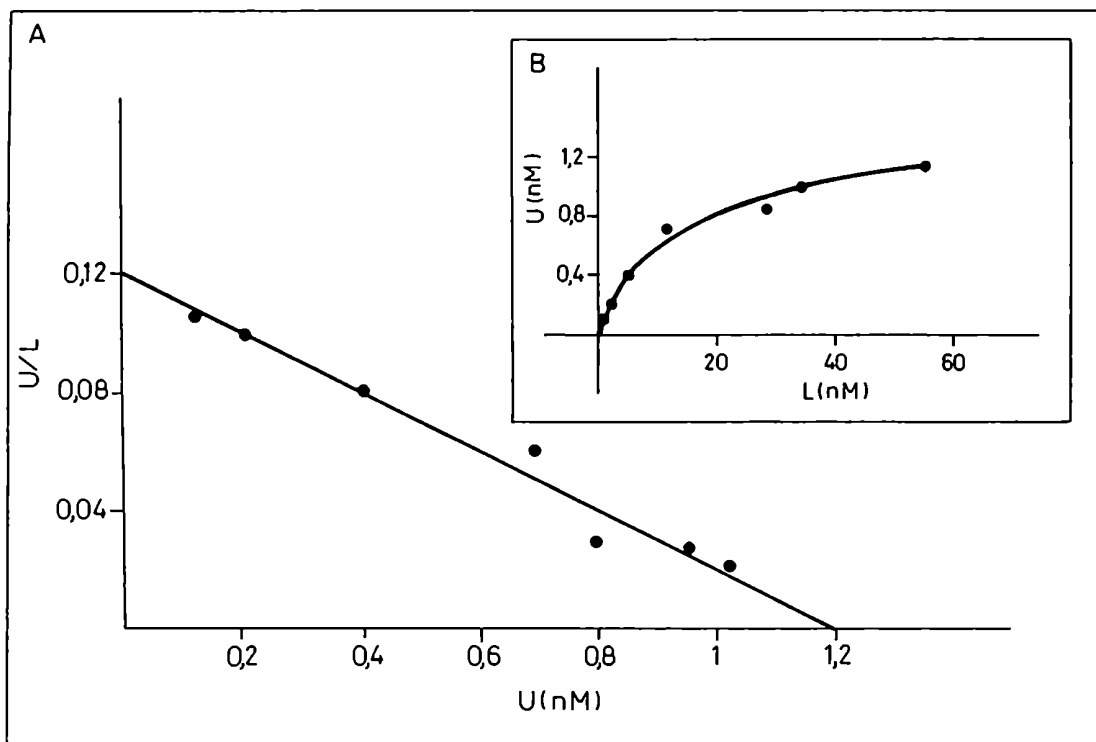


**Figura 14 : Cuantificación de IGF-R2 en los adenocarcinomas mamarios inducidos por MPA.** En preparados microsomales de cada muestra tumoral se midió el contenido de IGF-R2 por medio de un ensayo radioligando-receptor. Los datos expresados en fmol/mg proteínas, representan media  $\pm$  desviación standard. n: número de determinaciones individuales.  
\* tumores HI con histología lobulillar.



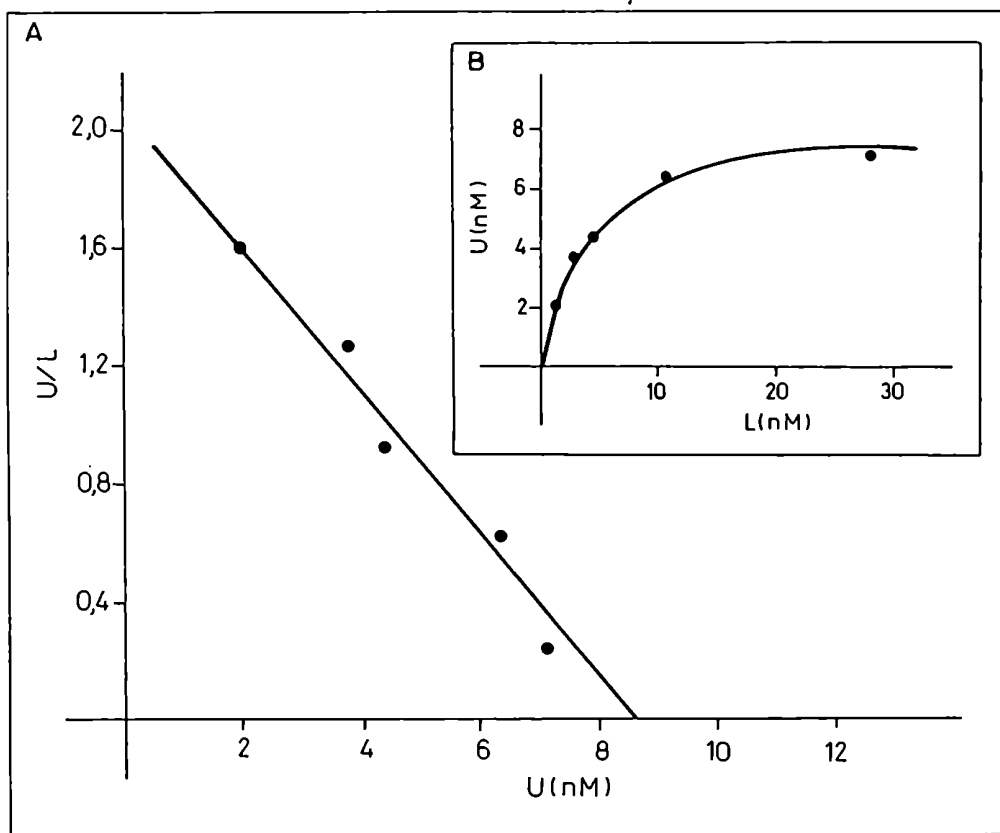
**Figura 15 :** Unión de  $[^{125}\text{I}]\text{-IGF-II}$  a membranas del adenocarcinoma mamario 5HD: (A) Gráfico de *Scatchard*, (B) Curva de saturación.

Una alícuota de proteínas de membranas del tumor 5HD se incubó con una cantidad fija de  $[^{125}\text{I}]\text{-IGF-II}$  y cantidades variables de IGF-II no marcado. La figura demuestra el resultado de un experimento representativo.



**Figura 16:** Unión de  $[^{125}\text{I}]\text{-IGF-II}$  a membranas del adenocarcinoma mamario 5HD+MPA: (A) Gráfico de *Scatchard*, (B) Curva de saturación.

Una alícuota de proteínas de membranas del tumor 5HD+MPA se incubó con una cantidad fija de  $[^{125}\text{I}]\text{-IGF-II}$  y cantidades variables de IGF-II no marcado. La figura demuestra el resultado de un experimento representativo.

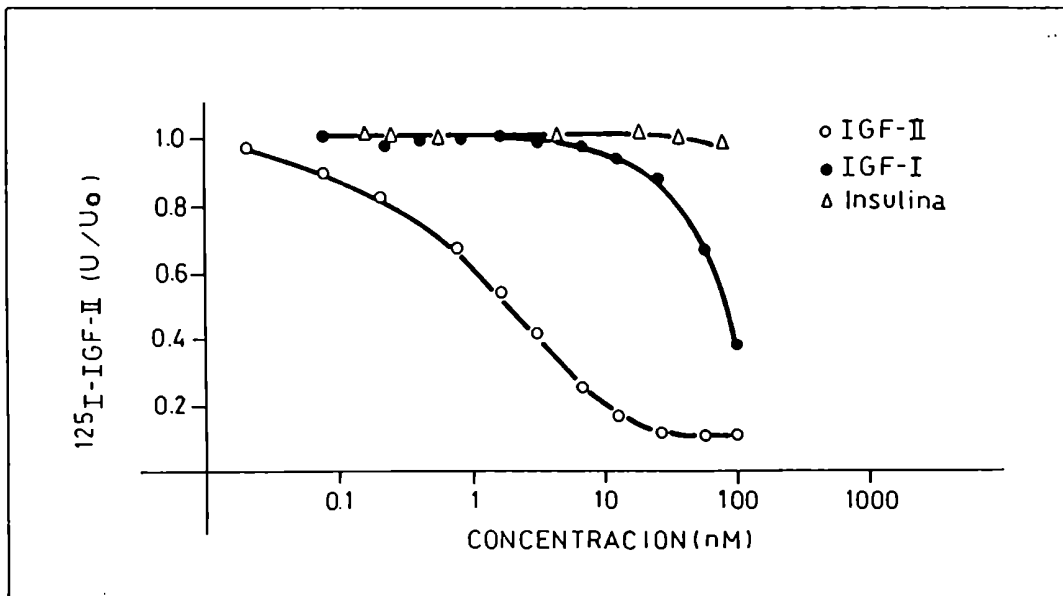


**Figura 17:** Unión de  $[^{125}\text{I}]\text{-IGF-II}$  a membranas del adenocarcinoma mamario 5HI: (A) Gráfico de *Scatchard*, (B) Curva de saturación.

Una alícuota de proteínas de membranas del tumor 5HI se incubó con una cantidad fija de  $[^{125}\text{I}]\text{-IGF-II}$  y cantidades variables de IGF-II no marcado. La figura demuestra el resultado de un experimento representativo.

### -Estudios de competencia de la unión [ $^{125}$ I]-IGF-II al IGF-R2

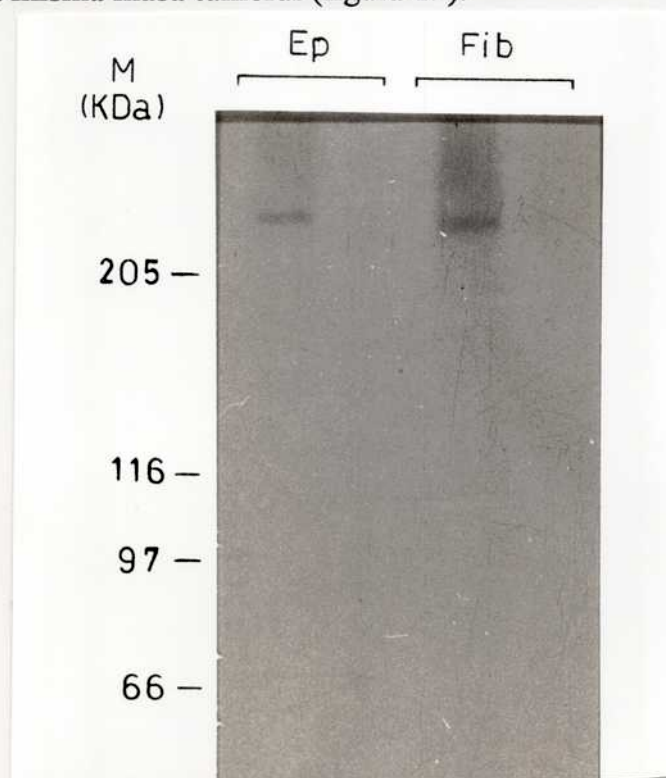
Con el fin de dilucidar el grado de especificidad de la interacción del IGF-II al IGF-R2, se realizaron ensayos radioligando-receptor en presencia de concentraciones variables de IGF-I, IGF-II e Insulina y una cantidad fija de [ $^{125}$ I]-IGF-II. En la figura 18 se observa que concentraciones del orden de 2 nM de IGF-II eran necesarias para obtener un 50% de inhibición de la unión máxima, mientras que utilizando IGF-I el mismo desplazamiento se obtenía con 80 nM de este GF. La Insulina en concentraciones del orden de 80 nM no produjo ningún efecto.



**Figura 18:** Estudios de la especificidad de la unión del [ $^{125}$ I]-IGF-II al IGF-R2. La fracción U/Uo (unión de [ $^{125}$ I]-IGF-II en presencia de concentraciones nM variables de ligandos no radioactivos/ unión en ausencia de los mismos) corresponde al promedio de incubaciones realizadas por triplicado de un experimento representativo.

## -Localización tisular de IGF-R2

Teniendo en cuenta la presencia de IGF-R2 en los adenocarcinomas mamarios inducidos por MPA, se decidió estudiar su posible localización tisular. Para ello se obtuvieron cultivos primarios de células epiteliales malignas y de fibroblastos provenientes del tumor 5 HD, sobre los cuales se realizaron ensayos de estabilización covalente de los complejos IGF-II-receptor. La autoradiografía obtenida reveló la presencia, en condiciones reductoras, de un sitio específico de 240 KDa para IGF-II tanto en las células epiteliales como en los fibroblastos provenientes de la misma masa tumoral (figura 19).

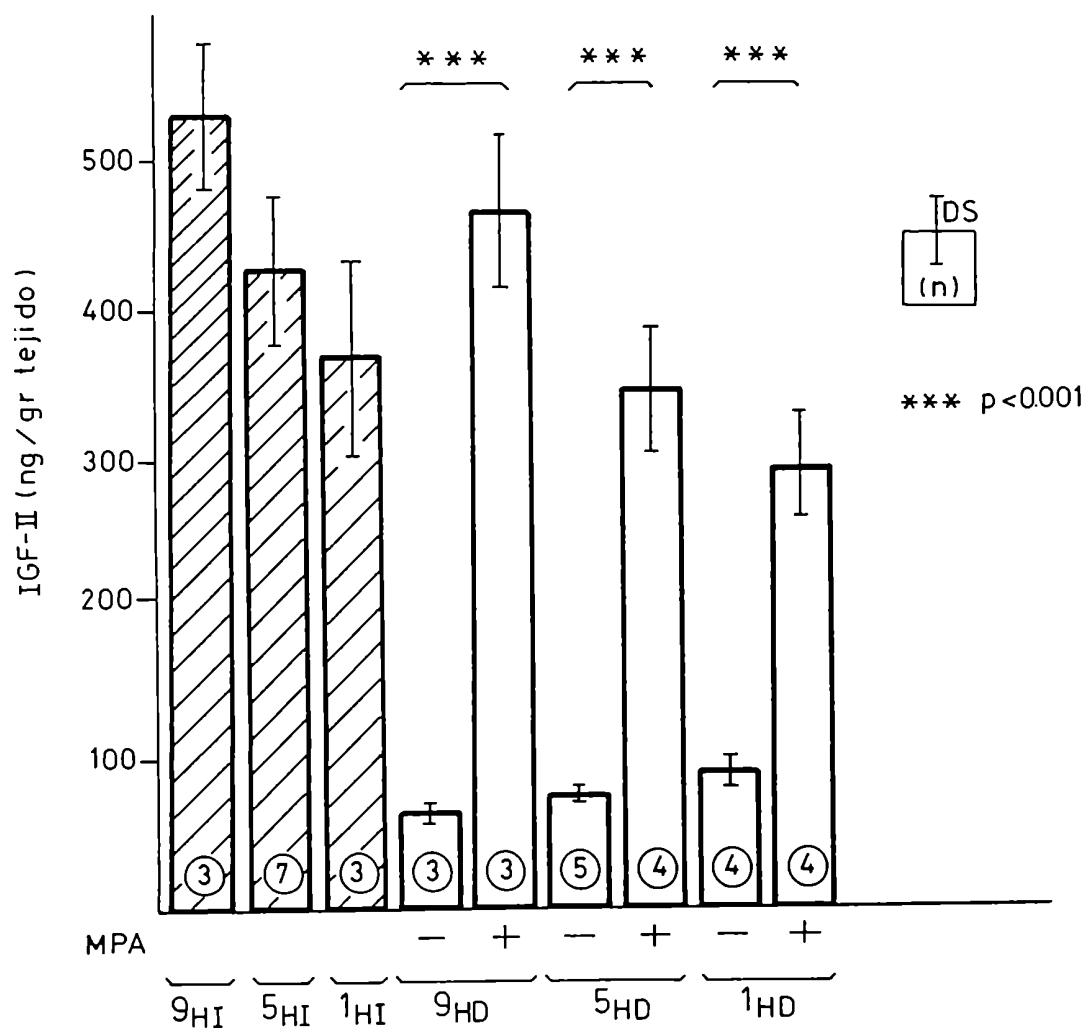


**Figura 19:** Estabilización covalente de los complejos [ $^{125}\text{I}$ ]-IGF-II-Receptor utilizando cultivos primarios de células epiteliales (Ep) o de fibroblastos (Fib) del tumor 5HD. Autoradiografía del gel fijado y secado. Los cultivos primarios se incubaron con [ $^{125}\text{I}$ ]-IGF-II durante 4 horas a 4°C y luego se realizó la reacción de entrecruzamiento con DSS por 15' a 0°C. Posteriormente las monocapas celulares se lavaron y se recogieron disolviéndolas en un *buffer* con Tritón X-100, que se analizó en un gel de poliacrilamida al 5.5% con SDS. Los carriles - y + representan las incubaciones paralelas en ausencia y presencia de un exceso de IGF-I no marcado. M representa los marcadores de PM utilizados en KDa.

## **-Determinación del contenido de IGF-II**

La extracción del IGF-II se realizó en forma semejante a la del IGF-I, en muestras individuales de los adenocarcinomas mamarios HD y HI. Luego de eliminar a las proteínas transportadoras, el IGF-II de cada extracto se cuantificó por desplazamiento en un ensayo radioligando-receptor usando como fuentes de receptores tipo II, preparados de membranas de los mismos adenocarcinomas mamarios inducidos por MPA. Las ventajas del uso de este sistema se debían, en primer lugar a la gran cantidad de receptores IGF-R2 presentes en los preparados de membranas de estos tumores experimentales, en comparación con el número de IGF-R1 y en segundo lugar a la baja afinidad del IGF-I por los sitios IGF-R2, de forma tal que solamente concentraciones mayores de 10 nM de IGF-I podían interferir en el ensayo (gráfico de competencia). De acuerdo a los resultados obtenidos en la cuantificación de IGF-I, la cantidad de este GF presente en 0.1 ml de extracto tumoral (volumen máximo utilizado en los ensayos de cuantificación de IGF-II), era del orden de 1-2 nM demostrándose que su presencia no interferiría en la medición del IGF-II.

En la figura 20 se observa que los niveles de IGF-II aumentaban significativamente en los tumores HD provenientes de animales tratados con respecto a los no tratados con MPA, encontrándose en los primeros un nivel semejante al observado en los adenocarcinomas mamarios hormono-independientes, ( $p < 0.001$ , test de Tukey).



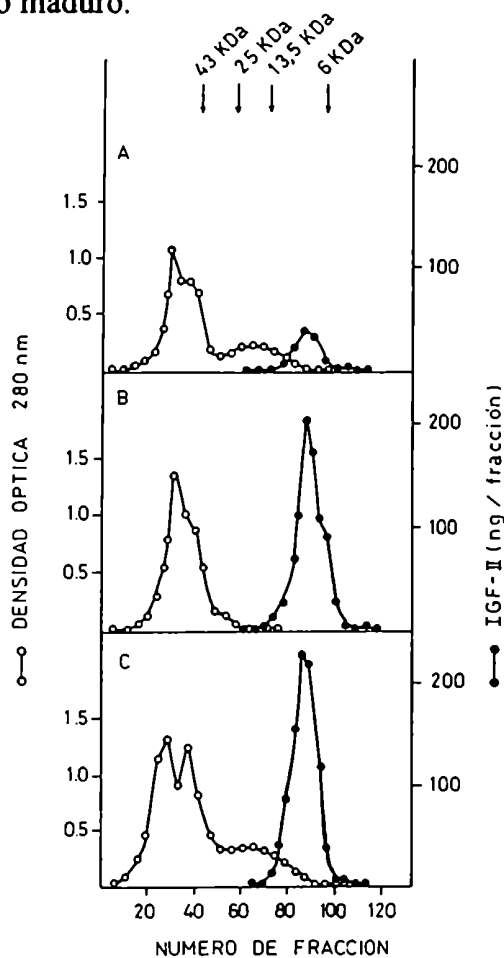
**Figura 20: Cuantificación de IGF-II en los extractos ácidos de los adenocarcinomas mamarios inducidos por MPA.**

En extractos ácidos de cada muestra tumoral se midió el contenido de IGF-II por medio de un ensayo radioligando-receptor utilizando como fuente de receptores IGF-R2 los preparados de membranas de los mismos adenocarcinomas mamarios murinos inducidos con MPA. El límite de detección del ensayo fue de 0.2 ng/tubo. Los datos representan media  $\pm$  desviación standard y (n): el número de determinaciones individuales.



## -Purificación de IGF-II por cromatografía en Bio-gel P60

Se cromatografiaron 100 mg de proteínas de los extractos ácidos de las líneas 1HD, 1HD+MPA y 1HI por columnas de Bio-gel P-60. El IGF-II se cuantificó en alícuotas de las fracciones obtenidas. En la figura 21 se observa que el IGF-II presente en los adenocarcinomas mamarios se detectó en la zona de PM correspondiente al péptido maduro.

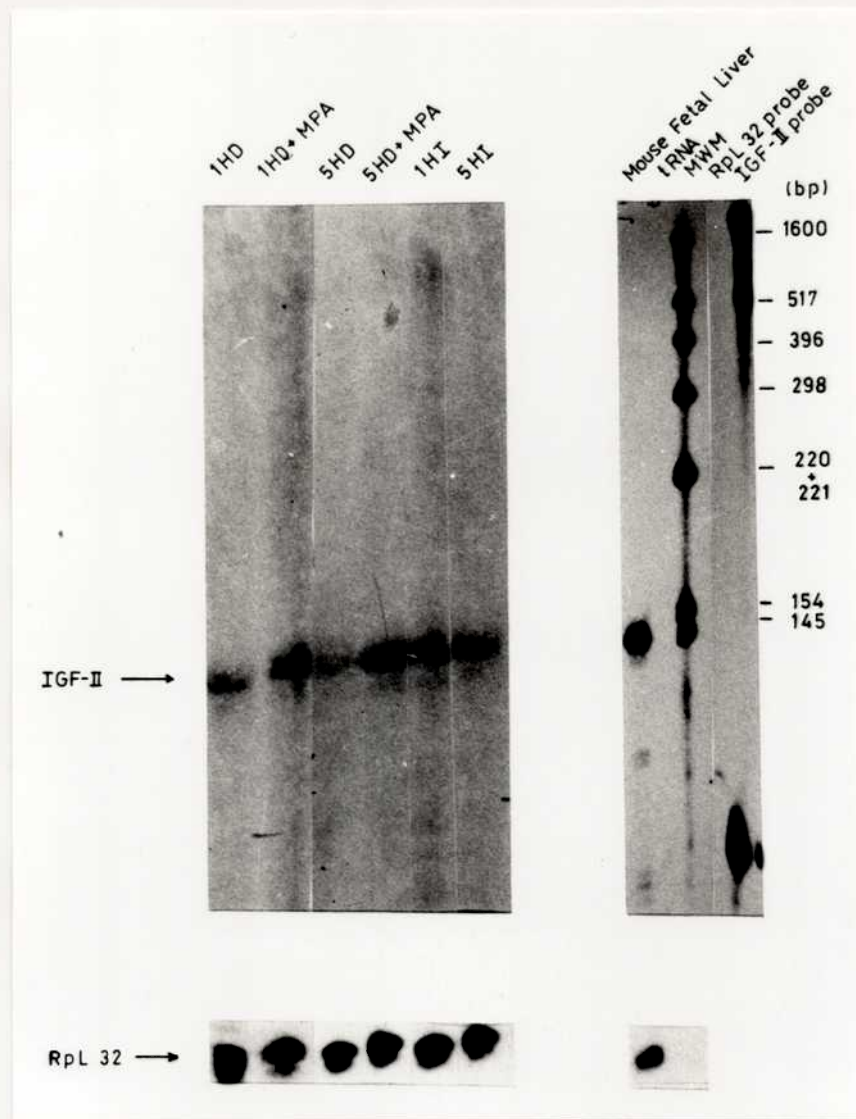


**Figura 21:** Caracterización del IGF-II presente en los extractos ácidos tumorales. Las fracciones impares colectadas de las columnas de Bio-gel P-60 y liofilizadas se disolvieron en CIH 4 mM, posteriormente se neutralizaron con *buffer* fosfato. Alícuotas de cada una se utilizaron en el ensayo radioligando-receptor, descrito en Materiales y Métodos, determinándose los ng de IGF-II presentes. Los marcadores de PM utilizados fueron: Ovoalbúmina (43 KDa), Quimotripsinógeno (25 KDa), Ribonucleasa A (13.5 KDa) e Insulina (6 KDa). A: 1HD, B:1HD+MPA, C:1HI.

### **-Expresión de IGF-II ARNm**

Se efectuaron ensayos de protección a la digestión por RNAsa A utilizando una sonda de ribonucleótidos marcada con [ $^{32}\text{P}$ ]- $\alpha$  UTP conteniendo la secuencia *antisense* del gen de IGF-II murino. Se ajustaron las condiciones para obtener una señal intensa utilizando como control positivo ARN total de hígado de ratón neonato, elegido por expresar niveles elevados de dicho GF (*Brown y col.*, 1986).

Los ensayos demostraron la presencia de IGF-II ARNm en las distintas líneas tumorales estudiadas (figura 22). También se observó un nivel significativamente más elevado de estos mensajeros en los tumores HD creciendo en ratones tratados con MPA respecto de los que crecían en ratones no tratados.



