

**NUEVAS PERSPECTIVAS para el
CANCER DE MAMA HUMANO a partir
de MODELOS EXPERIMENTALES**

Simposio Internacional
Academia Nacional de Medicina
Buenos Aires, 4 junio 1997

MEDICINA (Buenos Aires) 1997; 57 (Supl. II): 70-74

**FACTORES DE CRECIMIENTO Y ONCOGENES EN ADENOCARCINOMAS MAMARIOS
INDUCIDOS POR ACETATO DE MEDROXYPROGESTERONA EN RATONES BALB/c**

PATRICIA V. ELIZALDE¹, MARIA EUGENIA BALAÑA², EDUARDO H. CHARREAU¹

Instituto de Biología y Medicina Experimental, Buenos Aires

Resumen Hemos estudiado la participación de los factores de crecimiento (GF), sus receptores (GF-R) y de oncogenes en la proliferación de adenocarcinomas mamarios inducidos por acetato de medroxyprogesterona en ratones Balb/c. Dentro de los GFs mitogénicos en cáncer de mama se encuentra la familia de factores de crecimiento semejante a la insulina (IGF). Tanto los ligandos de esta familia (IGF-I, II) como los dos tipos de receptores (IGF-RI, IGF-RII) están presentes en las líneas hormono-dependientes (MPA-D) e independientes (MPA-I). La transición hacia la hormono-independencia se asocia con un aumento en la expresión de IGF-II y con una disminución en el número de IGF-RII. Bloqueando la expresión endógena de IGF-RI con oligodeoxinucleótidos antisense, en cultivos primarios de líneas MPA-D, hemos demostrado que IGF actúan como reguladores autocrinos/intracrinos de la proliferación mediada por MPA. Otra familia estimuladora del crecimiento en tumores mamarios es la de las heregulinas (HRG), que reconocen como receptores de membrana los oncogenes c-erbB3/c-erbB4. Hemos demostrado que sólo las líneas de histología ductal expresan HRG y que en los tumores hormono-dependientes, MPA induce un significativo aumento en la expresión de HRG. Finalmente, encontramos que los efectos proliferativos de MPA *in vivo* están asociados a la inhibición de la expresión del factor de transformación $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$), que actúa *in vitro* como un potente inhibidor del crecimiento de células epiteliales malignas de los tumores de este modelo experimental.

Palabras clave: cáncer de mama, progesterona, acetato de medroxiprogesterona, factores de crecimiento, oncogenes

Los factores de crecimiento (GF) constituyen un grupo de polipéptidos que participan tanto en la regulación de la proliferación como en la diferenciación celular. La unión de GF con receptores de membrana específicos inicia una cascada de respuestas celulares que involucran una serie de proteínas además del GF y su receptor (GF-R)¹⁻⁴.

Entre las neoplasias malignas, el cáncer de mama constituye un modelo extraordinariamente atractivo para el estudio del rol de los GF en el proceso de transformación maligna. En efecto, es una de las pocas neoplasias en las cuales está definitivamente comprobada la regulación hormonal. Las hormonas sistémicas regulan a su vez la producción local de GF en la glándula mamaria. Estos GF pueden actuar como i) autocrinos (o intracrinos), actúan sobre la misma célula que los sintetiza a través de receptores de superficie o intracelulares, ii) paracrinos, actúan uniéndose a receptores presentes en células próximas a las que los sintetizan y, iii) yuxtacrinos, permanecen anclados en la membrana de

¹ Miembro de la Carrera de Investigador del CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas)

² Becaria del CONICET

Dirección postal: Dra. Patricia Elizalde, Instituto de Biología y Medicina Experimental, Obligado 2490, 1428 Buenos Aires, Argentina

la célula que los sintetiza y ejercen su acción biológica uniéndose a receptores presentes en células vecinas^{5, 6}.