**Figura 22: Estudio de la expresión del IGF-II ARNm en los adenocarcinomas mamarios inducidos por MPA:** Una muestra de ARN total (60  $\mu$ g) de cada línea tumoral se hibridizó durante 16 horas a 50°C con dos ribosondas conteniendo las secuencias *antisense* del IGF-II murino (152 bp) o del fragmento EcoR1-Hind III del gen constitutivo RPL32 humano (76 bp). La figura muestra los fragmentos protegidos luego de la digestión por RNasa A. Como control positivo y negativo se utilizaron 50  $\mu$ g de ARN total de hígado fetal murino (Mouse Fetal liver) y 20  $\mu$ g de ARN de transferencia de levadura (tRNA) respectivamente. Los marcadores utilizados (MWM) se prepararon por marcación terminal de los fragmentos del plásmido PFH3 digeridos con Hinf I. IGF-II probe y RPL32 probe representan las dos ribosondas empleadas en el ensayo.

## **Estudio de la presencia del factor de crecimiento Epidérmico (EGF) y de su receptor (EGF-R) en los adenocarcinomas mamarios inducidos por MPA**

### **-Determinación del contenido de EGF-R**

Se realizaron ensayos radioligando-receptor en presencia de una concentración saturante de [<sup>125</sup>I]-EGF. Los primeros resultados obtenidos demostraron la presencia de niveles bajos o indetectables de EGF-R en la mayoría de los adenocarcinomas ductales HD u HI corrientemente estudiados, sin poder establecer ninguna regulación de los mismos por MPA (tablas 2 y 3). Ampliando el espectro de los tumores estudiados, se dilucidó que aquellos que poseían comportamiento HI e histología lobulillar presentaban un número significativamente mayor de EGF-R ( $p < 0.01$ , test de Fisher), ( tabla 4).

Por lo tanto, si consideramos a los valores de EGF-R menores de 1 fmol/mg de proteína como indetectables, se podría sugerir que en general todos los tumores con histología ductal (ya sean HD u HI) no expresaban EGF-R. Sin embargo, éstos presentaban niveles apreciables de receptores para hormonas esteroideas, ER y PR. Por otro lado, los tumores con histología lobulillar con mayores niveles de EGF-R, poseían niveles indetectables de ER y PR. Estos resultados sugerirían una cierta correlación entre la ausencia de receptores para hormonas esteroideas y la presencia de EGF-R (ER: coeficiente de correlación= -0.5105,  $p < 0.01$ , PR: coeficiente de correlación= -0.5217,  $P < 0.01$ ).

En relación con los valores de velocidad de crecimiento tumoral, no se encontró ninguna correlación significativa con los niveles de EGF-R (coeficiente de correlación= 0.0929, NS) (tablas 2, 3 y 4, figura 23).

**Tabla 2****Niveles de EGF-R, receptores para Hormonas Esteroideas y Crecimiento tumoral en los adenocarcinomas mamarios murinos HD con histología ductal.**

	MPA	EGF-R (fm/mg p)	ER (fm/mg p)	PR (fm/mg p)	CRECIMIENTO
9 -HD	+	ND (5)	146±12 (4)	124±14 (4)	11.7±0.53
	-	ND (4)	68±35 (4)	367±76 (4)	3.67±0.41
1 -HD	+	0,6 (1)	47±18 (2)	82±5 (2)	16.25±2.25
	-	1,6 (1)	51.75±12.67 (4)	346.5±159.47 (4)	1.84±0.18
53-HD	+	0,8±0,1 (6)	146±11 (3)	239±185 (2)	6.58±1.57
	-	0,6±0,1 (4)	218±87 (2)	320 (1)	1.69±0.27
59-HD	+	1,3±0,2 (4)	200.4±36.6 (5)	251.20±93 (4)	9.31±0.66
	-	2,8±0,8 (2)	109.25±72.00 (2)	-	2.38±0.14
5 -HD	+	1,1 (2)	61.71±25.21 (4)	198.14±70 (5)	3.66±0.049
	-	ND (4)	98.42±33.57 (5)	424±115 (7)	

PROMEDIOS

MEDIA ± ES

Receptor	- MPA	+ MPA
EGF-R	1±0.53	0.76±0.22
ER	109±29	120±28.7
PR	364±22	178±32
CRECIM.	1.9±0.59	9.5±2.1

n.s.

n.s

p &lt; 0.01

p &lt; 0.01

Los datos representan media ± desviación standard y (n): número de determinaciones individuales. En el panel inferior se presentan los valores promedios (media ± error standard). Los valores p fueron calculados mediante el Test "t" de Student.

n.s.: no-significativo.

**Tabla 3**

**Niveles de EGF-R, receptores para Hormonas Esteroideas y Crecimiento tumoral en los adenocarcinomas mamarios murinos HI con histología ductal.**

	MPA	EGF-R (fm/mg p)	ER (fm/mg p)	PR (fm/mg p)	CRECIMIENTO
9 HI	+	ND (5)	69±2.5 (2)	104±104 (2)	9.46±0.09
	-	ND (5)	34±8 (7)	160.85±48 (7)	9.63±1.36
1 HI	+	ND (1)	81.33±17.38 (6)	45.25±9.29 (4)	9.58±1.27
	-	ND (1)	83.66±15.55 (3)	364.33±30.18 (3)	4.03±0.68
53-HI	+	1,6±0,4 (2)	-	-	7.6±0.62
	-	1,5±0,4 (3)	133.20±16.81 (5)	441.00±188.77 (4)	4.86±1.10
59-HI	+	1,4 (1)	60.25±8.35 (4)	60.75±33.14 (4)	9.74±1.55
	-	1,5±0.4 (3)	36±3.31 (4)	72.66±44.12 (3)	7.18±0.67
5 HI	+	ND (2)	64.5±5.9 (4)	134.75±33.39 (4)	24.98±6.92
	-	ND (2)	51.75±19.46 (4)	342.66±263.66 (3)	14.76±2.77

PROMEDIOS

Receptor	- MPA	+ MPA
EGF-R	0.6±0.36	0.6±0.36
ER	67.7±18.6	55.01±14
PR	276±86.5	68.95±23.38
CRECIM.	8.092±1.93	12.27±3.2

n.s.

n.s.

p < 0.05

p < 0.05

MEDIA ± ES

Los datos representan media ± desviación standard y (n): número de determinaciones individuales. En el panel inferior se presentan los valores promedios (media ± error standard). Los valores p fueron calculados mediante el Test "t" de Student.

n.s.: no-significativo.

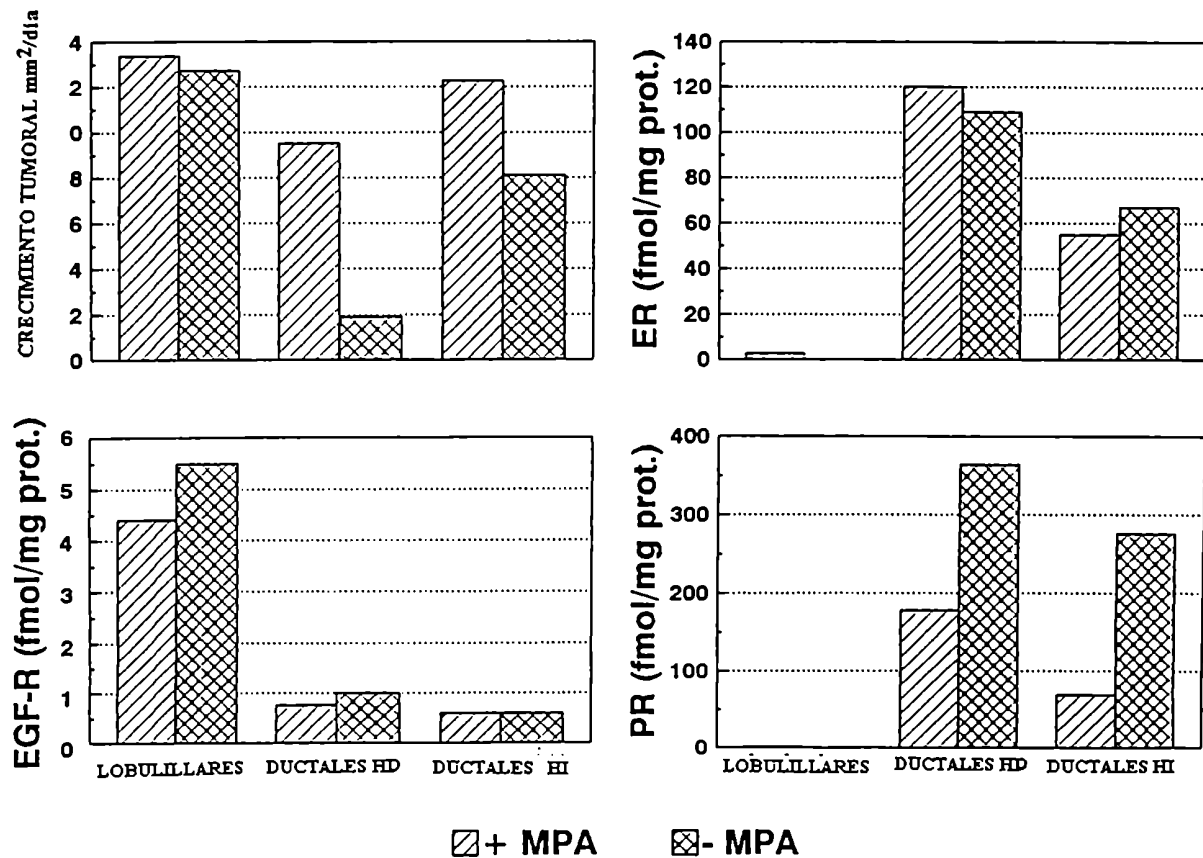
**Tabla 4**

**Niveles de EGF-R, receptores para Hormonas Esteroideas y Crecimiento tumoral en los adenocarcinomas mamarios murinos HI con histología lobulillar.**

Tumor	MPA		EGF-R (fm/mg p)	ER (fm/mg p)	PR (fm/mg p)	CRECIMIENTO
55	+	HI	5,7±1,3 (4)	ND (3)	ND (3)	18.7±0.58
	-		4,0±0,4 (6)	ND (3)	ND (3)	23.84±2.60
25B	+	HI	1,6±0,2 (6)	ND (1)	ND (1)	16.41±2.027
	-		1,0±0,1 (4)	ND (3)	11.1±7.4 (3)	15.36±1.6
24	+	HI	4,7±0,5 (4)	ND (2)	ND (1)	8.579±1.83
	-		5,7±0,8 (3)	ND (4)	ND (3)	7.98±0.998
54	+	HI	2,4±0,4 (2)	16±3 (2)	ND (2)	9.52±2.73
	-		1,8±0,1 (3)	46±11 (5)	ND (5)	8.3±2.37
60	+	HI	9,8±2,0 (3)	ND (4)	ND (4)	13.68±3.15
	-		12,1±1,9 (5)	ND (4)	ND (4)	9.67±0.52
39B	+	HI	-	5 (1)	ND (1)	6.26±0.3
	-		8,7±2,7 (2)	6.2±1.9 (3)	ND (3)	4.54±0.68
22	+	HI	3,8 (1)	ND (4)	ND (4)	7.23±1.01
	-		-	ND (4)	ND (4)	8.05±1.36
52	+	HI	3,1 (1)	ND (4)	ND (4)	26.52±3.20
	-		4,2 (1)	ND (4)	ND (4)	24.00±3.72

MEDIA ± ES	PROMEDIOS	- MPA	+ MPA	n.s.
		EGF-R	5.5±1.4	
	CRECIM.	12.71±2.6	13.36±2.4	n.s.
MEDIA (RANGO)		ER	0 (0-46)	n.s.
		PR	0 (0-11.1)	n.s.

Los datos representan media ± desviación standard y (n): número de determinaciones individuales. En el panel inferior se presentan los valores promedios (media ± error standard). Los valores p fueron calculados mediante el Test "t" de Student.  
n.s.: no-significativo.



**Figura 23:** Niveles de EGF-R, receptores para Hormonas Esteroideas y Crecimiento tumoral en los adenocarcinomas mamarios murinos inducidos por MPA. Representación esquemática de los resultados presentados en las **Tablas 2,3 y 4**, por el estudio de varias líneas tumorales con histología ductal HD y HI o con lobulillar provenientes de animales tratados (+MPA) o no tratados con MPA (-MPA).



### **-Determinación del contenido de EGF**

La presencia de sitios EGF-R en algunos de los adenocarcinomas mamarios estudiados nos llevó a dilucidar si un cierto número o todos los tumores poseían niveles detectables de EGF. Para esto se determinó la concentración de EGF, por RIA, en los extractos acídicos tumorales. Los resultados obtenidos demostraron que todos los adenocarcinomas ensayados ya sean HD (provenientes de animales tratados o no tratados con MPA) u HI (de histología lobulillar o ductal) no presentaban cantidades detectables de EGF.

### **-Efecto del MPA en los niveles de EGF**

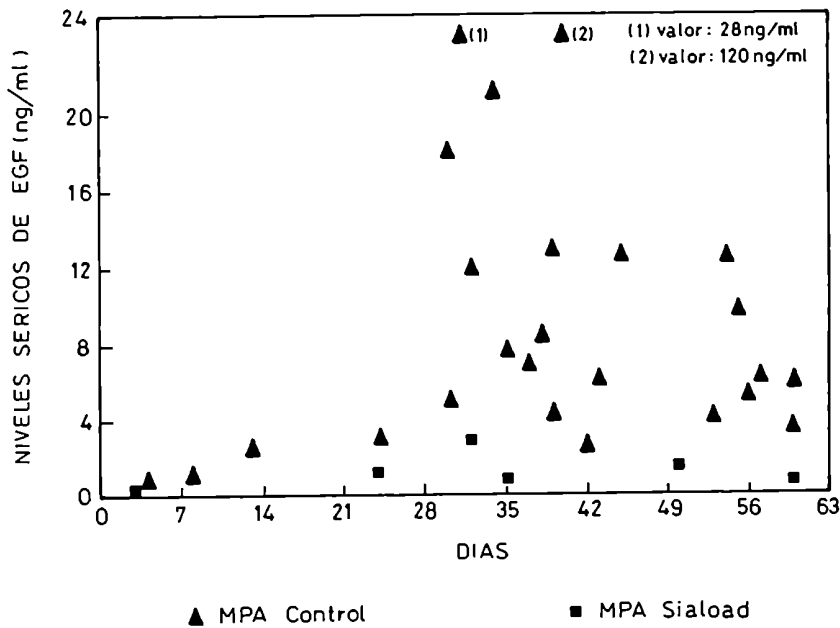
La presencia de receptores EGF-R en algunos de los tumores estudiados y la ausencia de producción de sus ligandos específicos: EGF y TGF- $\alpha$  (los estudios realizados sobre este TGF se detallarán mas adelante) nos incitó a dilucidar la existencia de una posible participación endócrina del EGF, en la inducción y en el desarrollo tumoral. Como se describió anteriormente, en el ratón la glándula submaxilar es la encargada de sintetizar los mayores niveles de EGF. En este caso, la estrategia experimental utilizada consistió en la inducción de adenocarcinomas mamarios por MPA en ratones BALB/c controles y sialoadenectomizados. Los resultados encontrados por el grupo de Lanari y col. (1994), demostraron que la sialoadenectomía reducía significativamente ( $p < 10^{-4}$ ) la incidencia tumoral, sin afectar la latencia y el crecimiento tumoral *in vivo*.

Considerando esto, se quiso comprobar si la inducción inicial de adenocarcinomas mamarios con MPA en ratones hembras vírgenes BALB/c, era acompañada por alguna modificación de los niveles de EGF encontrados en el suero (EGF-S) y en las glándulas submaxilares (EGF-SG) de los animales tratados con MPA. Con este fin, estos niveles se midieron en animales tratados por 1-2 meses con MPA y en animales controles sin ningún tratamiento hormonal. Los resultados encontrados revelaron que el MPA aumentaba significativamente los niveles de EGF-S como los de EGF-SG. En este último caso los valores encontrados fueron de  $761 \pm 157$  ng/mg de tejido (n:14) en ratones tratados con MPA, frente a  $35 \pm 11$  ng/mg

de tejido (n:7) en el grupo control, ( $p < 0.01$ , Mann Whitney). En el caso de los niveles séricos de EGF, los valores individuales fueron muy variables. En la figura 24, se observa que los mismos eran apreciables a los 20 días del inóculo, alcanzando los mayores valores en el día 40 (120 ng/ml).

### -Efecto de la sialoadenectomía en los niveles de EGF

Con el fin de dilucidar si las variaciones en EGF-S por MPA eran una consecuencia del aumento de EGF-SG, los mismos ensayos se realizaron en animales sialoadenectomizados. Los resultados obtenidos demostraron que el tratamiento estos animales con MPA no inducía alguna variación en los niveles de EGF-S (figura 24).



**Figura 24: Efecto de la sialoadenectomía en los niveles séricos de EGF.**

El EGF-S se midió por un radioinmunoensayo en muestras provenientes de *pools* de 3-6 animales, obtenidas a diferentes intervalos de tiempo luego del inóculo de MPA. El tratamiento con MPA se realizó una semana posterior a la operación.

### **Estudio de la expresión de los factores de transformación $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$ ) y $\alpha$ (TGF- $\alpha$ ) y de sus receptores en los adenocarcinomas de mamaros inducidos por MPA**

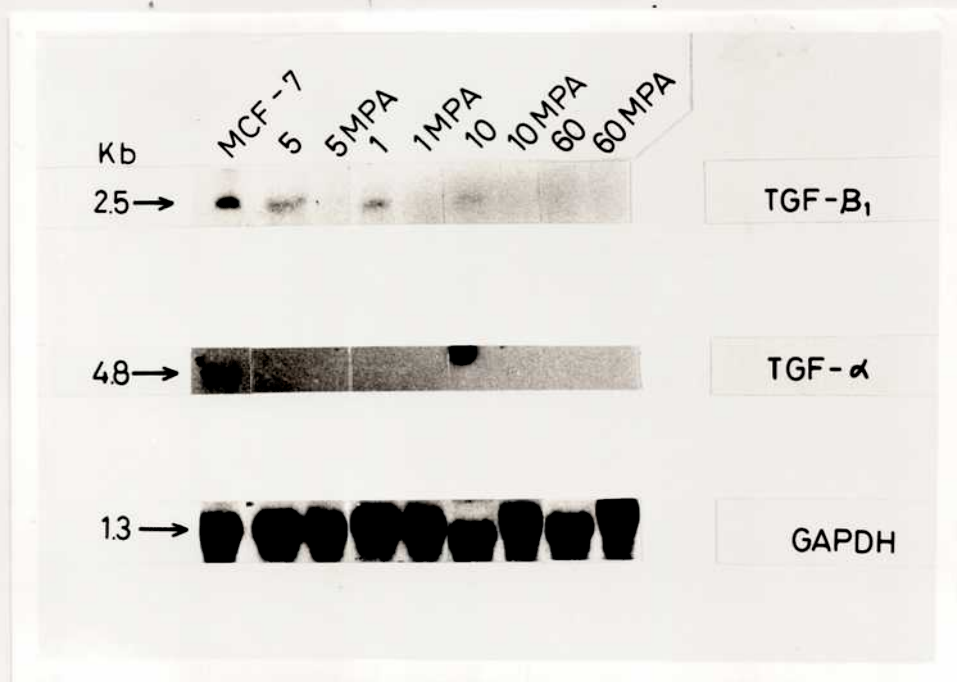
En este caso se utilizaron 4 líneas tumorales provenientes de ratones BALB/c tratados o no con MPA. Las líneas 5, 1 y 10 poseían un comportamiento HD, mientras que la línea tumoral 60 era completamente HI.

Entre las líneas hormono-dependientes sin tratamiento hormonal, las velocidades de crecimiento tumoral fueron menores en las líneas 5 y 1 (línea 5:  $0.63 \pm 0.06$  mm<sup>2</sup>/día, (n=20); línea 1:  $1.90 \pm 0.21$  mm<sup>2</sup>/día, (n=20)), que en la línea 10 ( $7.23 \pm 0.91$  mm<sup>2</sup>/día, (n=20)). Por otro lado, la línea independiente 60, poseía una alta velocidad de crecimiento tanto en ausencia como en presencia de MPA, con valores de  $21.47 \pm 3.6$  mm<sup>2</sup>/día, (n=16) y  $23.4 \pm 1.99$  mm<sup>2</sup>/día, (n=16) respectivamente (figura 26 A).

#### **-Estudios de expresión del TGF- $\beta 1$ ARNm**

Por ensayos de Northern Blot, se investigó la expresión de este factor de transformación en líneas tumorales inducidas por MPA, mediante el uso de una sonda de ribonucleótidos específica para TGF- $\beta 1$  marcada con  $\alpha$  [<sup>32</sup>P]-UTP. La hibridización posterior con una sonda radioactiva correspondiente al gen constitutivo GADPH, confirmó que se había sembrado aproximadamente la misma cantidad de muestra en cada carril.

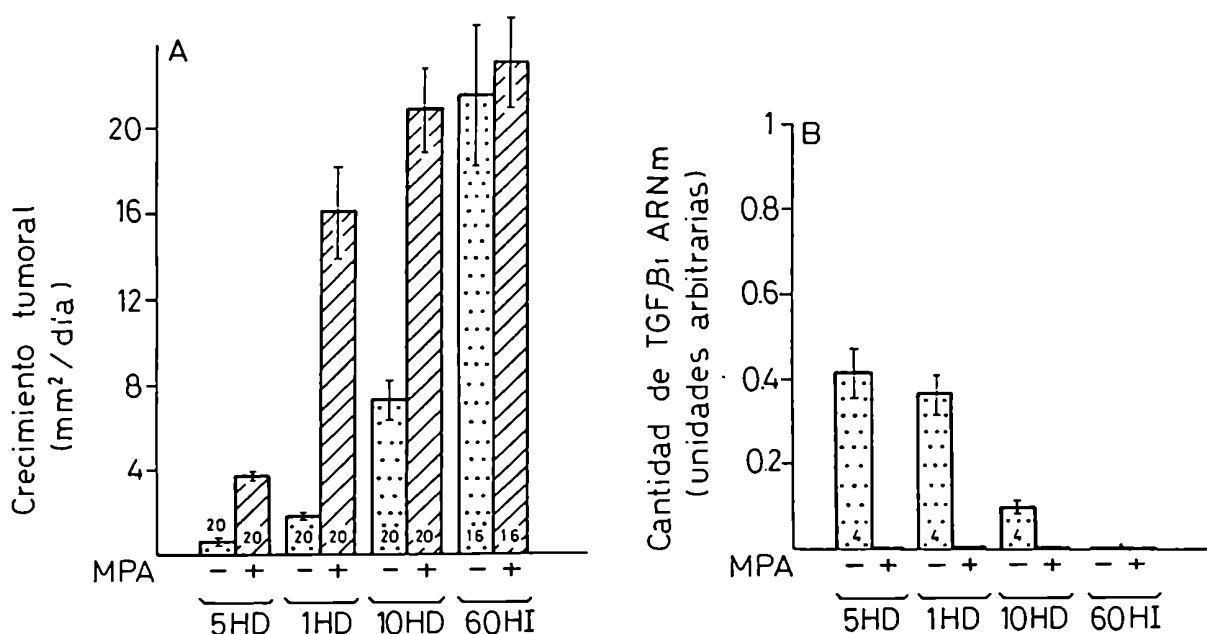
Los resultados encontrados se observan en la figura 25. Se observó que todas las líneas tumorales hormono-dependientes expresaban un transcripto de 2.5 Kb, no evidenciable cuando los tumores provenían de ratones tratados con MPA.



**Figura 25:** Expresión del TGF- $\beta$ 1 ARNm y TGF- $\alpha$  ARNm en los adenocarcinomas mamarios murinos inducidos por MPA. 20  $\mu$ g de ARN total de cada una de las líneas tumorales estudiadas se analizaron mediante ensayos de Northern Blot. En el panel superior se demuestra la autoradiografía obtenida por hibridización con una sonda de ribonucleótidos para TGF- $\beta$ 1. La hibridización con el ADNc para TGF- $\alpha$  se presenta en el panel intermedio. Panel inferior hibridización con una sonda de ribonucleótidos para el gen GAPDH.

Por medición densitométrica de la intensidad de las bandas obtenidas con respecto a la expresión constitutiva del gen GAPDH, se demostró que los niveles de TGF- $\beta$ 1 ARNm en los adenocarcinomas 1 y 5 eran aproximadamente 4 veces mayores que los observados en la línea tumoral 10 (figura 26). Por otro lado, en la línea tumoral 60 hormono-independiente no se detectaron niveles apreciables de TGF- $\beta$ 1 ARNm.

Además se comprobó una correlación inversa entre los niveles de TGF- $\beta$ 1 ARNm y la velocidad de crecimiento de los tumores HD sin tratamiento hormonal (figura 26).



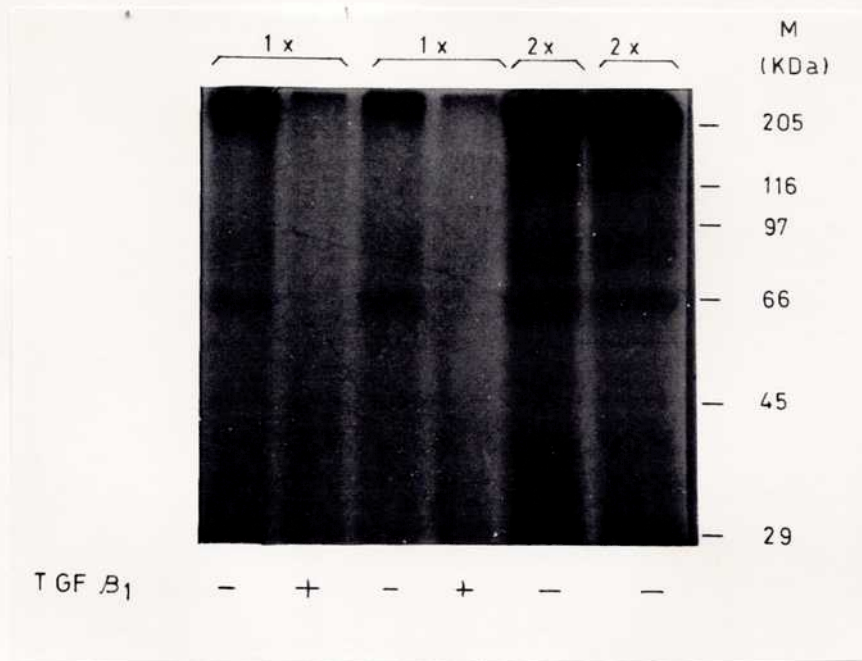
**Figura 26: Correlación entre los niveles de ARNm para TGF- $\beta$ 1 y la velocidad de crecimiento tumoral.** (A) Velocidades de crecimiento de las líneas tumorales. (B) Medición densitométrica del autoradiograma presentado en la figura anterior, de los niveles de TGF- $\beta$ 1 ARNm en los adenocarcinomas mamarios HD sin tratamiento hormonal, relativos a los del gen constitutivo GAPDH. Una variación entre 10-15% se observó por la realización de cuatro experimentos independientes.

### **-Estudios de la expresión de TGF- $\alpha$**

Por ensayos de Northern Blot se estudió la expresión de TGF- $\alpha$  ARNm utilizando una sonda radioactiva del ADNc de TGF- $\alpha$ . Como control positivo se utilizó ARN total extraído de la línea celular MCF-7 que evidenció un transcripto de 4.8 Kb. Los resultados demostraron la ausencia de expresión de TGF- $\alpha$  en las líneas tumorales HD (con o sin tratamiento hormonal) como en las HI. Los mismos resultados se obtuvieron utilizando una sonda radioactiva de ribonucleótidos de TGF- $\alpha$  (figura 25).

### **-Receptores para TGF- $\beta$**

La presencia de receptores específicos para TGF- $\beta$ 1 se estudió en cultivos primarios de la línea tumoral 5 HD, mediante ensayos de estabilización covalente de los complejos [ $^{125}$ I]-TGF- $\beta$ -receptor en presencia de  $\beta$ -mercaptoetanol. La autoradiografía obtenida se observa en la figura 27. Se observó una unión específica en distintos tipos de receptores con tamaños de 215 KDa, 90 KDa y 66 KDa, concordantes con los receptores para TGF- $\beta$ s de clase III, II y I respectivamente y predominando en abundancia el de mayor peso molecular.



**Figura 27: Estabilización covalente de los complejos [<sup>125</sup>I]-TGF-β1-Receptor utilizando cultivos primarios de células epiteliales del tumor 5HD.**

Autoradiografía del gel fijado y secado. Los cultivos primarios se incubaron con [<sup>125</sup>I]-TGF-β1 durante 4 horas a 4°C y luego se realizó la reacción de entrecruzamiento con DSS por 15' a 0°C. Posteriormente las monocapas celulares se lavaron y se recogieron disolviéndolas en un *buffer* con Tritón X-100, que se analizó en un gel de poliacrilamida al 5.5% con SDS. Los carriles - y + representan las incubaciones paralelas en ausencia y presencia de un exceso de TGF-β1 no marcado. 1X y 2X representan la cantidad de proteínas sembradas en cada carril. M representa los marcadores de PM utilizados en KDa.

## **Estudio de la presencia de componentes del Sistema Renina-Angiotensina en los adenocarcinomas mamarios murinos inducidos por MPA**

### **-Localización tisular de receptores para Ang II**

Por la técnica de autoradiografía *in vitro* cuantitativa, efectuada en cortes tisulares de cinco tumores, HD u HI, con histología ductal, se pudo determinar la presencia de una elevado número de receptores específicos para Angiotensina II, localizados exclusivamente en la masa epitelial y no en el estroma adjacente (figuras 28 y 29, tabla 5). Adicionalmente, por incubaciones paralelas en presencia de un bloqueante selectivo de sitios AT1, Losartán o de sitios AT2, PD 123177, se determinó que la señal observada correspondía exclusivamente a los de tipo I o AT1. En la tabla 5 se observan los valores obtenidos en fmol/mg de proteína, determinados por cuantificación de la señal aportada por toda la sección tumoral. Se observó un número semejante de sitios AT1 tanto en los tumores ductales HI como en los HD.

De forma contraria cuando los mismos ensayos se realizaron en secciones de dos adenocarcinomas mamarios HI con histología lobulillar, se evidenció una muy pequeña cantidad de sitios para Ang II (tabla 5, figura 30), localizados principalmente en ciertas zonas del tejido conectivo periférico. En dichas áreas, la unión de [<sup>125</sup>I]Sar<sup>1</sup>AngII fue predominantemente desplazada por PD 123177, indicando el predominio de sitios del subtipo AT2. La cuantificación reveló la presencia de una concentración no uniforme en distintas secciones de los adenocarcinomas lobulillares estudiados. En la tabla 5 se presentan los valores obtenidos.

Los mismos ensayos se realizaron en secciones de glándula mamaria normal de ratones hembras BALB/c, en las cuales la señal obtenida estaba por debajo del límite de detección del método empleado.

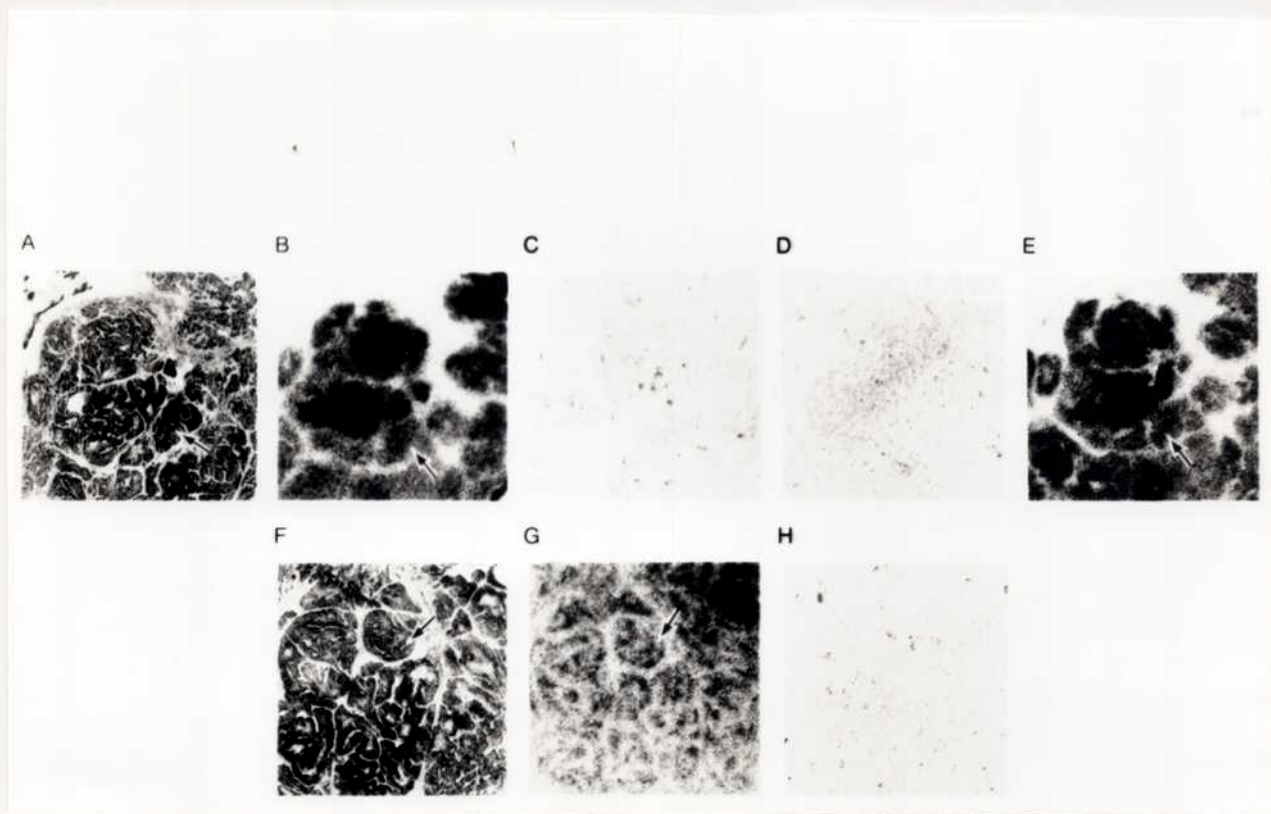


**Tabla 5**

**Cuantificación autoradiográfica de la unión de  $^{125}\text{I}$ -Sar<sup>1</sup>-AngII en los adenocarcinomas mamarios murinos inducidos por MPA.**

	<u>Unión específica</u>	<u>+ PD123177</u> ( $10^{-5}\text{M}$ ) <b>AT1</b>	<u>+ Losartán</u> ( $10^{-5}\text{M}$ ) <b>AT2</b>
	(fmol/mg proteína)		
<b><u>Tumores Ductales</u></b>			
<b>*sección completa</b>			
1 HD	274	280	ND
5 HD	602	595	ND
1 HI	402	442	ND
5 HI	414	403	ND
9 HI	602	567	ND
<b><u>Tumores lobulillares</u></b>			
<b>*sección completa</b>			
60 HI	ND	ND	ND
55 HI	ND	ND	ND
<b>*sección de tejido conectivo periférico</b>			
60 HI	54	ND	46
55 HI	50	ND	29
<b>Control</b>			
glándula mamaria	ND	ND	ND

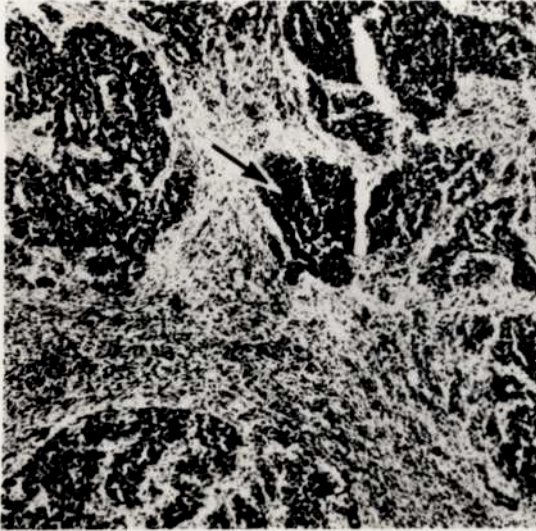
ND: no detectable



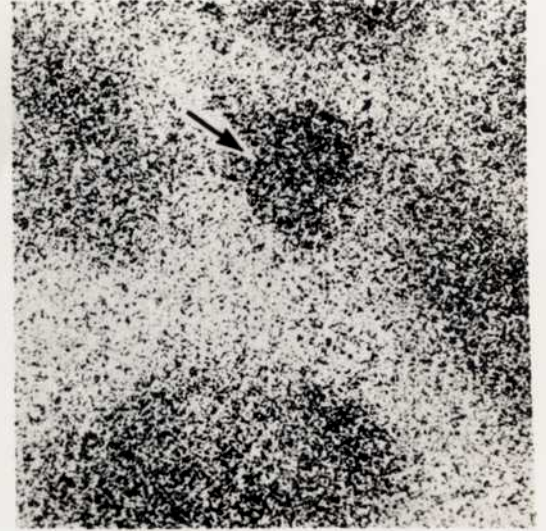
**Figura 28:** Autoradiografía comparativa de la distribución de la unión de  $[^{125}\text{I}]\text{-Sar}^1\text{-AngII}$  (A-E) y ACE (F-H) en el adenocarcinoma mamario con histología ductal 5HD.

(A) y (F) representan las tinciones de las secciones de dicha línea tumoral con Hematoxilina-Eosina. (B-E): secciones consecutivas a la representada en (A). (G-H) secciones consecutivas a la presentada en (F). (B): incubación con  $[^{125}\text{I}]\text{-Sar}^1\text{-AngII}$  0.5 nM (unión total), (C): unión en presencia de Ang II 50 $\mu\text{M}$  (unión inespecífica), (D): unión en presencia de Losartán 50 $\mu\text{M}$  (receptores AT2), (E): unión en presencia de PD123177 50 $\mu\text{M}$  (receptores AT1). (G): Unión en presencia de  $[^{125}\text{I}]\text{-351A}$  (unión total), (H): unión en presencia de MK521 1 $\mu\text{M}$  (unión inespecífica). (Flecha): masa de tejido epitelial maligno (13X)

A

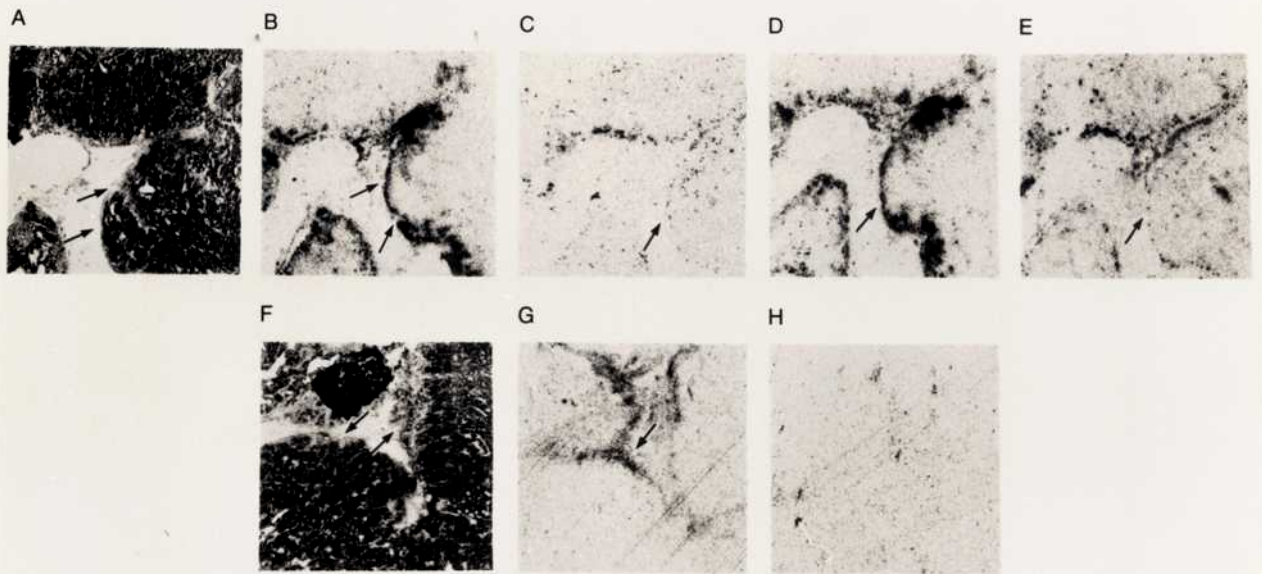


B



**Figura 29:** Localización específica de la unión de  $[^{125}\text{I}]\text{-Sar}^1\text{-AngII}$  en el adenocarcinoma mamario con histología ductal 5HD.

(A): tinción Hematoxilina-Eosina. (B) sección consecutiva, incubación con  $[^{125}\text{I}]\text{-Sar}^1\text{-AngII}$  0.5 nM (unión total). (Flecha): masa de tejido epitelial maligno (70X)



**Figura 30:** Autoradiografía comparativa de la distribución de la unión de  $[^{125}\text{I}]\text{-Sar}^1\text{-AngII}$  (A-E) y ACE (F-H) en el adenocarcinoma mamario con histología lobulillar 60HI.

(A) y (F) representan las tinciones de las secciones de dicha línea tumoral con Hematoxilina-Eosina. (B-E): secciones consecutivas a la representada en (A). (G-H) secciones consecutivas a la presentada en (F). (B): incubación con  $[^{125}\text{I}]\text{-Sar}^1\text{-AngII}$  0.5 nM (unión total), (C): unión en presencia de Ang II 50 $\mu\text{M}$  (unión inespecífica), (D): unión en presencia de Losartán 50 $\mu\text{M}$  (receptores AT2), (E): unión en presencia de PD123177 50 $\mu\text{M}$  (receptores AT1). (G): Unión en presencia de  $[^{125}\text{I}]\text{-351A}$  (unión total), (H): unión en presencia de MK521 1 $\mu\text{M}$  (unión inespecífica). (Flecha): masa de tejido epitelial maligno (13X)



## **-Localización y Cuantificación de la Enzima convertidora de Angiotensina, (ACE)**

Como se mencionó en la **Introducción**, la ACE es la encargada de la producción de Angiotensina II a partir de Angiotensina I, de forma tal que la localización de la misma nos daría cierta información de las regiones potenciales de mayor producción de dicho ligando.

Con el uso de la autoradiografía cuantitativa *in vitro* y de un inhibidor enzimático marcado, 351 A, se determinó que la localización de ACE aparecía en las zonas con mayor expresión de sitios Ang II-R. De esta forma, los tumores con histología ductal, ya fueran HD o HI, presentaban una mayor señal en el tejido epitelial tumoral en relación con la observada en el estroma circundante (figura 28, tabla 6). Por otro lado, en los adenocarcinomas mamarios con histología lobulillar la misma se apreció exclusivamente en la zona correspondiente a la localización de receptores AT2 (figura 30). En la tabla 6 se muestran los valores obtenidos por la cuantificación de las zonas nombradas, destacándose nuevamente los mayores niveles para los tumores ductales con respecto a los lobulillares.

Estos ensayos también se realizaron en secciones de glándula mamaria normal de ratones hembras BALB/c. Tal como para el caso de Ang II-R, las señales obtenidas se localizaban por debajo del límite de detección del método empleado.

**Tabla 6**

**Cuantificación autoradiográfica de la unión a la Enzima convertidora de Angiotensina (ACE) en los adenocarcinomas mamarios murinos inducidos por MPA.**

	<u>Unión específica</u> (fmol/mg prot)
<b><u>Tumores Ductales</u></b>	
<b>*sección completa</b>	
1 HD	422.8
5 HD	27.8
1 HI	33.3
5 HI	69.3
9 HI	186.0
<b><u>Tumores lobulillares</u></b>	
<b>*sección completa</b>	
60 HI	5.2
55 HI	3.7
<b>Control</b> glándula mamaria	ND

ND: no detectable

## ***DISCUSIÓN***

Los resultados presentados en el presente trabajo abarcan el estudio de GFs, TGFs y sus receptores en un modelo experimental *in vivo* de **adenocarcinomas mamarios inducidos por MPA en hembras BALB/c.** Este modelo de carcinogénesis experimental está compuesto por varias líneas tumorales desarrolladas a partir de los pasajes singeneicos de los adenocarcinomas de mama primarios inducidos por MPA. Estas líneas fueron clasificadas según sus comportamientos como hormono-dependientes (HD) o autónomas (HI) según su requerimiento del MPA para crecer en los animales transplantados (*Lanari y col., 1989*).

La importancia de la utilización de los modelos *in vivo* en vez de sistemas tumorales *in vitro*, se basa en el hecho de que, en estos últimos, la posibilidad del estudio de la regulación y función de cada GF puede realizarse sólo bajo ciertas condiciones controladas, incapaces de reproducir la complejidad de las interacciones entre los distintos tipos celulares existentes en una masa tumoral completa y las influencias de los sistemas endócrinos e inmunológicos del hospedador. Por lo tanto, el empleo de los adenocarcinomas mamarios murinos continuamente transplantables en ratones singeneicos, mimetizaría en cierto grado, la situación clínica donde los tumores no consisten solamente en células epiteliales malignas sino también en fibroblastos, macrófagos y células endoteliales.

Los resultados presentados sugieren la presencia de posibles interacciones entre los sistemas de GFs y TGFs y la acción inductora y proliferativa del progestágeno MPA en los tumores mamarios del modelo experimental. Hasta el momento, los resultados descriptos respecto de los efectos de la Progesterona sobre la proliferación celular no han sido totalmente concluyentes. Tanto los estudios *in vivo* como *in vitro* efectuados, indicaban que la progesterona era capaz de antagonizar el crecimiento estimulado por los estrógenos en líneas celulares epiteliales normales uterinas y en líneas de cancer de endometrio (*Lane y col., 1986; Norquist., 1979; Takeda y col., 1986*). Contrariamente, cuando los mismos ensayos se realizaron en distintas líneas celulares de cancer de mama, se comprobó que la Progesterona o los Progestágenos sintéticos eran capaces de inhibir (*Vignon y col., 1983; Horwitz y col., 1987*), estimular (*Hissom y col., 1989*) o no tener efecto (*Schatz y col., 1985*) sobre la proliferación celular. Las explicaciones de



estos fenómenos se atribuirían a la posible existencia de péptidos intermediarios de las acciones de la progesterona y progestágenos sintéticos, entre los cuales se podrían considerar a los sistemas estudiados en el trabajo presente.

Con respecto al sistema de Factores de Crecimiento Insulina Símilés, se observó, tal como en varios sistemas tumorales estudiados (*Daughaday y col.*, 1989), la presencia de IGF-I e IGF-II de aproximadamente 7500 Da en los extractos ácidos de los adenocarcinomas mamarios testeados. En el caso del IGF-I, se encontraron valores similares en la expresión, tanto a nivel ARNm como proteico, en todas las líneas HD (provenientes de animales tratados y no tratados con MPA) y en las líneas tumorales HI. Lo contrario se observó para el IGF-II, donde los transcritos específicos y el péptido resultante, poseían un nivel significativamente mayor en los adenocarcinomas HD provenientes de ratones tratados con MPA, con valores semejantes a los observados en los tumores HI. Esta estimulación de la síntesis de IGF-II por MPA en los pasajes de los adenocarcinomas hormono-dependientes, podría ser uno de los mecanismos por los cuales la hormona induciría la capacidad proliferativa de estos tumores.

Resultados semejantes se reportaron para los Estrógenos, determinándose que el IGF-II podría ser el factor intermediario en la regulación hormonal del cancer de mama. Las razones para tal conclusión se debió a los estudios realizados en las líneas celulares de cancer de mama humanas ER+ (MCF-7, T47D), donde se comprobó que la expresión del IGF-II ARNm era regulada positivamente por Estradiol. De igual forma, en el xenograft de cancer de mama humano T61, inhibible por dicha hormona, se observó que el tratamiento con E2, disminuía significativamente la expresión de IGF-II ARNm (*Brünner y col.*, 1992), mientras que en el de MCF-7, E2-dependiente, y el de MDA-MB-231, E2-independiente, los niveles de dichos transcritos estarían estimulados o no afectados por E2. En este último sistema totalmente autónomo, el IGF-II se expresaba constitutivamente. Tal observación sería en cierta forma aplicable a nuestro sistema experimental, en donde los tumores HI poseían una velocidad de crecimiento, no modificable por tratamiento con MPA y niveles altos de IGF-II.

El estudio de expresión de los ARNm para IGFs se efectuó mediante la realización de Ensayos de protección a la Ribonucleasa A específicos. El hecho de utilizar esta técnica frente a un Ensayo de Northern Blot se debió a que la primera es 100 veces mas sensible y específica que la segunda (*Brüner y col.*, 1993). Con la técnica de Northern Blot, en ciertos casos se obtuvieron varias bandas, no representativas en su totalidad de los auténticos transcritos para IGFs (*Yee y col.*, 1989). Por lo tanto la metodología empleada en la investigación presente, nos aseguraría que tanto el IGF-I ARNm como el IGF-II ARNm detectado, serían verdaderos transcritos de estos GFs.

En varios trabajos se apoya la realización de dicha metodología. Con el uso de la misma, el grupo de Yee y col. (1989), detectaron la presencia de transcritos específicos para IGF-I en varios sistemas tumorales como también la ausencia de los mismos en líneas celulares de cancer de mama en las que se había publicado anteriormente la producción de proteínas con actividades biológicas semejantes al IGF-I (*Huff y col.*, 1986; *Minuto y col.*, 1987). Los mismos ensayos efectuados en biopsias mamarias malignas humanas y en cultivos de fibroblastos provenientes de las mismas determinaron la acción paracrina del IGF-I detectable solamente en el estroma normal asociado al tumoral (*Yee y col.*, 1989).