Se ha demostrado claramente que alguna de las respuestas proliferativas inducidas por estrógenos en células epiteliales mamarias normales y neoplásicas, están mediadas por GF cuya síntesis es inducida por estrógenos. Sin embargo, la relación entre la regulación por progestágenos de la expresión de GF y los efectos proliferativos de los progestágenos, sobre células de cáncer de mama, no ha sido completamente dilucidada. En carcinomas mamarios, también se han observado múltiples alteraciones tanto en la expresión (a nivel mRNA y proteína) como en el genoma de distintos oncogenes, algunos de los cuales codifican para GF o sus receptores^{5, 6}.

Nosotros postulamos que los progestágenos también pueden controlar la producción de GF y que sus efectos proliferativos en el modelo experimental de adenocarcinomas mamarios inducidos por acetato de medroxiprogesterona (MPA)^{7, 12}, están mediados por GF actuando en forma autocrina, intracrina y paracrina.

La mayoría de los factores de crecimiento implicados en el desarrollo del cáncer de mama son polipéptidos mitogénicos tales como el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de transformación tipo α (TGF- α) y el resto de los miembros de la familia de factores de crecimiento semejantes al EGF, los factores de crecimiento semejantes a la insulina tipo I y II (IGF-I, IGF-II), el factor de crecimiento de plaquetas (PDGF) y los factores de crecimiento de fibroblastos (FGFs)^{5, 6}. Por el contrario, el factor de transformación tipo β (TGF- β) es el agente más firmemente postulado como inhibidor en el cáncer de mama^{5, 6}.

Familia de factores de crecimiento semejantes a la insulina (IGF-I, IGF-II)

Nuestros estudios en el sistema de IGF en este modelo experimental¹³ han demostrado que todas las líneas tanto hormono-dependientes (MPA-D) como independientes (MPA-I) presentan una expresión comparable a nivel proteína (Tabla 1) y mRNA de IGF-I. También detectamos un contenido semejante del receptor de IGF tipo I (IGF-IR) en los tumores MPA-D y MPA-I (Ta-

TABLA 1.- Cuantificación de IGF-I y de IGF-R tipo I en los adenocarcinomas inducidos por MPA

	IGF-I (ng/g tejido)	IGF-IR (fmol/mg prot)
Líneas MPA-D		
1 (4)	51,5 \pm 6,4	69,3 \pm 4,7
1 MPA (6)	56,5 \pm 6,6	71,4 \pm 6,9
5 (5)	55,5 \pm 7,9	56,5 \pm 4,3
5 MPA (4)	45,8 \pm 5,2	51,3 \pm 5,2
Líneas MPA-I		
1 (6)	54,6 \pm 6,1	70,6 \pm 7,6
5 (6)	51,7 \pm 7,5	61,3 \pm 7,7

Los valores representan la media \pm SD de (n) muestras tumorales

TABLA 2.- Cuantificación de IGF-II y de Man-6P/IGF-R II en los tumores inducidos por MPA

	IGF-II (ng/g tissue)	Man-6P/IGF-R II
Líneas MPA-D		
1 (4)	91,2 \pm 10,7	12.529,23 \pm 3.010,22
1 MPA (4)	292,6 \pm 35,7	5.324,56 \pm 720,39
5 (5)	86,0 \pm 1,5	12.876,53 \pm 2.865,72
5 MPA (4)	346,8 \pm 42,2	4.620,47 \pm 543,89
MPA-I lines		
1 (7)	436,9 \pm 49,4	15.654,99 \pm 4.521,57
5 (3)	4891,2 \pm 45,6	12.342,81 \pm 5.098,31