En el caso del IGF-II, debido a que ciertas líneas celulares de cancer de mama, biopsias mamarias malignas humanas, cultivos de fibroblastos provenientes de las mismas y varios tejidos normales poseían la capacidad de expresar IGF-II ARNm, se sugirió que este GF podría actuar tanto en forma paracrina como autocrina (*Yee y col.*, 1988; *Cullen y col.*, 1991).

En el presente estudio, los resultados obtenidos revelaron la expresión de auténticos transcritos para IGF-I e IGF-II, como también la presencia de los péptidos correspondientes, en la totalidad de la masa tumoral, sin poder dilucidar si el aporte de los mismos se debería al epitelio maligno o al estroma asociado. Por otro lado, cabe destacar también la ausencia de interferencias por tejido normal existente, basada en la ventaja del uso de adenocarcinomas mamarios en ratones. En este sistema experimental, la localización de la masa tumoral en un área circunscripta debajo de la piel, facilita el reconocimiento, la medición y la remoción *in toto* del tumor, sin tejido normal adjacente.

Los ensayos efectuados con el fin de dilucidar la presencia de sitios de unión para IGFs, revelaron la existencia de receptores IGF-R1 e IGF-R2 en las fracciones microsomales de los adenocarcinomas mamarios inducidos por MPA. Por ensayos radioligando-receptor con [<sup>125</sup>I]-IGF-I, se comprobó la existencia de sitios específicos de alta y baja afinidad para este GF, con valores de Kd de 3.4 pM y 0.13 nM ubicados aproximadamente entre los reportados en varias líneas celulares de cancer de mama (*Peyrat y col.*, 1989; *Pollak y col.*, 1988; *De Leon y col.*, 1988, *Furlanetto y col.*, 1984; *Myal y col.*, 1984; *Osborne y col.*, 1989; *Steward y col.*, 1990; *Freiss y col.*, 1990) y en fracciones microsomales de tumores primarios de mama humanos (*Pekonen y col.* 1988; *Foekens y col.* 1989).

La caracterización estructural de estos sitios de unión evidenció dos bandas en las autoradiografías correspondientes. En presencia de β-mercaptoetanol, la banda de mayor intensidad de 130 KDa, correspondía a la subunidad α del receptor de IGF-R1 mientras que el segundo tipo de componente de membrana marcado menos intensamente, apareció en una zona de 240-270 KDa, la cual se atenuó por la presencia de un exceso de IGF-I no marcado. En varios sistemas la presencia de este complejo de alto PM, ha sido atribuida a la formación de dímeros de las subunidades α del IGF-R1 o a agregaciones de dichos sitios receptores (*De Leon y col.*, 1988; *Osborne y col.*, 1989; *Stewart y col.*, 1990; *Kozak y col.*, 1987; *Mathieu y col.*, 1990; *Singh y col.*, 1991)

El estudio de la especificidad de los IGF-R1 detectados en los adenocarcinomas mamarios inducidos por MPA, confirmó una inhibición media de la unión máxima en relaciones IGF-I > IGF-II, revelando una unión privilegiada del IGF-I al IGF-R1. De igual forma a lo mencionado por varios autores se comprobó cierta interacción de la Insulina a este sitio receptor, lo que concordaría con una de las características típicas de los receptores para IGFs tipo I (*Pollak y col.*, 1988; *De Leon y col.*, 1988).

La regulación hormonal de sitios IGF-R1 ha sido estudiada especialmente para los Estrógenos dilucidándose que en aquellas líneas ER+ (MCF-7, T47D) la incubación con estradiol inducía la expresión de los mismos a nivel ARNm y proteico (*Stewart y col.*, 1990) mientras que el 4-hidroxytamoxifeno poseía un

efecto contrario (*Freiss y col.*, 1990). Por otro lado, en la línea ER-, BT-20, no existía ningún efecto en los niveles de IGF-R1 por ambos compuestos.

Con respecto a la regulación por Progesterona, *Papa y col.* (1991), confirmaron que el progestágeno R5020, en la línea celular T47D producía una disminución del contenido, biosíntesis y expresión del ARNm para IGF-R1, comprobándose que el efecto de la misma era indirecto, es decir via un aumento de secreción de IGF-II.

En el trabajo presente, los ensayos de saturación con [<sup>125</sup>I]-IGF-I, revelaron que el tratamiento con MPA de los ratones portadores de tumores HD no modificaba el nivel de los IGF-R1, encontrándose valores similares a los observados en las líneas tumorales HI. En cambio tanto a nivel ARNm como proteico, el IGF-II era específicamente inducido por MPA en los tumores hormono-dependientes, sin afectar los niveles de IGF-I. Estos resultados concordarían con lo reportado anteriormente (*Papa y col.*, 1991), pero debido a que el IGF-II en nuestros tumores experimentales posee una afinidad preferencial al sitio IGF-R2 y no al IGF-R1 (demostrado por las curvas de competencia) sería lógico pensar, con dicho argumento, que la capacidad de los sitios IGF-R1 no fuera modificada como consecuencia de un aumento del IGF-II, en los tumores HD con tratamiento hormonal.

Como se mencionó anteriormente la presencia de sitios IGF-R2 se estudió también en los adenocarcinomas mamarios inducidos por MPA. Mediante ensayos radioligando-receptor con [<sup>125</sup>I]-IGF-II, se comprobó la existencia de una gran cantidad de estos sitios receptores, demostrándose que el tratamiento con MPA de los ratones portadores de tumores HD disminuía significativamente el número total de IGF-R2, mientras que sus afinidades, con valores de Kd del orden de nM, eran similares entre las distintas líneas tumorales HD (provenientes de ratones tratados y no tratados con MPA) y HI testeadas.

La caracterización estructural de los IGF-R2 detectados, evidenció una única banda de 230 KDa, que experimentaba una leve modificación de su tamaño a 260 KDa en condiciones reductoras. Este efecto ha sido observado tanto para el EGF-R como para el IGF-R2 atribuyéndose a una ruptura de los puentes disulfuros intracatenarios en presencia del agente reductor  $\beta$ -mercaptoetanol. Es de destacar que la ausencia de complejos de 130 KDa, en presencia de concentraciones (2-3) nM de [<sup>125</sup>I]-IGF-II, indicaría una interacción preferencial de este GF a su

receptor. Esto mismo se reveló por ensayos radioligando-receptor en condiciones de competencia, comprobándose que las potencias de inhibición de la unión del IGF-II al IGF-R2 eran del orden IGF-II > IGF-I y no unía Insulina, de igual forma a lo reportado en varios sistemas estudiados (*Krywicky y col.*, 1992). Estas observaciones sugerirían que si el efecto proliferativo del MPA en los adenocarcinomas HD, se efectuase por mediación de las acciones del IGF-II, seguramente estas resultarían de su unión específica al IGF-R2. Este último proceso podría desencadenar como consecuencia, una regulación negativa del número total de los sitios IGF-R2, concordante a los resultados reportados en el trabajo presente.

El papel del IGF-R2 como mediador de los efectos mitogénicos del IGF-II es hasta el momento, un tema bastante controvertido. En varios casos se demostró que la capacidad proliferativa del IGF-II resultaría de la interacción al IGF-R1 (*Cullen y col.*, 1990), aunque también en sistemas con una cantidad predominante (*Sessions y col.*, 1987) o exclusiva de receptores tipo II (*Tally y col.*, 1987; *Blanchard y col.*, 1988) se comprobó la acción mitogénica de este GF. Varios trabajos concuerdan con la idea de que ciertas funciones del IGF-II, en las que se incluye su acción mitogénica, se efectuaría por unión específica al IGF-R2 (*Brünnner y col.*, 1993; *Rosenthal y col.*, 1994). Por otro lado, *Mathieu y col.* (1990), demostraron que tanto el IGF-II como la Cathepsina-D estimularían el crecimiento de varias líneas celulares de cancer de mama (MCF-7, T47D y MDA MB231). A bajas concentraciones de Cath D a las que no existiría ningún efecto proliferativo por la misma, la actividad mitogénica de pequeñas concentraciones de IGF-II (0.1 nM) se inhibía drásticamente y por adición de Man 6-P, que desplaza a la cath D de su sitio de unión, el efecto inhibitorio no se observaba. Por otro lado, cuando tanto la cath-D como el IGF-II (>1 nM) se adicionaban a concentraciones correspondientes a su máxima estimulación, se observaba que la primera no interfería en la proliferación inducida por el segundo. Adicionalmente se demostró que la Cathepsina D era incapáz de interferir en el efecto mitogénico producido por EGF e IGF-I en las mismas líneas celulares de cancer de mama. Todos estos resultados indicarían una cierta especificidad del IGF-II al IGF-R2 en la mediación de dichos efectos. Esto mismo se comprobó por incubación con el anticuerpo  $\alpha$ IR3, demostrándose que el mismo era incapáz de interferir en la acción mitogénica producida con 0.2 nM de IGF-II pero inhibía un 38% a la

efectuado con 2 nM de IGF-II, sugiriendo que este efecto sería parcialmente mediado por el receptor IGF-R2.

En relación con los resultados obtenidos en la presente investigación, los ensayos de estabilización covalente efectuados se realizaron en presencia de una concentración 3 nM de [<sup>125</sup>I]-IGF-II, lo cual sugeriría la existencia de sitios IGF-R2 con una afinidad preponderante para IGF-II.

En el presente estudio se demostró, en los tumores HD y HD+MPA, una relación inversa entre el nivel ARNm y proteína para IGF-II y el número de sitios IGF-R2. Este tipo de regulación sería distinta a la observada por otros mitógenos tal como Insulina, IGF-I y EGF, los cuales inducirían una rápida redistribución de sus sitios receptores hacia la superficie celular sin modular la concentración total de los mismos (*Braukle y col.*, 1990). Es de destacar la característica distintiva del IGF-R2 frente a los sitios receptores nombrados, ya que el IGF-R2 cicla continuamente entre los compartimentos internos y la membrana extracelular. De esta forma la habilidad del IGF-II o ligandos específicos en regular negativamente al IGF-R2 ocurriría a nivel transcripcional y ha sido comprobada por Mathieu y col. (1991). Estos autores demostraron una relación inversa entre la cantidad de Cath-D y la de IGF-R2 expresada a nivel ARNm y proteico, en varias líneas celulares de cancer de mama (T47D, MDA-MB231, ZR75-1, MCF-7-R, etc), en cultivos primarios de mamas normales y en la línea celular de hepatoma humano, Hep G2. En estas últimas se observó una mayor expresión del IGF-R2 ARNm y proteína asociada y un menor nivel de Cath D que en los sistemas transformados. Estos resultados sugirieron, en primer lugar, que la ocupación de los sitios IGF-R2 por una producción excesiva de cathepsina D o IGF-II, podría conducir a una subestimación del número de IGF-R2. Posteriormente esta hipótesis fue desechada con la realización de técnicas de inmunoprecipitación o Western Blot, que conducían a una disociación de los ligandos endógenos del receptor. En el trabajo presente, la obtención de fracciones microsomales de los distintos adenocarcinomas mamarios inducidos con MPA se realizó con una metodología capaz de producir la disociación de todo ligando endógeno a su receptor, a través de una homogenización inicial del tejido con un *buffer* a pH ácido. De esta forma, se contó con un material libre de interferencias de ligandos endógenos.

En relación con la regulación hormonal del IGF-R2, los experimentos realizados en el trabajo presente, demostraron que el tratamiento con MPA de los ratones portadores de tumores HD producía una disminución en el número de los sitios IGF-R2. Resultados semejantes se observaron con los Estrógenos en varias líneas celulares de cancer de mama ER+, tales como MCF-7 y T47D, donde la incubación de estas monocapas con estradiol modificaba negativamente la expresión tanto a nivel ARNm como proteico de los sitios IGF-R2 (*Mathieu y col., 1991*). Por ensayos de Northern Blot, se demostró adicionalmente, que la acción del E2 se efectuaba a nivel transcripcional y no por disminución de la vida media del IGF-R2 ARNm. Por lo tanto, debido a que el MPA en nuestro sistema experimental y el E2 en líneas celulares de cancer de mama (*Yee y col., 1988; Osborne y col., 1989*), eran capaces de inducir al ligando específico (IGF-II) del IGF-R2, no se podría descartar una acción indirecta de estos esteroides a través de la regulación de la capacidad de los sitios IGF-R2 por su propio ligando. Futuros estudios de la expresión de los transcritos para IGF-R2 en las líneas HD provenientes de animales tratados o no tratados con MPA podrían comprobar estas hipótesis.

Es de destacar que este tipo de regulación negativa entre el IGF-II y su receptor no se observó en las líneas HI, ya que los adenocarcinomas mamarios autónomos se caracterizaban por poseer un nivel alto de ambos péptidos. Esta observación sugería ser uno de los factores acoplados a un comportamiento autónomo y a una selección *in vivo* de subpoblaciones de tumores HI derivadas de las correspondientes líneas hormono-dependientes.

Con respecto a la localización tisular de los receptores para IGFs, los resultados obtenidos mediante la realización de ensayos de estabilización covalente en cultivos primarios de células epiteliales malignas o de fibroblastos, provenientes de la misma línea tumoral, confirmaron la presencia de IGF-R1 e IGF-R2 en ambas regiones tumorales, enfatizando la teoría autocrina/paracrina de los IGFs. El hecho de utilizar dicha técnica frente a la de histoautoradiografía se debía a que en esta última es mucho menos factible evitar que la proteínas transportadoras de IGFs sintetizadas endógenamente y ubicadas en la superficie celular, puedan enmascarar la unión del GF a su receptor específico (*Braukle y col., 1990*). Por lo tanto, la probabilidad de que esto ocurra con la metodología utilizada en la investigación presente, sumada al uso de fracciones microsomales lavadas totalmente libres de proteínas transportadoras, sería insignificante. Peyrat

y col. (1990a), por histoautoradiografía realizada en secciones histológicas de 20 tumores primarios de mama humana, 12 biopsias benignas de mama y 2 mamas normales, demostraron la localización del IGF-R1 en el componente epitelial. De igual forma, por hibridización *in situ* realizada en 37 tumores mamario humanos y en varios tejidos de mama normales el grupo de Zhao y col. (1993) demostraron mayor expresión de IGF-R2 en las células malignas epiteliales que en los fibroblastos asociados.

Con respecto al sistema del **Factor de Crecimiento Epidérmico**, en trabajos previos a esta tesis hemos demostrado que la sialoadenectomía, efectuada un mes antes del comienzo del tratamiento con MPA, disminuía significativamente la incidencia tumoral con respecto a la observada en animales controles no operados (31.6% vs 98.5%) (Kordon y col., 1994), sin afectar el crecimiento de las líneas tumorales ya establecidas. Resultados similares fueron reportados por Kurachi y col. (1985b) en la cepa C3H/HEN en la cual la sialoadenectomía disminuía la incidencia de tumores espontáneos de mama de un 62% a un 12%; y por Inui y col. (1989), en la cepa SHN y GR. Ambos autores atribuyeron este hecho a la falta de la acción endócrina del EGF producido por la glándula submaxilar (EGF-SG) del ratón. Dicho fenómeno podría ser una posible explicación a nuestro modelo experimental dado que el MPA aumentaba significativamente la concentración de este factor en las glándulas submaxilares (Bullock y col., 1975). De esta forma la contribución de esta glándula en la tumorigénesis por MPA podría deberse a una facilitación de la acción del mismo actuando previa y conjuntamente con la hormona sobre el epitelio mamario, y/o a un estímulo proliferativo de células transformadas. La primera afirmación sería bastante factible debido a que se sugirió que el EGF era capaz de estimular la proliferación e inhibir la diferenciación funcional de las células del epitelio mamario normal del ratón (Dembinski y Shiu, 1987; Daniel y Silberstein, 1987; Tonelli y col., 1980), de forma tal que estas modificaciones en el desarrollo de la mama podrían alterar la acción del progestágeno sobre la misma. En los animales sialoadenectomizados tratados con MPA se observó una disminución de la cantidad de ductos y de la población general de células mamarias, en comparación con los animales controles.



Por otro lado, Perheentupa y col. (1984), reportaron que el EGF-SG no contribuía significativamente a los niveles plasmáticos de EGF, por lo tanto sería imposible considerar cierta regulación del crecimiento de órganos distantes por este GF. En la investigación presente, se demostró que el aumento significativo de los niveles de EGF-SG por tratamiento con MPA era seguido por una inducción paralela en el EGF sérico (EGF-S). Este aumento en EGF-S fue observado a las 3-4 semanas del comienzo del tratamiento con MPA. Una explicación a este fenómeno sería atribuida a que el tratamiento continuo con MPA podría sobrepasar los mecanismos de control de la síntesis y secreción del EGF por la glándula submaxilar. En condiciones normales, la mayor cantidad de EGF sintetizada por la glándula submaxilar es excretada en la saliva y debido a que las acciones del EGF son producidas en forma local o parácrina, se postuló que su síntesis y eliminación a la circulación serían mecanismos bastantes controlados o aún inhibidos. Por lo tanto, un estímulo anormal y continuo, tal como el del MPA, podría ser uno de los factores desencadenantes para traspasar estos mecanismos de control. Este aumento de EGF-SG detectado por tratamiento con MPA, no parecería tener una acción importante en el crecimiento tumoral ya que la velocidad proliferativa de las líneas tumorales establecidas de nuestro modelo experimental, con histología lobulillar (EGF-R positivos) o histología ductal (EGF-R negativos), no parecía modificarse por sialoadenectomía. De esta forma los resultados presentes sugerirían que el EGF sería unos de los factores con un papel importante en la inducción de adenocarcinomas mamarios por MPA en ratones BALB/c sin poder descartar la intervención de otros factores sintetizados por la glándulas submaxilares, como por ejemplo el factor de crecimiento nervioso (NGF) (Cohen, 1960).

Adicionalmente, Inagawa y col. (1985), demostraron que el MPA actuaba sinérgicamente con el EGF en la inducción de la proliferación celular en la glándula mamaria *in vitro*. Por otro lado, se demostró en células uterinas fetales, que el EGF aumentaba indirectamente el número de receptores para progesterona, efecto tal vez importante en nuestro modelo experimental (Sumida y col., 1988).

La acción del MPA en el sistema del EGF se demostró también en la línea celular de cancer de mama T47D, observándose un aumento del EGF ARNm y del EGF-R luego del tratamiento con el progestágeno. Estos resultados fueron de

difícil interpretación ya que en la línea celular T47D, el EGF estimulaba la proliferación celular mientras que el MPA la inhibía (*Murphy y col.*, 1988a y b).

Por otro lado, debido a que los tumores inducidos por MPA en los ratones sialoadenectomizados eran muy similares a los desarrollados en los animales controles en cuanto a la latencia de aparición, a sus características histológicas y a la sensibilidad hormonal de los pasajes, sería muy probable que la ausencia de factores sintetizados por las glándulas salivares no modificasen sustancialmente los mecanismos de acción del MPA en sus células *blanco*.

En el presente trabajo también se estudió la presencia de sitios EGF-R en 5 líneas tumorales HD y 5 líneas tumorales HI con histología ductal, y 8 líneas tumorales autónomas con histología lobulillar, encontrándose niveles apreciables de EGF-R en estos últimos. Los adenocarcinomas mamarios lobulillares poseían niveles indetectables de ER y PR mientras que los restantes conservaban cantidades altas o variables, respectivamente, de dichos sitios receptores. Estos resultados sugerirían una asociación directa entre la presencia del EGF-R y el crecimiento hormono-independiente tal como fue descrito en tumores mamarios humanos (*Fitzpatrick y col.*, 1984a y b; *Klijn y col.*, 1992). Por otro lado, con respecto a la histología tumoral, en las neoplasias malignas mamarias humanas se observaron los mayores niveles de EGF-R en los tumores con histología ductal, con respecto a los de histología lobulillar (*Skoog y col.*, 1986; *Sainsbury y col.*, 1988), mientras que otros grupos no encontraron diferencias significativas entre los dos tipos tumorales detallados (*Wrba y col.*, 1988; *Toi y col.*, 1990).

Adicionalmente, podría ser factible en los adenocarcinomas mamarios estudiados, que la presencia de altos niveles endógenos de ligandos específicos estarían regulando la transcripción de los EGF-R (*Carpenter y col.*, 1979). Esta idea quedaría totalmente descartada debido a que en los extractos tumorales no se detectaron niveles apreciables de EGF ni TGF- $\alpha$ .

Spitzer y col. (1987), demostraron la existencia de una correlación directa entre el índice mitótico y el nivel de EGF-R. Estos resultados contrastarían con los reportados en la investigación presente, ya que no se observó relación alguna entre las velocidades de crecimiento tumoral y el contenido de EGF-R. Por otro lado, se podría sugerir que el aumento de EGF-SG por MPA influiría en el

crecimiento de las líneas tumorales establecidas de nuestro modelo experimental. Mediante el estudio del efecto de la sialoadenectomía en la velocidad proliferativa de varias líneas HD y HI (lobulillares o ductales), se comprobó que la extirpación de las glándulas submaxilares no influía sobre la proliferación de las líneas tumorales, a pesar de que los adenocarcinomas con histología lobulillar presentaran EGF-R y los de histología ductal carecieran de los mismos. Tampoco era factible de que en estos últimos existiera una regulación negativa de los EGF-R por el aumento del EGF-SG, ya que los adenocarcinomas ductales sin tratamiento hormonal tampoco presentaban niveles detectables de EGF-R.

Con respecto al sistema de los Factores de Transformación tipo  $\beta$ , se demostró que los transcritos para TGF- $\beta$ 1 podían ser regulados *in vivo*, por tratamiento con MPA, en los adenocarcinomas mamarios HD. Tal es así que, niveles menores de TGF- $\beta$ 1 ARNm se observaron en las líneas tumorales HD+MPA que en las correspondientes sin tratamiento hormonal (HD). Considerando la velocidad de crecimiento de cada una de las líneas tumorales ensayadas, se comprobó una correlación inversa este parámetro y los niveles de TGF- $\beta$ 1 ARNm ( $p < 0.01$ , test de Fisher). Por otro lado, en los tumores con comportamiento hormono-independiente no se detectaron cantidades apreciables de estos transcritos, lo cual sugeriría que la falta de producción de TGF- $\beta$ 1 podría estar involucrada en la determinación de sus comportamientos autónomos.

La regulación de los niveles de TGF- $\beta$ 1 ARNm por Progesterona ha sido reportada en la línea celular de cancer de mama T47D (*Murphy y col., 1989*). En las monocapas T47D se comprobó un efecto inhibitorio en la proliferación y en la expresión de TGF- $\beta$ 1 ARNm en presencia de 10 nM de MPA. Recientemente, debido a los nuevos hallazgos en la estimulación por Progesterona del crecimiento de varias líneas celulares de cancer de mama humanas, se planteó la necesidad de una reinterpretación de los resultados obtenidos (*Clarke y col., 1990*). En forma contraria, Knabbe y col. (1987), demostraron una correlación directa entre la secreción de TGF- $\beta$ 1 y el grado de proliferación celular en las líneas celulares de cancer de mama humanas con comportamiento hormono-dependiente. En la línea celular ER+, MCF-7, la incubación con dosis inhibitorias de antiestrógenos producía un aumento en la secreción de TGF- $\beta$ 1 sin afectar los niveles del

TGF- $\beta$ 1 ARNm. Recientemente Coletta y col. (1991), reportaron que el progestágeno Gestodeno, con actividad inhibitoria del crecimiento celular, inducía un aumento apreciable en la secreción de TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 2, en varias líneas celulares de cancer de mama. Por otro lado, se demostró, que el progestágeno Norethindrona producía un aumento en la proliferación celular de la línea celular MCF-7, inversamente correlacionado con los niveles de TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3 ARNm (*Jeng y col., 1991*). La regulación negativa de los niveles de estos transcritos por Estradiol, en la líneas celulares de cancer de mama humanas, ha sido también reportada por Arryck y col. (1990).

En el presente trabajo, los resultados obtenidos concordarían con los reportados a nivel proteico por Elizalde y col. (1990) en el mismo sistema experimental. En la línea 1 HD, se demostró la presencia de un péptido semejante al TGF- $\beta$  con tamaño de 43 KDa, con actividad transformante en monocapas NRK-49F, en ausencia de EGF. En presencia de EGF, la actividad del TGF- $\beta$  se potenciaba y el tratamiento con MPA de los tumores HD, decrecía en dos veces el nivel de TGF- $\beta$ . Esta especie de TGF- $\beta$  de 43 KDa no era detectada en los adenocarcinomas mamarios HI. Otra especie de 13 KDa con actividad transformante, solamente en presencia de EGF, se detectó en las tres líneas tumorales cuyos niveles no eran regulados por MPA. Debido a los métodos utilizados sería muy factible que las dos especies TGF- $\beta$  detectadas, estuviesen compuestas por mas de un subtipo de TGF- $\beta$ , los cuales eluirían conjuntamente en la cromatografía por columnas de Bio gel P-60. De esta forma, se podría explicar que a pesar de que el tratamiento con MPA inhibía completamente la expresión de TGF- $\beta$ 1 ARNm, no bloquearía totalmente la expresión de los demás TGF- $\beta$ s a nivel proteico. Así el MPA, podría no afectar la expresión del TGF- $\beta$ 2 y/o TGF- $\beta$ 3 en los adenocarcinomas mamarios de nuestro modelo experimental.

Con respecto a los resultados presentados anteriormente se observó que la capacidad de los sitios IGF-R2 disminuía significativamente en los adenocarcinomas mamarios HD provenientes de ratones tratados con MPA. De igual forma, se describió un efecto inhibitorio del progestágeno en los niveles de TGF- $\beta$ 1 ARNm en las líneas tumorales HD, como en el péptido de 43 KDa con actividad transformante testada en monocapas NRK-49F (*Elizalde y col., 1990*). A pesar de que el efecto del MPA se producía también a nivel del ARNm para

TGF- $\beta$ 1, es de destacar la importancia de la existencia de una disminución en la actividad biológica del respectivo péptido. Esto último reflejaría la existencia, en los adenocarcinomas mamarios de modelo experimental estudiado, de la maquinaria suficiente para la activación del péptido TGF- $\beta$  latente. Wakefield y col. (1987), demostraron en las células A549 de carcinoma de pulmón humano, que la falta de la respuesta de las mismas al TGF- $\beta$  se basaba en la carencia de mecanismos de activación para este TGF. Con respecto a esto, Dennis y col. (1991), demostraron la intervención del Man 6-P/IGF-II R en la activación de otros factores de crecimiento en los que se incluía al TGF- $\beta$ 1, una molécula de especial interés en la inhibición de la proliferación de las células epiteliales. Por lo tanto, se podría hipotetizar que en los tumores HD sin tratamiento hormonal, el mayor número de sitios IGF-R2 podría estar asociado con un incremento en la producción de la forma madura del TGF- $\beta$  y por lo tanto con un mayor control negativo de la proliferación tumoral.

En el trabajo presente también se demostró la existencia de receptores específicos para TGF- $\beta$ 1 en los cultivos primarios enriquecidos en células epiteliales de los adenocarcinomas mamarios HD inducidos por MPA. Por ensayos de estabilización covalente por incubaciones con [ $^{125}$ I]-TGF- $\beta$ 1, se detectó la presencia de los tres tipos de receptores, el de clase I de 66 KDa, el de clase II de 90 KDa y el de clase III de 215 KDa, de tamaños semejantes a los reportados en varios sistemas estudiados (*Cheifetz y col.*, 1986; *Massagué*, 1992). El grupo de Arteaga y col. (1988) demostraron la existencia de receptores para TGF- $\beta$ 1 y de un efecto inhibitorio de la proliferación celular de este TGF, en las líneas de cancer de mama ER- y no en las ER+. Estos resultados contrastarían con los presentados en el trabajo presente, en donde observamos una inhibición de la expresión del TGF- $\beta$ 1 ARNm y un aumento del crecimiento tumoral por MPA, en los adenocarcinomas mamarios ER+ (HD).

Con respecto al TGF- $\alpha$ , mediante ensayos de Northern Blot no se detectaron niveles apreciables del transcripto de 4.8 Kb para este TGF, tanto en las líneas HD como en las HI de nuestro modelo experimental. Estos resultados, acoplados a la falta de producción de EGF, haría suponer una ausencia de las acciones autocrinas/paracrinas de estos péptidos en los adenocarcinomas mamarios inducidos por MPA, en forma contraria a lo reportado en varios sistemas de cancer de mama (*Clarke y col.*, 1989; *Dickson y col.*, 1986b; *Valerius y col.*, 1989;

*Derynck y col., 1987; Bates y col., 1988; Salomon y col., 1987; Liu y col., 1987; Ciardiello y col., 1989)*

La presencia de los componentes del Sistema Renina-Angiotensina, se estudió mediante la realización de ensayos de Autoradiografía cuantitativa *in vitro* en cortes histológicos de los adenocarcinomas mamarios inducidos por MPA. La ventaja de la utilización de esta técnica frente a un ensayo radioligando receptor se debe a que la misma permite la cuantificación y localización simultáneamente de los sitios receptores. Por otro lado, una de las desventajas de esta técnica, es que su límite de detección delimita la obtención precisa de la ubicación de los sitios en un dado tipo celular de la masa tumoral.

Los resultados presentados en este trabajo, demostraron la existencia de receptores para Ang II (Ang II-R) del subtipo AT1 en los adenocarcinomas mamarios ductales de nuestro modelo experimental. Tanto los tumores ductales con comportamiento hormono-dependiente como los autónomos, mostraron niveles significativamente mayores de sitios AT1 con respecto a los adenocarcinomas mamarios de origen lobulillar. Estos receptores se localizaban principalmente en la masa epitelial maligna y no mostraban ser modulados por MPA. Por otro lado, en los tumores mamarios de origen lobulillar se detectaron cantidades muy pequeñas de receptores AT1, existiendo adicionalmente sitios AT2 localizados en el tejido conectivo periférico.

En el presente trabajo también se estudió la presencia de la Enzima Convertidora de Angiotensina (ACE). Tanto los adenocarcinomas ductales HD como los HI, mostraron niveles significativamente mayores de ACE con respecto a los detectados en los tumores de origen lobulillar. En ambos casos la expresión de ACE reflejaba la misma localización y cantidad relativa que los Ang II-R, sugiriendo una formación local de Ang II dentro de la misma masa tumoral.

Por otro lado, los mismos ensayos realizados en cortes histológicos de mamas normales de ratones hembras lactantes, revelaron la ausencia de expresión de Ang II-R y de ACE, sugiriendo que los fenómenos observados en los

adenocarcinomas mamarios inducidos por MPA estarían relacionados con la naturaleza o estado tumoral.

En conclusión, los resultados presentados, demostrarían una cierta relación entre la histogénesis tumoral y la distribución y número de sitios receptores para Ang II como de ACE.

Distintas funciones relacionadas con el crecimiento (*Smith y col.*, 1992; *Scheling y col.*, 1991), organogénesis (*Vismawanathan y col.*, 1992) y carcinogénesis (*Pfeilschifter y col.*, 1990; *Chen y col.*, 1991; *Ariza y col.*, 1988) han sido atribuidas para la Ang II. La presencia sistemas Renina-Angiotensina locales, se determinó en algunas células de neuroblastomas, demostrándose una inhibición de sus crecimientos por inhibidores de ACE (*Chen y col.*, 1991). Por otro lado, en glioblastomas multiformes como en otros tumores con un alto grado de vascularización, se demostró la presencia de otra enzima encargada de la formación de Ang II: Renina (*Ariza y col.*, 1988), sugiriéndose una cierta intervención de la Ang II en la estimulación de la vascularización tumoral. Adicionalmente, los trabajos de Kerr y col. (1992), demostraron que la Ang II aumentaba selectivamente el flujo sanguíneo tumoral, mientras que Schelling y col. (1991) comprobaron que el tratamiento de las ratas implantadas con adenocarcinomas, con inhibidores de la ACE, aumentaba la supervivencia de dichos animales. Todos estos resultados indicarían cierta intervención de los componentes del SRA, en la proliferación y el grado de vascularización tumoral sugiriendo la aparición de nuevas terapias en el control de enfermedades asociadas a sistemas intrínsecos generadores de Angiotensina II y/o de Ang II-R. Tal es el caso de los adenocarcinomas mamarios ductales de nuestro sistema experimental. Futuros estudios con inhibidores de ACE o agonistas de Ang II-R podrán comprobar dichas hipótesis.

Los resultados presentados a cerca de una localización de Ang II-R y de ACE en las mismas áreas tumorales sugerirían la existencia de una función autocrina/paracrina desconocida de la Ang II en los adenocarcinomas mamarios de nuestro modelo experimental, siendo la primera demostración de una expresión diferencial de los componentes del SRA en tumores mamarios de origen ductal o lobulillar.

## **CONCLUSIONES GENERALES:**

El presente estudio se realizó con el fin de dilucidar el papel de algunos factores de crecimiento y transformación en la inducción y proliferación tumoral producida por progestágenos. Se utilizó un modelo experimental *in vivo* compuesto por adenocarcinomas mamarios inducidos por el progestágeno MPA, en hembras vírgenes BALB/c.

Los resultados presentados en la investigación presente demostraron que el tratamiento con MPA de ratones hembras BALB/c, inducía un aumento significativo en los niveles séricos de EGF. Las glándulas submaxilares parecerían contribuir primordialmente al aumento del EGF-S por MPA, ya que este efecto se prevendría por sialoadenectomía de los animales. El EGF sintetizado por la glándula submaxilar (EGF-SG) parecería tener un papel fundamental en la incidencia tumoral por MPA, probablemente favoreciendo la expansión de las células blanco para este progestágeno, en la glándula mamaria. De esta forma, la inducción de carcinomas de mama por MPA se efectuaría por su acción directa sobre el tejido mamario y por estimulación de la síntesis del EGF-SG.

En las líneas tumorales ya establecidas se demostró que los tumores con histología lobulillar estaban asociados a un comportamiento autónomo, bajos niveles o indetectables de ER y PR y altos de EGF-R, mientras que los de histología ductal a bajos niveles de EGF-R y altos de ER y PR.

Se demostró que los adenocarcinomas mamarios no expresaban TGF- $\alpha$  ARNm como tampoco presentaban cantidades detectables del péptido EGF.

Se observó que el IGF-II, tanto a nivel ARNm como proteico, era regulado positivamente por MPA en aquellos adenocarcinomas mamarios dependientes de MPA (HD). En estas líneas tumorales existía una relación inversa entre el contenido de IGF-R2 y su ligando, y el tratamiento con MPA de los ratones portadores de tumores HD, producía una disminución significativa de la capacidad



de los sitios IGF-R2 sin afectar sus afinidades por IGF-II. Por otro lado, en aquellos casos de líneas tumorales con crecimiento autónomo (HI), tanto los niveles de IGF-II como de IGF-R2 eran elevados. El receptor IGF-R2 detectado en los adenocarcinomas mamarios inducidos por MPA, unía preferentemente IGF-II.

La presencia del IGF-I e IGF-R1 en los adenocarcinomas mamarios, sería otro de los sistemas encargados de determinar el crecimiento autónomo de las células neoplásicas integrantes de los tumores experimentales estudiados. Adicionalmente, no se comprobó, la unión del IGF-II a los receptores IGF-R1. Todas estas observaciones permitirían hipotetizar una cierta intervención del sistema IGF-II/IGF-R2 como uno de los intermediarios de la acción proliferativa del MPA.

Adicionalmente se observó, que los niveles de TGF- $\beta$ 1 ARNm eran regulados negativamente, en los tumores HD provenientes de animales tratados con MPA. Por otro lado, en los tumores HI existía una inhibición total de la expresión de TGF- $\beta$ 1. Estos resultados comprobarían una correlación inversa entre la velocidad de crecimiento tumoral y los niveles de TGF- $\beta$ 1 ARNm. Se comprobó la presencia de receptores para TGF- $\beta$  de clase I, II y III, en los cultivos primarios de células epiteliales de los adenocarcinomas HD

En general, los resultados presentados en la investigación presente apoyarían la idea de que el efecto proliferativo *in vivo* del MPA, estaría acoplado a la modulación de al menos dos familias de polipéptidos; Es decir, a un aumento de la síntesis de un factor mitogénico, el IGF-II y a la disminución de la expresión de un factor inhibitorio de la proliferación celular, el TGF- $\beta$ 1.

Con el fin de ampliar el espectro de los sistemas involucrados en la regulación del cancer de mama, se determinó la presencia de varios componentes del sistema Renina-Angiotensina en los adenocarcinomas mamarios inducidos por MPA. Mayores niveles de Ang II-R del subtipo AT1 se detectaron en los adenocarcinomas mamarios ductales, frente a los de histología lobulillar. Los sitios AT1 se localizaron en la masa epitelial maligna de los tumores mamarios ductales. En los adenocarcinomas lobulillares se encontraron pequeños niveles de Ang II-R del subtipo AT2, localizados en el tejido conectivo periférico. Resultados

semejantes se obtuvieron en cuanto a la cuantificación y localización de ACE. Las glándulas mamarias normales no expresaban niveles detectables de Ang II-R ni ACE.

Estos resultados permitirían hipotetizar una supuesta intervención de nuevos péptidos, con funciones normalmente conocidas en campos no tan relacionados al cancer de mama, en la adquisición y/o mantención de un fenotipo maligno, enfatizando la idea de que el crecimiento autónomo de los sistemas transformados sería el resultado de la suma de desregulaciones conjuntas o consecutivas, de una variedad ilimitada de polipéptidos. De esta forma, una mejor interpretación de los sistemas intervinientes sería de suma importancia en la obtención de futuras terapias para la prevención y control del cancer de mama.

## *BIBLIOGRAFÍA*

- Aaronson ST. Growth factors and cancer. *Science* 254: 1146-1152, 1991.
- Acquaviva AM, Bruni CB, Nissley SP, Rechler MM. Cell-free synthesis of fat insulin-like growth factor II. *Diabetes* 31: 656-658, 1982.
- Anzano MA, Roberts AB, Smith MJ, Sporn MB, De Larco JE. Sarcoma growth factor from conditioned medium of virally transformed cells is composed of both type  $\alpha$  and  $\beta$  transforming growth factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 80:6264-6268, 1983.
- Anzano MA, Roberts AB, De Larco JE, Wakefield LM, Assoinan RK, Roche N, Smith JM, Lazarus JE, Sporn MB. Increased secretion of type  $\beta$  transforming growth factor accompanies viral transformation of cells. *Mol. Cell. Bio.* 5:242-247, 1985.
- Ariza A, Fernandez LA, Inagami T, Kim JH, Manuelidis EE: Renin in Glioblastoma Multiforme and its role in Neovascularization. *A.J.C.P.*, 90:437-441, 1988.
- Arryck BA, Korc M, Derynk R. Differential regulation of expression of three transforming growth factor- $\beta$  species in human breast cancer cell lines by estradiol. *Cancer Res.* 50:299-303, 1990.
- Arteaga CL, Tandom AK, Von Hoff DD, Osborne CK. Transforming growth factor  $\beta$ : Potencial autocrine growth inhibitor of Estrogen-negative Human Breast Cancer cells. *Cancer Res.* 48:3898-3904, 1988.
- Arteaga CL, Osborne CK, Growth inhibition of human breast cancer cells *in vitro* with an antibody against the type I somatomedin receptor. *Cancer Res.* 49:6237-6241, 1989a.
- Arteaga CL, Kitten LJ, Coronado EB, Jacobs S, Kull FC, Allred DC, Osborne CK. Blockade of the type I somatomedin receptor inhibits growth of human breast cancer cells in athymic mice. *J. Clin. Invest.* 84:1418-1423, 1989b.
- Ashmed ST, Manni A, Gray G. Hormonal regulation and characterization of radioimmunoassayable insulin-like growth factor I activity secreted by human breast cancer cells. *Proc. AACR* 30:A1162, 1989.

- Assoian RK, Komoriya A, Meyers CA, Miller DM, Sporn MB. Transforming growth factor-beta in human platelets. *J. Biol. Chem.* 258:7155-7160, 1983.
- Baird A, Durkin T. Inhibition of endothelial cell proliferation by type-beta transforming growth factor: interactions with acidic y basic fibroblast growth factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 138:476-482, 1986.
- Barenton B, Pate B, Kate MM, Guyda HJ, Posner BI. Insulin-like growth factor-binding proteins in hypophysectomized rat liver: characterization and subcellular localization. *Endocrinology* 122:2499-2507, 1988.
- Bates SE, McManaway ME, Lippman ME, Dickson RB. Characterization of estrogen responsive transforming activity in human breast cancer cell lines. *Cancer Res.* 46:1707-1713, 1986.
- Bates SB, Davidson NE, Valverius EM, Freter CE, Dickson RB, Tam JP, Kudlow JE, Lippman ME, Salomon DS. Expression of transforming growth factor  $\alpha$  and its messenger RNA in human breast cancer: its regulation by estrogen and its possible functional significance. *Mol. Endocrinol.* 2:543-555, 1988.
- Bayne ML, Applebaum J, Chicchi GG, Hayes NS, Green BG, Cascieri MA. Structural analogs of human insulin-like growth factor I with reduced affinity for serum binding proteins and type 2 insulin-like growth factor receptor. *J. Biol. Chem.* 263:6233-6239, 1988.
- Beardmore JM, Lewis Jones DI, Richards RC. Urogastrone and lactose concentrations in pre colostrum, colostrum and milk, *Pediatr. Res.* 17:825, 1983.
- Beatson GT. On the treatment of inoperable cases of carcinoma of the mamma. Suggestions for a new method of treatment with illustrative cases. *Lancet* ii, 104-107, 1896.
- Bell GI, Merryweather JP, Sanchez-Pescador R, Stempien MM, Priestley L, Scatt J, Rall RB. Sequence of a cDNA clone encoding human preproinsulin-like growth factor II. *Nature* 310: 775-777, 1984.
- Bell GI, Fong NM, Stempie NM, Wormsted MA, Caput D, Ku L, Urdea MS, Rall LB, Sanchez-Pescador R. Human epidermal growth factor precursor: cDNA sequence, expression in vitro and gene organization. *Nucleic Acids Res.* 14:8427-8446, 1986.

- Berns EMJJ, Klijn JGN, Van Stavaren IL, Portengen H, Foekens JA. Sporadic amplification of the insulin-like growth factor I receptor gene in human breast tumors. *Cancer Res.* 52:1036-1039, 1992.
- Blanchard MM, Barenton B, Sullivan A, Foster B, Guyda HJ, Posner BI. Characterization of the Insulin-like growth factor (IGF) receptor in K562 erythroleukemia cells. Evidence for a biological function for the type II IGF receptor. *Mol. Cell. Endocrinol.* 56:235-244, 1988.
- Bonnetterre J, Peyrat JP, Beuscart R, Demaille A. Prognostic significance of Insulin-like growth factor I receptors in human breast cancer. *Cancer Res.* 50:6931-6935, 1990.
- Bradshaw RA. The control of cell growth: The role of polypeptide growth factors and oncogene products. *Oncogenes and growth factors.* RA Bradshaw, S Prentis (eds). Elsevier Science Publishers, pop XI-XVI, 1987.
- Braukle T, Tippmer S, Chao HJ, Von Figura K. Insulin-like growth factors I and II stimulate endocytosis but do not affect sorting of lysosomal enzymes in human fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 265:6650-6665, 1990.
- Bringman TS, Lindquist PB, Berynck R. Different transforming growth factor  $\alpha$  species are derived from a glycosylated and palmitoylated transmembrane precursor. *Cell* 48:429-440, 1987.
- Brown AL, Graham DE, Nissley SP, Hill DJ, Strain AJ, Rechler MM. Developmental regulation of insulin-like growth factor II mRNA in different rat tissues. *J. Biol. Chem* 261: 13144-13150, 1986.
- Brown CF, Teng CT, Pentecost BT, DiAugustine RP. Epidermal growth factor precursor in mouse lactating mammary alveolar cells. *Molecular Endocrinol.* 3:1077, 1989.
- Brünner N, Zugmaier G, Bano M y col., Endocrine therapy of human breast cancer cells. the role of secreted polypeptide growth factors. *Cancer Cells* 1:81-86, 1989.
- Brünner N, Mosr C, Clarke R, Cullen K. IGF-I and IGF-II expression in human reast cancer xenografts: Relantioship to hormone independence. *Breast Cancer Res. Treat.* 22:39-45, 1992.

- Brüner N, Yee D, Kern FG, Spang-Thomsen M, Lippman M, Cullen K. Effect of endocrine therapy on growth of T61 human breast cancer xenografts is directly correlated to a specific down regulation of Insulin like growth factor II (IGF-II). *Eur. J. Cancer* 29A:562-569, 1993.
- Bullock LP, Barthe TH, Mawzowicz I, North A, Bardin CW. The effect of progestin on submaxillary gland epidermal growth factor: Demonstration of androgenic, synandrogenic and anti-androgenic actions. *Endocrinology* 97:189, 1975.
- Bumpus FM, Pucell AG, Daud AI, Husain A. Angiotensin II: an intraovarian regulatory peptide. *Am. J. Med. Sci.* 295, 406-408:1988.
- Byyny RL, Orth DN, Cohen S. Radioimmunoassay of epidermal growth factor. *Endocrinology* 90:1261, 1972.
- 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* 40:718-725, 1980.
- Calvo JC, Radichella JP, Charreau EH. Measurement of specific radioactivities in labelled hormones by self-displacement analysis. *Biochem J.* 212:259-264, 1983.
- Campbell JH, Tachas G, Black MJ, Cockerill G, Campbell GR: *Molecular Biology of vascular hypertrophy.* Basic. Res. Cardiol. 86 (Suppl.1):3-11, 1991.
- Campio L, Robustelli Della Cuna G, Taylor RW (eds). *Role of medroxyprogesterone in Endocrine-related tumors, Vol 2,* Raven Press, New York, 1983.
- Canfield W, Kornfeld S. The chicken liver cation-independent mannose-6-phosphate receptor lacks the high affinity binding site for Insulin-like growth factor II. *J. Biol. Chem.* 264:7100-7103, 1989.
- Cappeletti V, Brivia M, Miodini P, Granata G, Coradini D, Di Fronzo G. Simultaneous estimation of epidermal growth factor receptors and steroid receptors in a series of 136 resectable primary breast tumors. *Tumor Biol.* 9:200-211, 1988.
- Carpenter G, Cohen S. Epidermal growth factor. *Ann. Rev. Biochem.* 48:193-216, 1979.

- Carpenter G. Epidermal growth factor is a major growth promoting agent in human milk. *Science* 210:198, 1980.
- Carpenter G. Epidermal growth factor. En: Baserga R (ed). *Tissue growth factors* Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 89-132 (Handbook of experimental pharmacology, vol 57), 1981.
- Carpenter G. Receptors for epidermal growth factor and other polypeptide mitogens. *Annu. Rev. Biochem.* 56:881-894, 1987.
- Chan CP, McNall SJ, Krebs EG, Fisher EH. Stimulation of protein phosphatase activity by insulin and growth factors in 3T3 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85:6257-6261, 1988.
- Cheifetz S, Like B, Massagué J. Cellular distribution of type I and type II receptors for transforming growth factor  $\beta$ . *J. Biol. Chem.* 261:9972-9978, 1986.
- Cheifetz S, Weatherbee JA, Tsang MLS, Anderson JK, Mole JE, Lucas R, Massagué J. The transforming growth factor-beta system. a complex pattern of cross-reactive liganda and receptors. *Cell* 48:409-415, 1987.
- Cheifetz S, Andres JL, Massagué J. The transforming growth factor  $\beta$  receptor type III is a membrane proteoglycan. *J. Biol. Chem.* 263:16984-16991, 1988a.
- Cheifetz S, Bassols A, Stanley K, Ohta M, Greenberger J, Massagué J. Heterodimeric transforming growth factor  $\beta$ . Biological properties and interaction with three types of cell surface receptors. *J. Biol. Chem* 263:10783-10789, 1988b.
- Chen L, Re RN, Prakash O, Mondal D. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 196:280-283, 1991.
- Chernausk SD, Jacobs S, Van Wyk JJ. Structural similarities between human receptors for somatomedin C and insulin: Analysis by affinity labeling. *Biochem.* 20:7345-7350, 1981.
- Chinkerns M. Isolation and characterization of mink lung epithelial cell mutants resistant to transforming growth factor- $\beta$ . *J. Cell. Physiol.* 130:1-5, 1987.



- Chomczynski P. y Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, 162:156-159, 1987.
- Ciardello K, Kim N, Liscia DS, y col. mRNA expression of transforming growth factor alpha in human breast carcinomas and its activity in effusions of breast cancer patients. *J. Natl. Cancer Inst.* 81:1165-1171, 1989.
- Clairmont K, Czeck M. Chicken and xenopus mannose-6-phosphate receptors fail to bind insulin-like growth factor II. *J. Biol. Chem.* 264:16390-16392, 1989.
- Clarke R, Brunner N, Katz D y col. The effects of a constitutive expression of transforming growth factor- $\alpha$  on the growth of MCF-7 human breast cancer cells in vitro and in vivo. *Mol Endocrinol.* 3:372-380, 1989.
- Clarke CL, Sutherland RL. Progesterin regulation of cellular proliferation. *Endoc. Rev.* 11: 266-301, 1990.
- Clemmons DR, Elgin RG, Han VK, Casella SJ, D'Ercole AJ, Van Wyk JJ. Cultured fibroblast monolayers secrete a protein that alters the cellular binding of Somatomedin-C/Insulin-like growth factor I. *J. Clin. Invest.* 77:1548-1556, 1986.
- Coffey RJ Jr, Derynck R, Wilcox JN, Bringman TS, Goustin AS, Moses HL, Pittelkow MR. Production and autoinduction of transforming growth factor  $\alpha$  in human keratinocytes. *Nature* 328:817-820, 1987.
- 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.
- Cohen S, Carpenter, King L Jr. Epidermal growth factor-receptor-kinase interactions. Co-purification of receptor and epidermal growth factor-enhanced phosphorylation activity. *J. Biol. Chem.* 255:4834-4842, 1980.
- Cohen S, Ushiro H, Stoscheck C, Chinkers M. A native 170000 epidermal growth factor receptor-kinase complex from shed plasma membrane vesicles. *J. Biol. Chem.* 257:1523-1531, 1982a.