Los valores representan la media \pm SD de (n) muestras tumorales

bla 1)¹³. La expresión de IGF-II proteína y mRNA fue encontrada en todas las líneas MPA-D y MPA-I. MPA indujo un aumento significativo de sus niveles en los tumores MPA-D. Además, la transición hacia el fenotipo MPA-I estuvo asociada a un incremento constitutivo en los niveles de IGF-II (Tabla 2). Tanto en las líneas MPA-D como MPA-I se detectaron receptores de IGF tipo II (Man-6-P/IGF-R II). En las líneas MPA-D creciendo en animales no tratados con MPA y en las MPA-I se encontró un número semejante de receptores Man-6-P/IGF-R II. Sin embargo, se observaron niveles significativamente más bajos de Man-6P/IGF-R II en las líneas MPA-D creciendo

en ratones tratados con MPA (Tabla 2)¹⁴. IGF-I fue capaz de potenciar el efecto proliferativo de MPA en cultivos primarios de células epiteliales de tumores MPA-D¹⁵. Nuestros resultados indicando la presencia de IGF-I y del receptor de IGF tipo I en todas las líneas tanto MPA-D como MPA-I, junto con el efecto sinérgico de IGF-I y MPA en la proliferación de líneas MPA-D nos llevaron a postular un rol fundamental de IGF-I en la transformación maligna mediada por MPA. De acuerdo a esto, estudiamos la posibilidad de bloquear los efectos proliferativos de MPA con oligodesoxinucleótidos antisense (AODN) al mRNA de IGF-R tipo I. Utilizando esta estrategia hemos demostrado que la inhibición de la expresión del IGF-R tipo I produce una completa supresión del crecimiento mediado por MPA¹⁵.

TGF-β

La expresión de TGF-β, a nivel proteína, fue detectada en los tumores MPA-D y MPA-I¹⁶. En las líneas MPA-D demostramos la presencia de actividades transformantes semejantes a TGF-β de alto (43 kDa) y bajo (13 kDa) peso molecular. MPA indujo una significativa disminución en la síntesis de ambos factores.

Estudiando la expresión a nivel mRNA de TGF-β1 se detectó su mRNA de 2,5 Kba en los tumores MPA-D de animales no tratados con MPA. No se observó este mensaje en los tumores MPA-D de ratones tratados con MPA, ni tampoco en los tumores MPA-I (Fig. 1). Dado que encontramos receptores para TGF-β1 en los tumores MPA-D nuestros datos sugieren que este factor actuaría como un inhibidor autocrino de la proliferación de tumores MPA-D¹⁷.

Para confirmar esta hipótesis trabajamos con cultivos primarios de células epiteliales de líneas MPA-D y MPA-I¹⁸. TGF-β1 inhibió de manera dosis dependiente la estimulación inducida por MPA en células epiteliales de ambos tipos tumorales (Elizalde y col., resultados no publicados).

Subfamilia de GF semejantes al factor de crecimiento epidérmico (EGF) que se unen a c-erbB3/c-erbB4: heregulinas (HRG)

Nuestro interés en el estudio de HRG se basó en los resultados obtenidos estudiando la presencia del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R) y de otro miembro de la familia de receptores con actividad de tirosina quinasa tipo I: c-erbB2. Encontramos una correlación directa