- Cohen S, Fava R, Sawyer ST. Purification and characterization epidermal growth factor receptor-kinase from normal mouse liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 79:6237-6241, 1982b.
- Cole MP, Jones CTA, Todd IDH. A new anti-oestrogen agent in late breast cancer: an early clinical appraisal of ICI 146474. *British Journal of Cancer* 25: 270-275, 1971.
- Colletta AA, Wakefield LM, Howell FV, Danielpour D, Baum M, Sporn M. The growth inhibition of human breast cancer cells by a novel synthetic progestin involves the induction of transforming growth factor beta. *J. Clin. Invest.* 87:277-283, 1991.
- Connannon P, Altszuler N, Hampshire J, Butjer WR, Hansel W. Growth hormone, prolactin and cortisol in dogs developing mammary nodules and acromegaly-like appearance during treatment with medroxyprogesterone acetate. *Endocrinology* 106:1173, 1980.
- Connolly JM, Rose DP. Epidermal growth factor-like proteins in breast fluids and human milk. *Life Sci.* 42:1751, 1988.
- Cortés Funes H, Madrigal PL, Perez Mangas G, Mendiola C. Medroxyprogesterone acetate at two different high doses for the treatment of advanced breast cancer; en Campio L, Robustelli Della Cuna G y Taylor RW (Eds.), *Role of Medroxyprogesterone in Endocrine-Related tumors, Vol 2*, Raven Press, New York, 1983.
- Corvera S, Czech MP. Mechanism of insulin action on membrane protein recycling: a selective decrease in the phosphorylation state of insulin-like growth factor II receptors in cell surface membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:7314-7318, 1985.
- Cullen KJ, Yee D, Sly WS, Perdue J, Hampton B, Lippman ME, Rosen N. Insulin-like growth factor receptor expression and function in human breast cancer. *Cancer Res.* 50:48-53, 1990.
- Cullen KJ, Smith HS, Hill S, Rosen N, Lippman ME. Growth factor mRNA expression by human breast fibroblasts from benign and malignant tissues. *Cancer Res.* 51:4978-4985, 1991.

- Cullen KJ, Lippman ME, Chow D, Hill S, Rosen N, Zwiebel J. IGF-II overexpression in MCF-7 cells induces phenotypic changes associated with malignant progression. *Mol. Endocrinol.* 6:91-100, 1992.
- Dahms NM, Lobel P, Kornfeld S. Mannose 6-phosphate receptors and lysosomal enzyme targeting. *J. Biol. Chem.* 264:12115-12118, 1989.
- Danguy A, Legros N, Devleeschouwer N, Heuson-Stennon JA, Heuson JC. Effects of medroxyprogesterone acetate (MPA) on growth of DMBA-induced rat mammary tumors: Histopathological and endocrine studies; en Iacobelli S y Di Marco A (Eds.), *Role of Medroxyprogesterone in Endocrine-related tumors*, Raven Press, New York, pp. 21-28, 1980.
- Daniel CW, Silberstein GB. Postnatal development of the rodent mammary gland. En Neville MC, Daniel C (eds), *The mammary gland. Development, Regulation and function*. Plenum Press, New York, 3-36, 1987.
- Daughaday WH, Rotwein P. Insulin-like growth factors I and II. Peptide, mRNA, and gene structures, serum and tissue concentrations. *Endocr Rev* 10:68-91, 1989.
- D'Cruz OJ, Haas JrGG. Immunoreactive human epidermal growth factor in human seminal plasma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 68:1136, 1989.
- De-Courmelles FV. La radiotherapie indirecte ou dirigee par les correlation organiques. *Archives d'Electricité Médical*, 32, 264, 1922.
- De Larco JE, Todaro GJ. Growth factors from murine sarcoma virus-transformed cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 75:4001-4005, 1978.
- Delarue JC, Friedman S, Mouriessse H, May-Levin F, Sancho-Garnier H, Contesso G. Epidermal growth factor receptor in human breast cancers: correlation with estrogen and progesterone receptors. *Breast Cancer Res. Treat.* 11:173-178, 1988.
- DeLeon DD, Bakker B, Wilson DM, Hintz RL, Rosenfeld RG. Demonstration of insulin-like growth factor IGF-1 and -2) receptors and binding protein in human breast cancer cells lines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 152:398-405, 1988.
- De Martin R, Haendler B, Hoefler-Warbinek R, Gaugitsch H, Wrann M, Schulusener M, Seifert JM, Bodmer S, Fontana A, Hofer E. Complemetary

- DNA for human glioblastoma-derived T cell suppressor factor, a novel member of the transforming growth factor-beta gene family. *EMBO J.* 6:3673-3677, 1987.
- Dembinski TC, Shiu RPC. Growth factors in mammary gland development and function; En Neville MC, Daniel C (eds), *The mammary gland*, Plenum Press, New York, 335-381, 1987.
- Dennis PA, Rifkin DB. Cellular activation of latent transforming growth factor  $\beta$  requires binding to the cation-independent mannose-6-phosphate/insulin-like growth factor type II receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88:580-584, 1991.
- De Pagter-Holthuisen P, van Scahaik GM, Verduijn GJB, van Ommen GJB, Bouma BN, Jansen M, Sussenbach JS. Organization of the human genes for Insulin-like growth factor I and II. *FEBS Lett* 195:179-184, 1986.
- De Pagter-Holthuisen P, Jansen M, van Schiak FMA et al. The human insulin-like growth factor II gene contains two development-specific promoters. *FEBS Lett.* 214:259-264, 1987.
- De Pagter -Holthuisen P, Jansen M, van der Kammen RA, van Schaik FMA, Sussenbach JS. Differential expression of the human insulin-like growth factor II gene. Characterization of the IGF-II mRNAs and an mRNA encoding a putative IGF-II associated protein. *Biochim. Biophys. Acta* 950:282-295, 1988.
- Derynck R, Roberts AB, Winkler ME, Chen EY, Goeddel DV. Human transforming growth factor  $\alpha$ : precursor structure and expression in *E. coli*. *Cell.* 38:287-297, 1984.
- Derynck R, Roberts AB, Eaton DH, Winkler ME, Goeddel DV. Human Transforming growth factor  $\alpha$ : precursor sequence, gene structure, and heterologous expression. *Cancer Cells.* 3:79-86, 1985a.
- Derynck R, Jarrett JA, Chen EY, Eaton DH, Bell JR, Assoian RK, Roberts AB, Sporn MB, Goeddel DV. Human Transforming growth factor-beta cDNA sequence and expression in tumor cells lines. *Nature* 316:701-705, 1985b.
- Derynck R, Goeddel DV, Ullrich A, Gutterman JV, Willians RD, Bringman TS, Berger WH. Synthesis of messenger RNAs for transforming growth factors

- $\alpha$  and  $\beta$  and the epidermal growth factor receptor by human tumors. *Cancer Res.* 47:707-712, 1987.
- Derynck R. Transforming growth factor  $\alpha$ . *Cell* 54:593-595, 1988a.
- Derynck R, Lindquist PB, Lee A, Wen D, Tamm J, Graycar JL, Rhee L, Mason AJ, Miller DA, Coffey RJ, Moses HL, Chen EY. A new type of transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ 3. *EMBO J.* 7:3737-3743, 1988b.
- De Vroede MA, Rechler MM, Nissley SP, Joshi S, Burke GT, Katsoyannis PG. Hybrids molecules containing the B-domain of insulin-like growth factor I (IGF-I) are recognized by IGF carrier proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:3010-3014, 1985.
- Dickson RB, Lippman ME. Role of estrogen in malignant progression of breast cancer: NEW perspectives. *Trends in Pharmacol. Sci.* 7:294-296, 1986a.
- Dickson RB, Huff KK, Spencer EM y col. Induction of epidermal growth factor-related polypeptides by 17 $\beta$ -estradiol in MCF-7 cells. *Endocrinology* 118:138-142, 1986b.
- DiFiore PP, Pierce JP, Fleming TP, Hazan R, Ullrich A, Kling CR, Schlessinger J, Aaronson SA. Overexpression of the human EGF receptor confers and EGF-dependent transformed phenotype to NIH 3T3 cells. *Cell* 51:1063-1070, 1987.
- Doolittle RF, Hunkapiller MW, Hood LE, Devare SG, Robbins KC, Aaronson SA, Antoniades HA. Simian sarcoma virus onc gene v-sis is derived from the gene (or genes) encoding a platelet-derived growth factor. *Science* 221:275-277, 1983.
- Douglas M. The treatment of advanced breast cancer by hormone therapy. *British Journal of Cancer* 6:32-45, 1952.
- Dull TJ, Gray A, Hayflick JS, Ullrich A. Insulin-like growth factor II precursor gene organization in relation to insulin gene family. *Nature* 310: 777-81, 1984.
- Dunn WA, Connolly TP, Hubbard AL. Receptor-mediated endocytosis of epidermal growth factor by rat hepatocytes: receptor pathway. *J. Cell. Biol.* 102:24-36, 1986.

- Dzan VJ: Cardiac renin-angiotensin system. Molecular and functional aspects. Am. J. Med. 84 (3A): 22-27, 1988.
- Ebina Y, Ellis L, Jarnagin K, Edery M, Graf L, Clausen E, Ou J-H, Masiarz F, Kan YW, Goldfine ID, Roth RA, Ritter WJ. The human insulin receptor cDNA: the structural basis for hormone-activated transmembrane signalling. Cell 40:747-758, 1985.
- Edery M, Pang K, Larson L, Colosi T, Nandi S. Epidermal growth factor receptor levels in mouse mammary glands in various physiological states. Endocrinology. 117:405, 1985.
- El-Brady OM, Minitti C, Kohn EC, Houghton PJ, Daughaday WH, Helman LJ. Insulin-like growth factor II acts as an autocrine growth and motility factor in human rhabdomyosarcoma tumors. Cell growth and Differentiation 1:325-331, 1990.
- El Etreby MF, Graf KJ, Gunzel P, Neuman F. Evaluation of effects of sexual steroids on the hypothalamic-pituitary system of animals and man; en Mechanism of toxic action on some target organs. Arch. Toxicol. Suppl 2:11, 1979.
- Elizalde PV, Lanari C, Kordon E, Tezón J, Charreau EH. Transforming growth factor  $\beta$  activity in *in vivo* lines of hormone dependent and independent mammary adenocarcinomas induced by medroxyprogesterone acetate in BALB/c mice. Breast Cancer Res. Treat. 16:29-39, 1990.
- Elson SD, Brown CA, Thorburn GD. Identification of epidermal growth factor-like activity in human male reproductive tissues and fluids. J. Clin. Endocrinol. Metab. 58:589, 1984.
- Escher GC, White A (Eds). Symposium on steroids in experimental and clinical practice, pp 402-448, Philadelphia, P Blukiston & Son, 1951.
- Fine LG, Holley RW, Nasri H, Badie-Dezfooly B. BSC-1 growth inhibitor transforms a mitogenic stimulus into a hypertrophic stimulus for renal proximal tubular cells relationship to Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiport activity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82:6163-6166, 1985.
- Finzi E, Fleming T, Segatto O, Pennington DY, Bringman TS, Derynck R, Aaronson SA. The human transforming growth factor  $\alpha$  coding sequence is

- not a direct-acting oncogene when overexpressed in NIH 3T3 cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 84:3733-3737, 1987.
- Fitzpatrick SL, Brightwell J, Wittliff JL, Barrows GH, Schultz GS. Epidermal growth factor binding by breast cancer tumor biopsies and relationship to estrogen and progesterin receptor levels. Cancer Res. 44:3448-3453, 1984a.
- Fitzpatrick SL, La Chance MP, Schultz GS. Characterization of epidermal growth factor receptor and action on human breast cancer cells in culture. Cancer Res. 44:3342-3347, 1984b.
- Flier JS, Usher P, Moses AC. Monoclonal antibody to the type I insulin-like growth factor receptor blocks IGF-I receptor mediated DNA synthesis: Clarification of the mitogenic mechanisms of IGF-I and Insulin in human skin fibroblasts. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:664-668, 1986.
- Foekens JA, Portengen H, Van Putten WLJ, Trapman AMACn Reubi JC, Alexieva-Figusch J, Klijn JGM. Prognostic value of receptors for insulin-like growth factor I, somastostatin and epidermal growth factor in human breast cancer. Cancer Res. 49:7002-7009, 1989.
- Frank DW, Kirton KT, Murchinson TE, Quinlan WJ, Coleman TJ, Gilbertson TJ, Freenstra ES, Kimball FA. Mammary tumors and serum hormones in the bitch treated with medroxyprogesterone acetate and progesterone for four years. Fertil. Steril. 31:340, 1979.
- Freiss G, Rochefort H, Vignon F. Mechanism of 4-hydroxytamoxifen anti-growth actor activity in breast cancer cells: alterations of growth factor receptor inding sites and tyrosine kinase activity. Biochem. Biophys. Res. Commun. 73:919-926, 1990.
- Frolik CA, Dart LL, Meyers CA, Smith DM, Sporn MB. Purification and inical characterization of a type beta transforming growth factor from human placenta. Porc. Natl. Acad. Sci. USA. 80:3676-3680, 1983.
- Furlanetto RW, DiCarlo JN. Somatomedin-C receptors and growth effects in human breast cancer cells maintained in long term tissue culture. Cancer Res. 44:2122-2128, 1984.
- Gabrielson EW, Gerwin BI, Harris CC, Roberts AB, Sporn MB, Lechner JF. Stimulation of DNA synthesis in cultured primary human mesothelial cells by specific growth factors. FASEB J. 2:2717-2721, 1988.

- Ganzina F. High dose medroxyprogesterone acetate (MPA) treatment in advanced breast cancer. A review. *Tumori* 65:563, 1979.
- Gentry LE, Twardzik DR, Lim GJ, Ranchalis JE, Lee DC. Expression and characterization of transforming growth factor  $\alpha$  precursor protein in transfected mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* 7:1585-1591, 1987.
- Gibbons GH, Pratt RE y Dzau VJ: Vascular Smooth Muscle Cell Hypertrophy vs. Hyperplasia. *J. Clin. Invest.*, 90:456-461, 1992.
- Gill GN, Lazar CS. Increase phosphotyrosine content and inhibition of proliferation in EGF-treated A431 cells. *Nature* 293:305-307, 1981.
- Gill GN, Bertics PJ, Stanto JB. Epidermal growth factor and its receptor. *Mol. Cell. Endocrinol.* 51:169-186, 1987.
- Gowan LK, Hampton B, Hill DJ, Schlueter RJ, Perdue JF. Purification and characterization of a unique high molecular weight form of insulin-like growth factor II. *Endocrinology* 121:449-458, 1987.
- 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, 1983.
- Gray A, Tam AW, Dull TJ, Hayflick J, Pintar J, Cavenee WK, Koufos A, Ullrich A. Tissue-specific and developmentally regulated transcription of the insulin-like growth factor 2 gene. *DNA* 6:283-295, 1987.
- Gregory H. Isolation and structure of urogastrone and its relationship to epidermal growth factor. *Nature* 275:325, 1975.
- Greslik EW, Gubits RM, Barka T, In situ localization of mRNA for epidermal growth factor in the submandibular gland of the mouse. *J. Histochem. Cytochem.* 33:1235-1240, 1985.
- Griffiths CT, Hall TC, Saba Z, Barlow JJ, Nevinny HB. Preliminary trial of aminoglutethimide in breast cancer. *Cancer* 32: 31-37, 1973.
- Grueters A, Alm J, Lakshmanan J, Fisher DA. Epidermal growth factor in mouse milk during early lactation: lack of dependency on submandibular glands. *Pediatr. Res.* 19:853, 1985.



- Gubits RM, Shaw PA, Gresik EW, Onetti-Muda A, Barka T. Epidermal growth factor gene expression is regulated differently in the mouse kidney and submaxillary gland. *Endocrinology* 119:1382-1387, 1986.
- Gutman A, Yamada KM, Kornblihtt A. Human fibronectin is synthesized as a prepolypeptide. *FEBS Lett.* 207 (1): 145-148, 1986.
- Haddow A, Watkinson JM, Patterson E. Influence of synthetic oestrogens upon advanced malignant disease. *British Medical Journal*, 2:393-398, 1944.
- Haigler HT, McKanna JA, Cohen S. Direct visualization of the binding and internalization of a ferritin conjugate of epidermal growth factor in human carcinoma cells A431. *J. Cell. Biol.* 81:382-395, 1979.
- Hall JE. The Renin-Angiotensin system: renal actions and blood pressure regulation. *Comp. Ther.* 17:8-17, 1991.
- Han VKM, Lund PK, Lee DC, D'Ercole AJ. Expression of somatomedin/Insulin-like growth factor messenger ribonucleic acids in the human fetus: Identification, characterization and tissue distribution. *J Clin Endocrinol Metab.* 66:422-429, 1988.
- Hanks SK, Armour R, Baldwin JH, Maldonado F, Spiess J, Holley RW. Amino acid sequence of the BSC-1 cell growth inhibitor (polyergin) deduced from the nucleotide sequence of the cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85:79-83, 1988.
- Hari J, Pierce SB, Morgan DO, Sara V, Smith MC, Roth RA. The receptor for insulin-like growth factor II mediates an insulin-like response. *EMBO J.* 6:3367-3371, 1987.
- Henderson IC, Harris JR, Kinne DW, Hellman S. *Cancer of the Breast*. In: DeVita VT Jr, Hellman S, Rosenberg SA (eds). *Cancer, Principles and Practice of Oncology* (3d edition). JB Lippincott Company, Philadelphia, 1989.
- Hirata Y, Orth DN. Epidermal growth factor (urogastrone) in human tissues. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 48:667, 1979.

- Hissom JR, Bowden RT, Moore MR. Effects of progestins, estrogens and antihormones on growth and lactate dehydrogenases in the human breast cancer cell line T47D. *Endocrinol.*, 125:418-423, 1989.
- Höppener JWM, Mosselman S, Roholl PLM, Lambrechts C, Slebos RJC, de Pagter-Holthuizen P, Lips CJM, Jansz HS, Sussenbach JS. Expression of insulin-like growth factor I and II genes in human smooth muscle tumour. *Embo J.* 7:1379-85, 1988.
- Horwitz KB, Freidenberg GR. Growth inhibition and increase of insulin receptors in antiestrogen resistant T47D human breast cancer cells by progestins: implications for the endocrine therapies. *Cancer Res.* 45:167-173, 1987.
- Howell A, Dowell DJ, Anderson H, Redford J. Response after withdrawal of tamoxifen and progestogens in advanced breast cancer. *Annals of Oncology.* 3: 611-617, 1992.
- Howell A, DeFriend D, Anderson E. Mechanisms of response and resistance to endocrine therapy for breast cancer and the development of new treatments. *Reviews on Endocrine-Related Cancer* 43:5-21, 1993.
- Huff KK, Kaufman D, Gabbay KH. Secretion of an insulin-like growth factor I related protein by human breast cancer cells. *Cancer Res.* 46:4613-4619, 1986.
- Huggins C, Dao T. Adrenalectomy and oophorectomy in the treatment of advanced carcinoma of the breast. *J. Amer. Med. Association.* 151:1388-1394, 1953.
- Huggins C, Yang NC. Induction and extinction of mammary cancer. A striking effect of hydrocarbons permits analysis of mechanisms of causes and cure of breast cancer. *Science* 137:257-262, 1962a.
- Huggins C, Moon RC, Morji S. Extinction of experimental mammary cancer. I. Estradiol- 17 $\beta$  and progesterone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 48:379-386, 1962b.
- Humbel RE: Insulin-like growth factors I and II. *Eur. J. Biochem.* 190:445-462, 1990.

- Ignatz RA, Kelly B, Davis RJ, Massagué J. Biologically active precursor for transforming growth factor type  $\alpha$ , released by retrovirally transformed cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83:6307-6311, 1986a.
- Ignatz RA, Massagué J. Transforming growth factor-  $\beta$  stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. J. Biol. Chem 261:4337-4345, 1986b.
- Ignatz RA, Endo T, Massagué J. Regulation of fibronectin and type I collagen mRNA levels by transforming growth factor  $\beta$ . J. Biol. Chem. 262:6443-6446, 1987.
- Inagawa W, Tomooka Y, Hamamoto S, Nandi S. Stimulation of mammary epithelial cell growth *in vitro*. Interaction of epidermal growth factor and mammogenic hormones. Endocrinology 116:1514-1524, 1985.
- Inui T, Tsubura A, Morii S. Incidence of precancerous foci of mammary glands and growth rate of transplantable mammary cancers in sialoadenectomized mice. J. Natl. Cancer. Inst. 81:1660-1663, 1989
- Jacobs SC, Story MT. Exocrine secretion of epidermal growth factor by the rat prostate: effect of adrenergic agents, cholinergic agents and vasoactive intestinal peptide. The prostate 13:79, 1988.
- Jakowlew SB, Dillard PJ, Kondaiah P, Sporn MB, Roberts AB. Complementary deoxyribonucleic acid cloning of a novel transforming growth factor - $\beta$  messenger ribonucleic acid from a chick embryo chondrocytes. Mol. Endocrinol. 2:747-755, 1988a.
- Jakowlew SB, Dillard PJ, Sporn MB, Roberts AB. Complementary deoxyribonucleic acid cloning of an mRNA encoding transforming growth factor- $\beta$  4 from chicken embryo chondrocytes. Mol. Endocrinol. 2:1186-1195, 1988b.
- Jansen M, de Pagter-Holthuisen P, Van den Brande JL, Sussenbach JS. Somatomedin gene structure and expression. In: Highlight on endocrinology. Christiansen C, Riis BJ (eds). Copenhagen 217-224, 1987.
- Jeng MH, Jordan VC. Growth stimulation and differential regulation of transforming growth factor  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1), TGF- $\beta$ 2 and TGF- $\beta$ 3 messenger RNA levels by norethindrone in MCF-7 human breast cancer cells. Mol. Endocrinol. 5:1120-1128, 1991.

- Kaleko M, Rutter WJ, Miller AD. Overexpression of the human insulin-like growth factor I receptor promotes ligand dependent neoplastic transformation. *Mol Cell. Biol.* 10:464-473, 1990.
- Kamata N, Chida K, Rikimaru K, Horikoshi M, Enomoto S, Kuruki T. Growth-inhibitory effects of epidermal growth factor and overexpression of its receptors on human squamous cell carcinomas in cultured. *Cancer Res.* 46:1648-1653, 1986.
- Karey KP, Sirbasku DA. Differential responsiveness of human breast cancer cells lines MCF-7 and T 47D to growth factors and  $17\beta$ -estradiol. *Cancer Res.* 48: 4083-4092, 1988.
- Katz AM: Angiotensin II: Hemodynamic regulator or Growth factor?. *J.Mol. Cell Cardiol.*, 22: 739-747, 1990.
- Kehrl JH, Roberts AB, Wakerfield LM, Jakowlew SB, Sporn MB, Fauci AS. Transforming growth factor  $\beta$  is an important immunomodulatory protein for human B-lymphocytes. *J. Immunol.* 137:3855-3860, 1986a.
- Kehrl JH, Wakerfield LM, Roberts AB, Jakowlew SB, Alvarez-Mon M, Derynck R, Sporn MB, Fauci AS. Production of transforming growth factor beta by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth. *J. Exp. Med.* 163:1037-1050, 1986b.
- Kehrl JH, Taylor AS, Delsing GA, Roberts AB, Sporn MB, Fauci AS. Further studies of the role of TGF- $\beta$  in human B cell function. *J. Immunol.* 143:1868-1874, 1989.
- Keller JR, Mantel C, Sing GK, Ellingworth LR, Ruscetti SK, Ruscetti FW. Transforming growth factor  $\beta$ 1 selectively regulates early murine hematopoietic progenitors and inhibits the growth of IL-3 dependent myeloid leukemia cell lines. *J. Exp. Med.* 168:737-750, 1988.
- Keller JR, Sing GK, Ellingworth LR, Ruscetti FW. Transforming growth factor  $\beta$ : possible roles in the regulation of normal and leukemic hematopoietic of growth. *J. Cell. Biochem.* 39:79-84, 1989.
- Kerr DJ, Golberg JA, Anderson JR, Wilmott N, Whateley AT, McArdle CS, McKillop J. *Experientia Suppl.* 61:339-345, 1992.

- Kiess W, Thomas CL, Greenstein A, Lee L, Sklar MM, Rechler MM, Sahagian GG, Nissley SP. Insulin-like growth factor II (IGF-II) inhibits both the cellular uptake of  $\beta$ -galactosidase and the binding of  $\beta$ -galactosidase to purified mannose-6-phosphate receptor. *J. Biol. Chem.* 264:4710-4714, 1989.
- Kimball ES, Bohn WH, Cockley KD, Warren TC, Sherwin SA. Distinct high performance liquid chromatography pattern of transforming growth factor activity in urine of cancer patients as compared with that of normal individuals. *Cancer Res.* 44:3613-3619, 1984.
- Kimchi A, Wang X-F, Weinberg RA, Cheifetz S, Massagué J. Absence of TGF- $\beta$  receptors and growth inhibitory responses in retinoblastoma cells. *Science.* 240:196-198, 1988.
- King CR, Borrello I, Bellot F, Comoglio P, Schlessinger J. EGF binding to its receptor triggers a rapid tyrosine phosphorylation of the *erbB-2* protein in the mammary tumor cell line SK-BR-3. *EMBO J.* 7:1647-1651, 1988.
- Kiss R, Paridaens RJ, Heuson J-C, Danguy AJ. Effect of progesterone on cell proliferation in the MXT mouse hormone-sensitive mammary neoplasm. *J. Natl. Cancer. Inst.* 77:173-177, 1986.
- Klapper DG, Svoboda ME, Van Wyck JJ. Sequence analysis of Somatomedin-C: Confirmation of identity with insulin-like growth factor I. *Endocrinology* 112:2215-2217, 1983.
- Klijn JGM, De Jong FH. Treatment with luteinizing-hormone releasing hormone analogue (buselerin) in premenopausal patients with metastatic breast cancer. *Lancet* i, 12313-1216, 1982.
- Klijn JGM, Berns PMJJ, Schmitz PIM, Foekens JA. The clinical significance of epidermal growth factor receptor (EGF-R) in human breast cancer: A review on 5232 patients. *End. Rev.* 13:3-17, 1992.
- Knabbe C, Lippman ME, Wakefield L, Flanders K, Kasid A, Derynck R, Dickson RB. Evidence that TGF- $\beta$  is a hormonal regulated negative growth factor beta and other growth inhibitor in human breast cancer. *Cell.* 48:417-428, 1987.

- Kohn EC, Francis EA, Liotta LA, Schiffmann E. Heterogeneity of the motility responses in malignant tumor cells: a biological basis for the diversity and homing of metastatic cells. *Int. J. Cancer* 46:287-292, 1990.
- Kondaiah P, Sands MJ, Smith JM, Fields A, Roberts AB, Sporn MB, Melton D. Identification of a novel transforming growth factor  $\beta$  mRNA in *Xenopus Laevis*. *J. Biol. Chem.* (in press) 1990.
- Kordon EC, Guerra FK, Elizalde PV, Charreau EH, Dosne Pascualini C, Montecchia F, Pazos P, Dran G, Lanari C. Effect of sialoadenectomy on Medroxyprogesterone acetate-induced mammary carcinogenesis in BALB/c mice. Correlation between histology and EGF receptor content. *Breast Cancer Res. Treat.* (en prensa) 1994.
- Korenman SG, Dukes BA. Specific estrogen binding by the cytoplasm of human breast carcinoma. *J. Clin. Endocr. Metab.* 30:639-645, 1970.
- Koyama H, Nishizawa Y, Wada T, Sasaki Y, y otros: Effects of angiotensin-induced hypertension on cancer chemotherapy. Application to intra-arterial infusion chemotherapy for advanced breast cancer. *Gan To Kagaku Ryoho*, 10:1584-1590, 1983.
- Kozak RW, Haskell JF, Lawrence GA, Rechler MM, Waldmann, Nissley PS. Type I and II insulin-like growth factor receptors on human phytohemagglutinin-activated T lymphocytes. *Cell. Immun.* 109:318, 1987.
- Kull FC, Jacobs S, Su Y-F, Svoboda ME, Van Wyck JJ, Cuatrecasas P. Monoclonal antibody to receptor for insulin and Somatomedin-C. *J. Biol. Chem.* 258:6561-6566, 1983.
- Kurachi H., Oka T. Changes in Epidermal growth factor concentrations of submandibular gland, plasma urine of normal and sialoadenectomized female mice during various reproductive stages. *J. Endocrinol.* 106:197-202, 1985a.
- Kurachi H, Okamoto S, Oka T. Evidence for the involvement of the submandibular gland epidermal growth factor in mouse mammary tumorigenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:5940-5943, 1985b.
- Krywicky RF, Yee D. The insulin-like growth factor family of ligands, receptors and binding proteins. *Breast Cancer Res. and Treat.* 22:7-19, 1992.

- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>. *Nature* 227:680-685, 1970.
- Lanari C, Molinolo AA, Dosne Pascualini C. Inhibitory effect of medroxyprogesterone acetate on foreing body tumorigenesis in mice. *J. Natl. Cancer Inst.* 77:157, 1986a.
- Lanari C, Molinolo AA, Dosne Pascualini C. Induction of mammary adenocarcinomas by medroxyprogesterone acetate in BALB/c female mice. *Cancer Lett.* 33:215, 1986b.
- Lanari C, Kordon E, Molinolo AA, Pasqualini CD, Charreau EH. Mammary adenocarcinomas induced by medroxyprogesterone acetate: hormone dependence and EGF receptors of BALB/c *in vivo* sublines. *Int. J. Cancer* 43:845, 1989.
- Lane G, Siddle NC, Ryder TA, Pryse-Davies J, King RJB, Whitehead MI. Effects of dehydrogesteron on the oestrogenized postmenopausal endometrium. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* 93:52-62, 1986.
- Lawrence DA, Pircher R, Jullien P. Conversion of a high molecular weight latent beta-TGF from chicken embryo fibroblasts into a low molecular weight active beta-TGF under acidic conditions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 133:1026-1034, 1985.
- LeBouc Y, Noguez P, Sondermeijer P, Dreyer D, Girard F, Binoux M. A new 5' non-coding region for human placental insulin-like growth factor II mRNA expression. *FEBS lett.* 222:181-189, 1987.
- Lee DC, Rockford R, Todaro GJ, Villareal LP. Developmental expression of rat transforming growth factor  $\alpha$  mRNA. *Mol. Cell. Biol.* 5:3644-3646, 1985a.
- 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, 1985b.
- Lee K, Takana M, Hatanaka M, Kuze F. Reciprocal effects of epidermal growth factor and transforming growth factor  $\beta$  on the anchorage-dependent and independent growth of A431 epidermoid carcinoma cells. *Exp. Cell. Res.* 173:156-162, 1987.

- Liotta LA, Mandler R, Murano G, Katz DA, Gordon RK, Chiang PK, Schiffmann E. Tumor autocrine motility factor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83:3302-3306, 1986.
- Liu SC, Sanfilippo B, Perroteau I, Derynck R, Salomon DS, Kindwell WR. Expression of transforming growth factor  $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ) in differentiated rat mammary tumors: estrogen induction of TGF $\alpha$  production. *Mol. Endocrinol.* 1:683-692, 1987.
- Loeb C, Moskop Kirtz MM. The effect of transplants of anterior lobes of the hypophysis on the growth of the mammary gland carcinoma in various strains of mice. *Am. J. Cancer.* 36:56-82, 1939.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:262-275, 1951.
- Luft R, Olivecrona H. Experiences with hypophysectomy in man. *J. Neurosurgery* 10:301-316, 1953.
- Lyons RM, Keski-Oja J, Moses HL. Proteolytic activation of latent transforming growth factor- $\beta$  from fibroblast- conditioned medium. *J. Cell. Biol.* 106:1659-1665, 1988.
- Maas H, Jonat W, Stolzenbach G, Trams G. The problem of nonresponding estrogen receptor-positive patients with advanced breast cancer. *Cancer* 46:2835-2837, 1980.
- MacDonald RG, Pfeffer SR, Coussens L, Tepper MA, Brocklebank CM, Mole JE, Anderson JK, Chen E, Czeck MP, Ullrich A. A single receptor binds both Insulin-like growth factor II and mannose-6-phosphate. *Science* 239:1134-1137, 1988.
- MacDonald RG. Mannose-6-phosphate enhances cross-linking efficiency between insulin-like growth factor-II (IGF-II) and IGF-II/mannose-6-phosphate receptors in membranes. *Endocrinology* 128:413-421, 1991.
- Macias A, Azavedo E, Hägerström T, Klintenbert C, Pérez R, Stook L. Prognostic significance of the receptor for epidermal growth factor in human mammary carcinomas. *Anticancer Res.* 7:459-464, 1987.
- Massagué J, Like B. Cellular receptors for type beta transforming growth factors. *J. Biol. Chem.* 260:2636-2645, 1985.



- Massagué J, Cheifetz S, Endo T, Nadal-Ginard. Type  $\beta$  transforming growth factor is an inhibitor of myogenic differentiation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83:8206-8210, 1986.
- Massagué J. Receptors for the TGF-beta family. Cell. 69:1067-1070, 1992
- Masui T, Wakefield LM, Lechner JF, La Veck MA, Sporn MB, Harris CC. 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, 1988.
- Mathews LS, Hammer RE, Behringer RR et al. Growth enhancement of transgenic mice expressing human insulin-like growth factor I. Endocrinology 123:2827-2833, 1988.
- Mathieu M, Rochefort H, Barenton B, Preboios C, Vignon F. Interactions of cathepsin-D and insulin-like growth factor II/mannose-6-phosphate receptor in human breast cancer cells and possible consequences on mitogenic activity of IGF-II. Mol. Endocrinol. 4:1327-1335, 1990.
- Mathieu M, Vignon F, Capony F, Rochefort H. Estradiol down-regulates the Mannose-6-phosphate/Insulin-like growth factor-II receptor gene and induces Cathepsin-D in Breast cancer cells: A receptor saturation mechanism to increase the secretion of lysosomal proenzymes. Mol. Endocrinol. 5:815-822, 1991.
- Matsuzawa A, Yamamoto T. A transplantable pregnancy-dependent mammary tumor line (TPDMT-4) in strain DDD mice. Gan. 65:307-315, 1974.
- Medina D. Preneoplastic lesions in murine mammary cancer. Cancer Res. 36:2589, 1976.
- Medina D, Warner MR. Mammary tumorigenesis in carcinogen-treated mice. IV. Induction of mammary ductal hyperplasias. JNCI 57:331, 1977.
- Millan MA, Agulera G: Angiotensin II receptors in testes. Endocrinology 122:1984-1990, 1988.
- Mills NC, D'Ercole AJ, Underwood LE, Ilan J. Synthesis of Somatomedin-C/Insulin-like growth factor I and by human placenta. Mol. Biol. Rep. 11:231-236, 1986.

- Minuto F, DelMonte P, Barreca A: Partial Characterization of somatomedin-like immunoreactivity secreted by breast cancer cells *in vitro*. *Mol. Cell. Endocrinol.* 54:179-184, 1987.
- Miyazono K, Heldin C-H. Interaction between TGF- $\beta$ 1 and carbohydrate structures in its precursor renders TGF- $\beta$ 1 latent. *Nature* 338:158-160, 1989.
- Miyazono K, Hellman U, Wernstedt C, Heldin C-H. Latent high molecular weight complex of transforming growth factor  $\beta$ 1. *J. Biol. Chem.* 263:6407-6415, 1988.
- Molinolo AA, Lanari C, Charreau EH, SanJuan N, Pasqualini CD. Mouse mammary tumors induced by medroxyprogesterone acetate: immunohistochemistry and hormonal receptors. *J. Natl. Cancer Inst.* 79:1341, 1987.
- Moran JR, Courtney ME, Orth DN, Vaughan R, Coy S, Mount CD, Sherrell BJ, Greene HL. Epidermal growth factor in human milk: daily production and diurnal variation during early lactation in mothers delivering at term and at premature gestation. *J. Pediatr.* 103:402, 1983.
- Morgan DO, Edman JC, Standring DN, Fried VA, Smith MC, Roth RA, Rutter WJ. Insulin-like growth factor II receptor as a multifunctional binding protein. *Nature* 329:301-317, 1987.
- Morgan HE, Baker KM: Cardiac Hypertrophy: mechanical, neural and endocrine dependence. *Circulation* 83: 3-15, 1991.
- Moses AC, Nissley SP, Short PA, Rechler MM. Immunological cross-reactivity of multiplication stimulating activity polypeptides. *Eur. J. Biochem.* 103:401-408, 1980a.
- Moses AC, Nissley SP, Passamani J, White RM. Further characterization of growth hormone-dependent somatomedin-binding proteins produced by rat liver cells in culture. *Endocrinology* 104:536-546, 1979.
- Moses AC, Nissley SP, Short PA, Rechler MM, Podskalny JM. Purification and characterization of multiplication-stimulating activity. Insulin-like growth factors purified from rat-liver-cell-conditioned medium. *Eur. J. Biochem.* 103:387-400, 1980b.

- Moses HL, Branum EL, Proper JA, Robinson RA. Transforming growth factor production by chemically transformed cells. *Cancer Res.* 41:2842-2848, 1981.
- Moses HL, Tucker RF, Leof EB, Coffey RJ, Halper J, Shipley GD. Type-beta growth factor is a growth stimulator and a growth inhibitor. En: Y J, Ozanne B, Stiles C (eds). *Cancer Cells*, vol 3. Cold Spring Harbor, New York, pp 65-71, 1985.
- Mroczkowski B, Reich M, Whittaker J, Bell GI, Cohen S. Expression of human epidermal growth factor precursor cDNA in transfected mouse NIH 3T3 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:126-130, 1988.
- Mroczkowski B, Reich M, Chen K, Bell GI, Cohen S. Recombinant human EGF precursor is aglycosylated membrane protein with biological activity. *Mol. Cell. Biol.* 9:2771-2778, 1989.
- Müller G, Behrens J, Nussbaumer U, Böhlen P, Birchmeier W. Inhibitory action of transforming growth factor  $\beta$  on endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84:5400-5604, 1987.
- Murad F, Guilman A. Estrogens and progestins; en Goodman L & Gilman A (Eds). *The pharmacological bases of therapeutics*, 5th ed., Macmillan, New York , pp. 1439-1445, 1975.
- Murphy LC, Murphy LJ, Dubik D, Bell GI, Shiu RPC. Epidermal growth factor gene expression in human breast cancer cells: regulation of expression by progestins, *Cancer Res.* 48: 4555-4560, 1988a.
- Murphy LC, Murphy LJ, Shiu RPC. Progestins regulation of EGF receptor mRNA accumulation in T-47D human breast cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 150: 192-196, 1988b.
- Murphy LC, Dotzlaw H. Regulation of transforming growth factor  $\alpha$  and transforming growth factor  $\beta$  messenger ribonucleic acid abundance in T-47D human breast cancer cells. *Mol. Endocrinol* 3:611-617, 1989.
- Murthy U, Basu M, Sen-Majumadr A, Das M. Perinuclear localization and recycling of epidermal growth factor receptor kinase: immunofluorescent visualization using antibodies directed to kinase and extracellular domains. *J. Cell. Biol.* 103:333-343, 1986.

- Musgrove EA, Hamilton JA, Lee CSL, Sweeney KJE, Watts CKW, Stherland RL. Growth factor, steroid and steroid antagonist regulation of cyclin gene expression associated with changes in T47-D human breast cancer cell cycle progression. *Molecular Cell Biology* (en prensa)
- Myal Y, Shiu RPC, Bhaumick B, Bala M. Receptor binding and growth promoting activity of insulin-like growth factor in human breast cancer cells (T47-D) in culture. *Cancer Res.* 44:5486-5490, 1984.
- Naftilán AJ: The role of Angiotensin II in Vascular Smooth Muscle Cell Growth. *J. Cardiovascular Pharmacology.* 20 (Suppl. 1): S37-S40, 1992.
- Nagasawa H, Aoki M, Sakagami N, Ishida M. Medroxyprogesterone acetate enhances spontaneous mammary tumorigenesis and uterine adenomyosis in mice. *Breast Cancer Res. Treat.* 12:59, 1988.
- Nakhla AM, Tam JP. Transforming growth factor is a potent stimulator of testicular ornithine decarboxylase in immature mouse. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 132:1180-1186, 1985.
- Namer M, Lalanne C, Beaulieu EE. Increase of progesterone receptor by tamoxifen as a hormonal challenge test in breast cancer. *Cancer Res.* 40:1750, 1980.
- Nandi S, McGrath C. Mammary neoplasias in mice. *Advances in Cancer Res.* 17:353, 1973.
- Neely EK, Mirhenn VB, Hintz RL, Wilson DM, Rosenfeld RG. Insulin-like growth factors are mitogenic for human keratinocytes and a squamous cell carcinoma. *J. Invest. Dermatol.* 96:104-110, 1991.
- Nicholson S, Sainsbury JRC, Needham GK, Chambers P, Farndon JR, Harris AL, Quantitative assay of epidermal growth factor receptor in human breast cancer: cut-off points of clinical relevance. *Int. J. Cancer* 42:36-41, 1988.
- Nielsen FC, Gammeltoft S. Mannose-6-phosphate stimulates proliferation of neuronal precursor cells. *FEBS Lett.* 262:142-144, 1990.
- Nishimoto I, Hata Y, Ogata E, Kojima I. Insulin-like growth factor II stimulates calcium influx in competent BALB/c 3T3 cells primed with epidermal

- growth factor: characteristics of calcium influx and involvement of GTP-binding protein. *J. Biol. Chem.* 262:12120-12126, 1987.
- Nishimoto I, Murayama Y, Katada T, Ui M, Ogata E. Possible direct linkage of insulin-like growth factor-II receptor with guanine nucleotide-binding proteins. *J. Biol. Chem.* 264:14029-14038.
- Noguchi S, Miyauchi K, Nishizawa Y, Sasaki Y, y otros: Augmentation of anticancer effect with angiotensin II in intraarterial infusion chemotherapy for breast carcinoma. *Cancer*, 62: 467-473, 1988.
- Nolan CM, Kyle JW, Watanabe H, Sly WS. Binding of the Insulin-like growth factor II by human cation independent mannose-6-phosphate/IGF-II receptor expressed in receptor deficient mouse L-cells. *Cell Regul.* 1:197-213, 1990.
- Norquist SJ. The synthesis of DNA and RNA in human carcinomatous endometrium in short-term incubation in vitro and its response to oestradiol and progesterone. *J. Endocrinol.* 48:29-38, 1979.
- O'Connor-McCourt MD, Wakefield LM. Latent transforming growth factor type- $\beta$  in serum. *J. Biol. Chem.* 262:14090-14099, 1987.
- Ohlsson R, Larsson E, Nilsson O, Wahlstrom T, Sundstrom P. Blastocyst implantation precedes induction of insulin-like growth factor II gene expression in human trophoblasts. *Development* 106: 555-559, 1989.
- Ohmura E, Okada M, Onoda N, Kamiya Y, Murakami H, Tsushima T, Shizume K: Insulin-like growth factor I and transforming growth factor  $\alpha$  as autocrine growth factors in human pancreatic cancer cell growth. *Cancer Res.* 50:103-107, 1990.
- Oka Y, Ghisham FK, Greene HL, Orth DN. Effect of mouse epidermal growth factor/urogatrone on the functional maturation of rat intestine. *Endocrinology* 112:940, 1983.
- Oka Y, Rozek LM, Czech P. Direct demonstration of rapid insulin-like growth factor II receptor internalization and recycling in rat adipocytes. Insulin stimulates  $^{125}\text{I}$ -insulin-like growth factor II degradation by modulating the IGF-II receptor recycling process. *J. Biol. Chem.* 260:9435, 1985.

- Olsen PS, Nexø E, Poulsen SS, Hansen HF, Kirkegaard P. Renal origin of rat urinary epidermal growth factor. *Regul. Peptides*. 10:37, 1984.
- O'Malley KL, Rotwein P. Human tyrosine hydroxylase and insulin genes are contiguous on chromosome 11. *Nucleic Acids Res*. 16: 4437-46, 1988.
- Osborne CK, Hamilton B, Titus G, Livingston RB. Epidermal growth factor stimulation on human breast cancer cells in culture. *Cancer Res*. 40:2361, 1980.
- Osborne CK, Coronado EB, Kitten LJ, Arteaga CL, Fuqua SAW, Marshall M, Li CH. Insulin-like growth factor II (IGF-II): a potential autocrine/paracrine growth factor for human breast cancer acting via the IGF-I receptor. *Mol. Endocrinol*. 3:1701-1709, 1989.
- Oshima A, Nolan CM, Kyle JW, Grubb JH, Sly WS. The human Cation-independent mannose 6-phosphate receptor. Cloning and sequence of the full-length cDNA and expression of functional receptor in cos cells. *J. Biol. Chem*. 263:2553-2562, 1988.
- Ozawa S, Ueda M, Ando N, Abe O, Hirai M, Shimizu N, Stimulation by EGF of the growth of EGF receptor-hyperproducing tumor cells in athymic mice. *Int. J. Cancer* 40:706-710, 1987.
- Papa V, Hartmann KKP, Rosenthal SM, Maddux BA, Siiteri PK, Goldfine ID. Progestins induce down-regulation of Insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptors in human breast cancer cells. Potential Autocrine role of IGF-II. *Mol. Endocrinol*. 5: 709-717, 1991.
- Paik S. Expression of IGF-I and IGF-II mRNA in breast tissue. *Breast Cancer Res. Treat.* 22:31-38, 1992.
- Pandis N, Heim S, Bardi G, Limon J, Mandahl N, Mitelman F. Improved technique for short-term culture and cytogenetic analysis of human breast cancer. *Genes Chromosomes & Cancer* 5:14-20, 1992.
- Pekonen F, Partanen S, Mäkinen T, Rutanen EM. Receptors for Epidermal growth factor and Insulin-like growth factor I and their relation to steroid receptors in human breast cancer. *Cancer Res*. 48:1343-1347, 1988.

- Perheentuba J, Lakshmanan J, Hoath SB, Fisher DA. Hormonal regulation of plasma concentration of epidermal growth factor. *Acta Endocrinol.* 107:571-576, 1984.
- Perroteau E, Salomon D, Debortali M, Kidwell W, Hazarika P, Pardue R, Dedman J, Tam J. Immunologic detection and quantitation of alpha transforminf growth factors in human breast carcinoma cells. *Breast Cancer Res. Treat.* 7:201-210, 1986.
- Peyrat JP, Bonneterre J, Beusdart R, Djiane J, Demaille A. Characterization of Insulin-like growth factor I receptors (IGF1-R) in human breast cancer. Relation to Estradiol and progesterone receptors. *Cancer Res.* 48:6429-6433, 1988a
- Peyrat JP, Bonneterre J, Laurent JC, Louchez MM, Amrani S, Leroy-Martin B, Vilain MO, Delobelle A, Demaille A. Presence and characterization of Insulin-like growth factor 1 receptors in human benign breast disease. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* 24:1425-1431, 1988b
- Peyrat JP, Bonneterre J, Dusanter-Fourt I, Leroy-Martin B, Djiane J, Demaille A. Characterization of Insulin-like growth factor I receptors (IGF1-R) in human breast cancer cells lines. *Bull Cancer* 76:311-319, 1989.
- Peyrat JP, Jammes H, Ban E, Haour F, Edery M, Djiane J, Bonneterre J. Insulin-like growth factor I receptors (IGF1-R) in human breast tumors: histoautoradiographic analysis (HAA) and mRNA expression. *Proc. Amer. Soc. Cancer Res.* 31:49(abstr 292), 1990a.
- Peyrat JP, Bonneterre J, Vennin PH, Louchez MM, Fournier C, Hecquet B, Lefebne J, Demaille A. Insulin-like growth factor I (IGF-I) plasma concentration in breast cancer (BC) patients. *Proc. Amer. Soc. Cancer Res.* 31:50 (abstr 295), 1990b.
- Pfeilschifter J, Muhl H. *BBRC* 169:585-595, 1990.
- Phillips MI, Wang H, Kimura B, Rejtman M, Koduri P, Kalra SP. Dynamic changes in hypothalamic angiotensin II levels and release in association with progesterone- induced luteinizing hormone surge. *Endocrinology* 132:1637-1642, 1987.

- Pircher R, Jullien P, Lawrence DA.  $\beta$ -Transforming growth factor is stored in human blood platelets as a latent high molecular weight complex. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 136:30-37, 1986.
- Pollak MN, Perdue JP, Margolese RG, Baer K, Richard M. Presence of omatomedin receptors on primary human breast and colon carcinomas. *Cncer Letters* 38:223-230, 1987.
- Pollak MN, Polychronakos C, Yousefi S, Richard M. Characterization of insulin-like growth factor I (IGF-I) receptors of human breast cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 152:398-405, 1988.
- Pollak MN, Polychronakos C, Richard M. Insulin-like growth factor I: a potent mitogen for human osteogenic sarcoma. *JNCI* 82:301-305, 1990.
- Polychronakos C, Guyda HJ, Posner BI: Mannose-6-phosphate increases the affinity of its cation-independent receptor for Insulin-like growth factor II by displacing inhibitory endogenous ligands. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 157:632-638, 1988.
- Popliker M, Shatz A, Avaine A, Ullrich A, Schlessinger J, Webb CG. Onset of endogenous synthesis of epidermal growth factor in neonatal mice. *Dev. Bio.* 119:38-44, 1987.
- Powell DR, Lee PDK, Chang D, Liu F, Hintz RL. Antiserum developed for the E peptide region of insulin-like growth factor IA prohormone recognizes a serum protein by both immunoblot and radioimmunoassay. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 65:868-875, 1987.
- Prahdala S, Carroad E, Cukierski M, Hendrickx AG. Embriotoxicity of medroxyprogesterone acetate (MPA) and maternal serum MPA concentration in Cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*). *Teratology* 32:421, 1985.
- Rall LB, Scott J, Bell GI, Crawford RJ, Penschow JD, Niall HD, Coglean PJ. Muse prepro-epidermal growth factor synthesis by the kidney and other tissues. *Nature* 313:228-231, 1985.
- Rappolee DA, Sturm KS, Schultz CA, Pedersen RA, Werb Z. The expression of growth factor ligands and receptors in preimplantation mouse embryos. In: Heyner S, Wiley L eds. *E. Early embryo development and paracrine*



- relationships. UCLA Symposium on Molecular and Cellular Biology, New Series, vol 117. New York: AR Liss, 1989.
- Ravdin PM, Van Beurden M, Fritz NF, Robinson SP, Craig Jordan V. Effect of submandibular gland removal on carcinogen induced rat mammary tumors. *Europ. J. Cancer Clin. Oncol.* 23:449-450, 1987.
- Reeve AE, Eccles MR, Wilkins RJ, Bell GI, Millow LJ. Expressions of insulin-like growth factor II transcripts in Wilms'tumor. *Nature* 317:258, 1985.
- Reddel LL y Sutherland RL. Tamoxifen stimulation of human breast cancer cell proliferation in vitro: A possible model for tamoxifen tumour flare. *European Journal of Cancer Clinical Oncology* 11:1419-1424, 1984.
- Richards J, Guzman R, Konrad M, Yang J, Nandi S. Growth of mouse mammary gland end buds cultured in a collagen gel matrix. *Exp. Cell. Res.* 141:433, 1982.
- Riedel H, Massoglia S, Schlessinger J, Ullrich A. Ligand activation of overexpressed epidermal growth factor receptors NIH 3T3 mouse fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85:1477-1481, 1988.
- Rinderknecht E, Humbel RE. The amino acid sequence of human insulin-like growth factor-I and its structural homology with proinsulin. *J. Biol. Chem.* 253:2769-2776, 1978a.
- Rinderknecht E, Humbel RE. Primary structure of human insulin-like growth factor-II. *FEBS Lett.* 89:283-286, 1978b.
- Roberts CT Jr, Lasky SR, Lowe WL Jr, Seaman WT, LeRoith D. Molecular cloning of rat insulin-like growth factor I complementary deoxyribonucleic acids:differential messenger ribonucleic acid processing and regulation by growth hormone in extrahepatic tissues. *Mol. Endocrinol.* 1: 243-248, 1987.
- Roberts AB, Anzano MA, Lamb LC, Smith JM, Sporn MB. New class of transforming growth factors potentiated by epidermal growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78:5339-5343, 1981.
- Roberts AB, Anzano MA, Meyers CA, Widerman J, Blacher R, Pan Y-C, Stein S, Laberman SR, Smith JM, Lamb LC, Sporn MB. Purification and properties

of a type beta transforming growth factor from bovine kidney.  
Biochemistry. 22:5692-5698, 1983a.

Roberts AB, Frolik CA, Anzano MA, Sporn MB. Transforming growth factor from neoplastic and non-neoplastic tissues. Fed. Proc. 42:2621-2626, 1983b.

Roberts AB, Anzano MA, Wakefield LM, Roche NS, Stern DF, Sporn MB. Type beta transforming growth factor: a bifunctional regulator of cellular growth. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82:119-123, 1985.

Roberts AB, Flanders KC, Kondaiah P, Thompson NI, Van Obberghen-Scilling E, Wakerfield L, Rossi P, de Crombrughe B, Heine UL, Sporn MB. Transforming growth factor  $\beta$ : biochemistry and roles in embryogenesis, tissue repair and remodeling, and carcinogenesis. Recent Prog. Horm. Res. 44:157-197, 1988.

Robustielli Della Cuna G, Preti P. Advanced breast cancer: Hormone-dependency and mechanisms of action of medroxyprogesterone acetate, en Robustielli Della Cuna G, Tepmongkol P, Somboonchareon (Eds.), The role of high dose medroxyprogesterone acetate in the management of endocrine-related tumors, Bangkok, pp. 21-27, 1986.

Rohlik QT, Adams D, Kull FC, Jacobs S. An antibody to the receptor for IGF-I inhibits the growth of MCF-7 cells in tissue culture. Biochem. Biophys. Res. Commun. 149:276-281, 1987.

Romieu G, Maudelonde T, Khalaf S, Rochefort H. The antiprogesterin RU486 in advanced breast cancer: preliminary clinical trial. Bulletin du Cancer 74: 455-459, 1987.

Rook AH, Kehrl JH, Wakefield LM, Roberts AB, Sporn MB, Burlington DB, Lane JBC, Fauci AS. Effects of transforming growth factor  $\beta$  on the functions of natural killer cells: depressed cytolytic activity and blunting of interferon responsiveness. J. Immunol 136:3916-3920, 1986.

Rosenfeld RG, Hintz RL. Somatomedin receptors function and regulation. En: Conm PM (ed). The receptors. vol 3. Academic Press, New York, 281-329, 1988.

Rosenthal A, Lindquist PB, Bringman TS, Goeddel DV, Derynck R. Expression in rat fibroblasts of a human transforming growth factor  $\alpha$  cDNA results in transformation. Cell 46:301-309, 1986.

- Rosenthal SM, Hsiao D, Silverman LA. An Insulin-like growth factor II (IGF-II) analog with highly selective affinity for IGF-II receptors stimulates differentiation, but not IGF-I receptor down-regulation in muscle cells. *Endocrinology* 135:38-44, 1994.
- Roth RA, Stover C, Hari J, Morgan DO, Smith MC, Sara V, Fried VA. Interactions of the receptor for Insulin-like growth factor II with the mannose-6-phosphate and antibodies to the mannose-6-phosphate receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 149:600-606, 1987.
- Rotwein P, Pollock KM, Didier DK, Krivi GG. Organization and sequence of the human Insulin-like growth factor I gene. *J. Biol. Chem.* 261:4282, 1986a.
- Rotwein P. Two insulin-like growth factor I messenger RNAs are expressed in human liver. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:77, 1986b.
- Russo IH, Gimotty P, Dupuis M, Russo J. Effect of medroxyprogesterone acetate on the response of the rat mammary gland to carcinogenesis. *Brit. J. Cancer* 59:210, 1989.
- Sahagian GG, Neufeld EG. Biosynthesis and turnover of the mannose 6-phosphate receptor in cultured Chinese hamster ovary. *J. Biol. Chem.* 258:7121-7128, 1983.
- Sahagian GG, Steer CJ. Transmembrane orientation of the mannose 6-phosphate receptor in isolated clathrin coated vesicles. *J. Biol. Chem.* 260:9398-9842, 1985.
- Sainsbury JRC, Fardon JR, Sherbet GV, Harris AL. Epidermal growth factor receptors and oestrogen receptors in human breast cancer. *Lancet I* (8425):364-366, 1985a.
- Sainsbury JRC, Fardon JR, Harris AL, Sherbet GV. Epidermal growth factor receptors on human breast cancers. *Br. J. Surg.* 72:186-188, 1985b.
- Sainsbury JRC, Malcolm AJ, Appleton DR, Fardon JR, Harris AL. Presence of epidermal growth factor receptor as an indicator of poor prognosis in patients with breast cancer. *J. Clin. Pathol.* 38:1225-1228, 1985c.

- Sainsbury JRC, Nicholson S, Angus B, Fardon JR, Malcolm AJ, Harris AL. Epidermal growth factor receptor status of histological sub-types of breast cancer. *Br. J. Cancer.* 58: 458-462, 1988.
- Salmon WD, Daughaday WH. A hormonally controlled serum factor which stimulates sulfate incorporation by cartilage *in vitro*. *J. Lab. Clin. Med.* 49:825-836, 1957.
- Salomon DS, Perroteau I, Kidwell WR y col., Loss of growth responsiveness to epidermal growth factor and enhanced production of alpha-transforming growth factors in ras transformed mouse mammary epithelial cells. *J. Cell Physiol* 130:397-409, 1987.
- Sandberg K: Structural analysis and regulation of Angiotensin II receptors. *Trends Endocrinol. Metab.*, 5:28-35, 1994.
- Sante RJ, Manni A, Harvey H, Redmond C. Endocrine treatment of breast cancer in women. *Endocr. Rev.* 11:221-265, 1990.
- Scatchard G. The attraction of proteins for small molecules and ions. *Ann. NY Acad. Sci.* 51:660-672, 1949.
- Schatz RW, Soto AM, Sonnenschein C. Effects of interaction between estradiol-17 $\beta$  and progesterone on the proliferation of cloned breast tumor cells (MCF-7 and T47D). *J. Cell. Physiol* 124:386-390, 1985.
- Schelling P, Fisher H, Ganten D: Angiotensin and cell growth: a link to cardiovascular hypertrophy?. *J. Hypertens.* 9:3-15, 1991.
- Schreiber AB, Winkler ME, Derynck R. Transforming growth factor  $\alpha$ : a more potent angiogenic mediator than epidermal growth factor. *Science* 232:1250-1253, 1986.
- Schoele E, Zapf J, Humbel RE, Froesch ER. Insulin-like growth factor stimulates growth in hypophysectomised rats. *Nature* 296: 252-253, 1982.
- Schultz GS, White M, Mitchell R, Brown G, Lynch J, Twardzik DR, Todaro GJ. Epithelial wound healing enhanced by transforming growth factor  $\alpha$  and vaccinia growth factor. *Science* 235:350-352, 1987.
- Schulz KD, Schmidt-Rhode P, Sturm G. High dose medroxyprogesterone acetate in breast cancer-present state of knowledge; en Robustielli Della Cuna G,

- Nagel GA, Lanius P (Eds.), German-Italian Oncological Symposium, Venice, September 1984. Kehrer Verlag KG, Freiburg, pp.21-40, 1985.
- Scott J, Urdea M, Quiroga M, Sanchez-Pescador R, Fong N, Selby M, Rutter WJ, Bell GI. Structure of a mouse submaxillary messenger RNA encoding epidermal growth factor and seven related proteins. *Science* 221:236-240, 1983.
- Scott J, Cowell J, Robertson ME, Priestly LM, Wadey R, Hopkins B, Pritchard J, Bell GI, Rall LB, Graham GF y col.. Insulin-like growth factor II gene expression in Wilms'tumour and embryonic tissues: *Nature* 317:260-262, 1985.
- Segarini PR, Seyedin SM. The high molecular weight receptor to transforming growth factor- $\beta$  contains glycosaminoglycan chains. *J. Biol. Chem.* 263:8366-8731, 1988.
- Sessions CM, Emler CA, Schalch DS. Interaction of insulin-like growth factor II with rat chondrocytes: receptor binding, internalization and degradation. *Endocrinology* 120:2108-2116, 1987.
- Seyedin SM, Thomas TC, Thompson AY, Rosen DM, Piez KA. Purification and characterization of two cartilage inducing factors from bovine demineralized bone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82:2267-2271, 1985.
- Shimatsu A, Rotwein P. Sequence of two rat insulin-like growth factor I mRNAs differing within the 5' untranslated region. *Nucleic Acids Res.* 15:71-76, 1987a.
- Silberstein GB, Daniel CW. Reversible inhibition of mammary gland growth in transforming growth factor- $\beta$ . *Science* 237:291-293, 1987.
- Silver IA, Murrills RJ, Etherington DJ. Microelectrode studies on the acid microenvironment beneath adherent macrophages and osteoclasts. *Exp. Cell Res.* 175:266-276, 1988.
- Singer C, Smith HS, Lippman ME, Cullen KJ. IGF-I and IGF-II expression in fibroblasts derived from tumor, normal breast and skin of breast cancer patients. *Proc. AACR* 33:A1612, 1992.

- Skoog L, Macias A, Azavedo E, Lombardero J, Klitenberg. Receptors for EGF and oestradiol and thymidinekinase activity in different histological subgroups of human mammary carcinomas. *Br. J. Cancer.* 54:271-276, 1986.
- Smith JM, Sporn MB, Roberts AB, Derynck R, Winkler M, Gregory H. Human transforming growth factor  $\alpha$  causes precocious eyelid opening in newborn mice. *Nature* 315:515-516, 1985.
- Smith JJ, Derynck R, Korc M. Production of transforming growth factor  $\alpha$  in human pancreatic cancer cells: evidence for a superagonist autocrine cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84:7567-7570, 1987.
- Smith RD, Chiu AT, Wong PC, Herblin WF, Timmermans PBMWM: Pharmacology of nonpeptide Angiotensin II receptor antagonists. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 32:135-65, 1992.
- Soares MB, Ishii DN, Efstratiadis A. Developmental and tissue-specific expression of a family of transcripts related to rat insulin-like growth factor II mRNA. *Nucleic Acids Res.* 13: 1119-1133, 1985.
- Soares MB, Turken A, Ishii D, et al. Rat insulin-like growth factor II gene: a single gene with two promoters expressing a multitranscript family. *J. Mol. Biol.* 192:737-52, 1986.
- Spitzer E, Groose R, Kunde D, Schmidt HE. Growth mammary epithelial cells in breast cancer biopsies correlates with EGF binding. *Int. J. Cancer* 39:279-282, 1987.
- Spitzer E, Koepke K, Kundi D, Grosse R. EGF binding is quantitatively related to growth in node positive breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 12:45-49, 1988.
- Sporn MB, Roberts AB. Transforming growth factor-beta: new chemical form and new biological roles. *Biofactors* 1:89-93, 1988a.
- Sporn MB, Roberts AB. Peptide growth factors are multifunctional. *Nature* 332:217-219, 1988b.
- Steele-Perkins G, Turner J, Edman JC, Hari J, Pierce SB, Stover C, Rutter WJ, Roth RA. Expression and characterization of a functional human insulin-like growth factor I receptor. *J. Biol. Chem.* 263:11482-11492, 1988.

- Stern PH, Krieger NS, Niessenson RA, Williams RD, Winkler ME, Derynck R, Strewler GJ. Human transforming growth factor  $\alpha$  stimulates bone resorption in vitro. *J. Clin. Invest.* 76:2016-2019, 1985.
- Stern Df, Roberts AB, Roche NS, Sporn MB, Weinberg RA. Differential responsiveness of *myc*- and *ras*- transfected cells to growth factors: selective stimulation of *myc*- transfected cells by EGF. *Mol. Cell. Biol.* 6:870-877, 1986.
- Stewart AJ, Johnson MD, May FEB, Westley BR. Role of insulin-like growth factor receptor in the estrogen stimulated proliferation of human breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* 65:21172-21178, 1990.
- Stewart AJ, Westley BR, May FEB. Modulation of the proliferative response of breast cancer cells to growth factors by oestrogen. *British J. of Cancer* 66:640-648, 1992.
- Stoschek CM, Carpenter G. "Down regulation" of epidermal growth factors receptors: direct demonstration of receptor degradation in human fibroblasts. *J. Cell. Biol.* 98:1048-1053, 1984.
- Stracke ML, Kohn EC, Azna voorian SA, Wilson LL, Salomon D, Krutzsch HC, Liotta LA, Schiffmann E. Insulin-like growth factors stimulate chemotaxis in human melanoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153:1076-1083, 1988.
- Stracke ML, Engel JD, Wilson LW, Rechler MM, Liotta LA, Schiffmann E. The type I insulin-like growth factor receptor is a motility receptor in human melanoma cells. *J. Biol. Chem.* 264:21544-21549, 1989.
- Strong LC. Genetic Etiology of Cancer. *Cancer* 40:438, 1977.
- Sumida C, Lecert F, Pasqualini JR. Control of progesterone receptors in fetal uterine cells in culture: effect of estradiol, progestins, antiestrogens and growth factors. *Endocrinology* 122:3-11, 1988.
- Sun M. Panel says depo provera not proved safe. *Science*, 226:950, 1984.
- Suzuki M, Hori K, Abe I, Saito S, y Sato I: A new approach to Cancer Chemotherapy: Selective Enhancement of tumor blood flow with Angiotensin II. *J.N.C.I.*, 67: 663-669,1981.

- Takeda A, Leavitt WW. Progesterone-induced down-regulation of nuclear estrogen receptor in uterine decidual cells: analysis of receptor synthesis and turnover by the density shift method. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 135:98-104, 1986.
- Tally M, Li CH, Hall K. IGF-2 stimulated growth mediated by the somatomedin type 2 receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 148:811-816, 1987.
- Tam JP. Physiological effects of transforming growth factor in the newborn mouse. *Science* 229:673-675, 1985.
- Teixido J, Massagué J. Structural properties of a soluble bioactive precursor for Transforming growth factor  $\alpha$ . *J. Biol. Chem.* 263:3924-3929, 1988.
- Ten Dijke P, Hanson P, Iwata KK, Pieler C, Foulkes JG. Identification of a new member of the transforming growth factor- $\beta$  gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83:4715-4719, 1988.
- Tobin G, Yee D, Brüner N, Rotwein P. A novel human Insulin-like growth factor I messenger RNA is expressed in normal and tumor cells. *Mol. Endocrinol.* 4:1914-1920, 1990.
- Todaro GJ, De Larco JE. Transformation by murine and feline sarcoma viruses specifically blocks binding of epidermal growth factor to cells. *Nature* 264:26-31, 1976.
- 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.* GH Sato, R Ross (eds). (Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory) pp 113-127, 1979.
- Todderud G, Carpenter G. Presence of mannose phosphate on epidermal growth factor receptor in A-431 cells, *J. Biol. Chem.* 263:17893-17896, 1988.
- Toi M, Nakamura T, Mukaida H, Wada T, Osaki A, Yamada H, Toge T, Niimoto M, Hattori T. Relationship between epidermal growth factor receptor status and various prognostic factors in human breast cancer. *Cancer* 65:1980-1984, 1990.



- Tonelli QJ, Sorof S. Epidermal growth factor requirement for development of cultured mammary gland. *Nature* 285:250-252, 1980.
- Tricoli JV, Rall LB, Karakousis CP, Herrera L, Petrelli NJ, Bell GI, Shows TB. Enhanced levels of insulin-like growth factor messenger RNA in human colon carcinomas and liposarcomas. *Cancer Res.* 46:6169-6173, 1986.
- Tseng L, Gurpide E. Induction of human endometrial estradiol dehydrogenase by progestins. *Endocrinology* 97:825, 1975.
- Ueno T, Takahashi K, Matsuguchi T, Endo H, Yamamoto M. A new leader exon identified in the insulin-like growth factor II gene. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 148:344-349, 1987a.
- Ueno T, Takahashi K, Matsuguchi T, Endo H, Yamamoto M. Transcriptional deviation of the rat insulin-like growth factor II gene initiation at three alternative leader-exons between neonatal tissues and ascites hepatomas. *Biochem. Biophys. Acta.* 950: 411-419, 1987b.
- Ulrich P. Testosterone et son role possible dans le traitement de certains cancers du sein. *International Union Against Cancer* 4: 377, 1939
- 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, Seegurg PH. Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells. *Nature* 309:418-424, 1984.
- Ullrich A, Gray A, Tam AW, Yang-Fem T, Tsubokawa M, Collins C, Henzel W, LeBon T, Kathuria S, Chen E, Jacobs S, Francke U, Ramachandran J, Fujita-Yamaguchi Y. Insulin-like growth factor I receptor primary structure: Comparison with insulin receptor suggests structural determinants that define hormonal specificity. *EMBO J.* 5:2503-2512, 1986.
- 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.
- Valerius EM, Bates SE, Stampfer MR y col. Transforming growth factor- $\alpha$  production and epidermal growth factor receptor expression in normal and

- oncogene transformed human mammary epithelial cells. *Mol. Endocrinol.* 3:203-214, 1989.
- Vallotton MB. The Renin-Angiotensin systems. *Trends Pharmacol. Sci.* 8:69-74, 1987.
- Van den Eijnden-van Raaij AJM, Koornneef I, Vari-Zoelen EJJ. A new method for high yield purification of type beta transforming growth factor from human platelets. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 157:16-23, 1988.
- Van Nie R, Thung PJ. Responsiveness of mouse mammary tumors to pregnancy. *Eur. J. Cancer.* 1:41-50, 1965.
- Vignon F, Bardon S, Chalbos D, Rochefort H. Antiestrogenic effect of R2050, a synthetic progestin, in human breast cancer cells in culture. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 56:1124-1130, 1983.
- Vignon F, Capony F, Chambon M, Freiss G, Garcia M, Rochefort H. Autocrine growth stimulation of the MCF-7 breast cancer cells by estrogen-regulated 52K protein. *Endocrinology* 118:1537-1545, 1986.
- Vismawanatan M, Tsutsumi K, Correa FMA, Saavedra JM. *BBRC* 179:1361-1367, 1992.
- Vorherr H. *Breast Cancer*, Urban & Schwarzenberg Inc., Baltimore-Munich, 1980.
- Von Figura K, Gieselmann V, Hasilik A. Mannose 6-phosphate specific receptor is a transmembrane protein with a C-terminal extension oriented towards the cytosol. *Biochem J.* 225:543-547, 1985.
- Wakefield LM, Smith DM, Masui T, Harris CC, Sporn MB. Distribution and modulation of the cellular receptor for transforming growth factor-beta. *J. Cell. Biol.* 105:965-975, 1987.
- Wakefield LM, Smith DM, Flanders KC, Sporn MB. Latent transforming growth factor- $\beta$  from human platelets. *J. Biol. Chem.* 263:7646-7654, 1988.
- Wang JL, Hsu YM. Negative regulators of cell growth. *Trends Biochem. Sci.* 11:24-26, 1986.

- Watanabe S, Lazar E, Sporn MB. Transformation of normal rat kidney (NRK) cells by an infections retrovirus carrying a synthetic rat type  $\alpha$  transforming growth factor gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84:1258-1262, 1987.
- Waterfield MD, Scrace GT, Whittle N, Stroobant P, Johnsson A, Wateson A, Westermarck B, Heldin CH, Huang JS, Deuel TF. Platelet-derived growth factor is structurally related to the putative transforming protein p28<sup>sis</sup> of simian sarcoma virus. *Nature* 304:35-39, 1983.
- Werb Z, Rappolee DA. The expression and function of growth factors during early development of mouse embryos. *J. Cell. Biochem. (suppl)* 14E: 48-9, 1990.
- Widowson EM. Development of the digestive system: comparative animals studies. *Am. J. Clin. Nutr.* 41:384, 1985.
- Wilding G, Lippmann ME, Gelmann EP. Effects of steroids hormones and peptide growth factors on protooncogene c-fos expression in human breast cancer cells. *Cancer Res.* 48:802-805, 1988.
- Wittliff JL. Steroid-hormone receptors in breast cancer. *Cancer* 53:630-643, 1984.
- Wong PC, Chiu AT, Duncia JV, y col: Angiotensin II receptor antagonists and receptor subtypes. *Trends. Endocrinol. Metab.* 3: 211-217, 1992.
- Wrba F, Reiner A, Ritzinger E, Holzner JH, Reiner G. Expression of epidermal growth factor- receptors (EGF-R) on breast carcinomas in relation to growth fractions, esrogen receptor status and morphological criteria. An immunohistochemical study. *Pathol. Res. Pract.* 183:25-29, 1988.
- Xu Y-H, Richert N, Ito S, Merlino GT, Pastan I. Characterization of epidermal grotwh factor gene expression in malignant and normal human cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81:7308-7312, 1984.
- Yamamoto T, Nishida T, Miyajima N, Kawai S, Ooi T, Toyoshima K. The erb B gene of avian erythroblastosis virus is a member of the src gene family. *Cell* 35:71-78, 1983.
- Yang YW-H, Ramonus JA, Liu T-Y, Nissley SP, Rechler MM. Biosynthesis of fat insulin-like growth factor II. Immunochemical demonstration of a 20 KDa biosynthetic precursor of rat insulin-like growth factor II in metabolically labeled BRL-3A rat liver cells. *J. Biol. Chem.* 260:2570-2577, 1985a.

Yang YW-H, Rochler MM, Nissley SP, Coligan JE: Biosynthesis of rat insulin-like growth factor II. Localization of mature rat insulin-like growth factor II (7484 daltons) to the amino terminus of the 20-KDa biosynthetic precursor by radiosequence analysis. *J. Biol. Chem.* 260:2578-2582, 1985b.

Yee D, Cullen KJ, Paik S, Perdue JF, Lippman ME, Rosen N. Insulin-like growth factor II expression in human breast cancer. *Cancer Res.* 48:6691-6696, 1988.

Yee D, Paik S, Lebovic GS, Marcus RR, Favoni RE, Cullen KJ, Lippman ME, Rosen N. Analysis of IGF-I gene expression in malignancy: evidence for a paracrine role in human breast cancer. *Mol. Endocrinol.* 3:509-517, 1989.

Zhao Y, Escot CH, Maudelonde T, Puech C, Rouanet P, Rochefort H. Correlation between Mannose-6-P/IGF-II receptor and Cathepsin D RNA levels by in situ hybridization in benign and malignant mammary tumors. *Cancer Res.* 53:2901-2905, 1993.

Zumstein PP, Luthi C, Humbel RE. Amino acid sequence of a variant pro-form of insulin-like growth factor II. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:3139-3172, 1985.