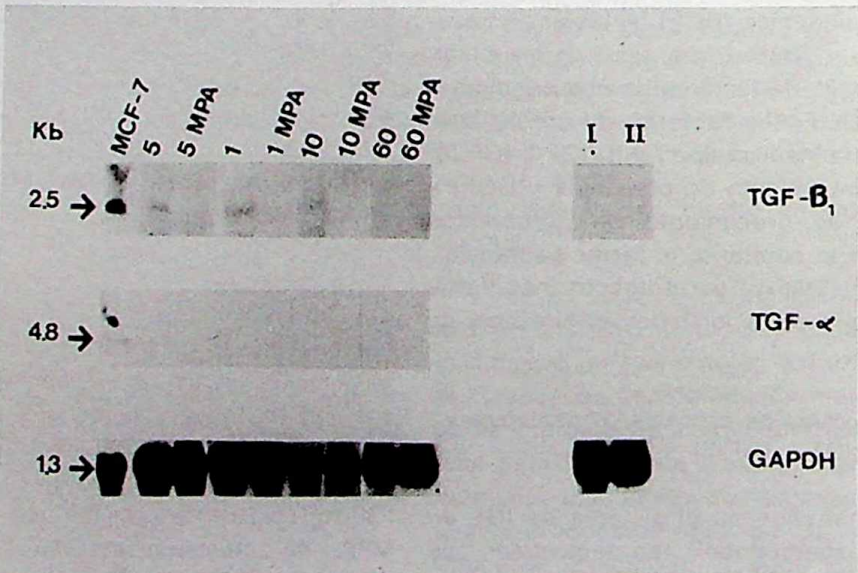


Fig. 1.— Expresión de TGF-β1 y TGF-α en las líneas MPA-D 5, 1 y 10 y en la línea MPA-I 60. Se hibridizaron veinte µg de RNA total con un riboprobe para TGF-β y un cDNA probe para TGF-α. Como control positivo se usó RNA de la línea de cáncer de mama humano MCF-7. MPA indica que el tumor fue obtenido de un ratón tratado con MPA. I y II son muestras de RNA de dos adenocarcinomas mamarios que se originaron espontáneamente en hembras BALB/c multiparas. GAPDH fue usado para corregir pequeñas variaciones en la siembra del gel.

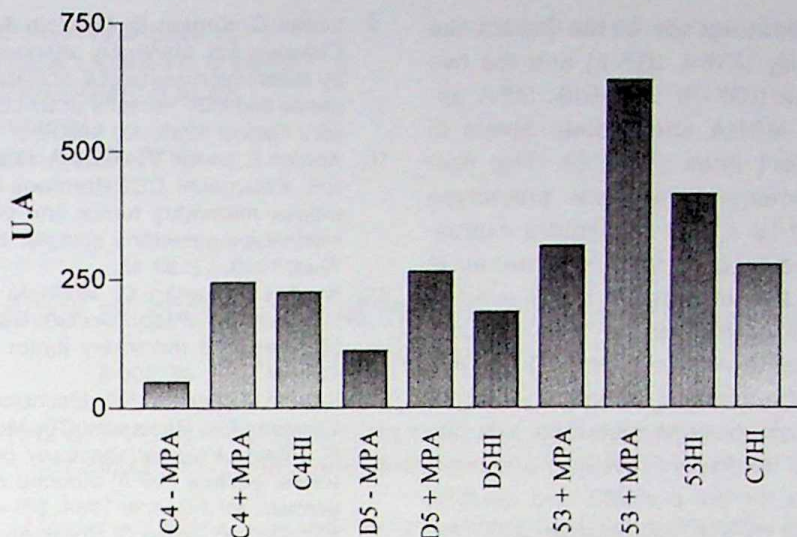


Fig. 2.— Niveles de expresión de HRG en las líneas MPA-D C4, D5 y 53 y en sus variantes MPA-I. La figura representa la cuantificación densitométrica de los niveles de mRNA de HRG encontrados en 3 ensayos de protección a la digestión por RNasa A.

entre la expresión de EGF-R¹², la amplificación de c-erbB2 (Elizalde y col., resultados no publicados) y un fenotipo tumoral lobulillar con ausencia de receptores para estrógenos (ER) y progesterona (PR). Sin embargo, no pudimos detectar síntesis de los ligandos del EGF-R: EGF o TGF- α (Fig. 1)¹⁷. Por lo tanto, investigamos la expresión de la otra subfamilia de GF capaces de unir heparina: heregulinas (en humanos) y factores de diferenciación neu (NDF en ratas). El factor prototípico de esta familia tiene 44 kDa. Esta familia de GF no se une al EGF-R^{5, 6, 19, 20}. Si bien inicialmente se consideró que HRG interactuaba con c-erbB2, se sabe ahora que se une a c-erbB4/c-erbB3, otros dos receptores homólogos al c-erbB2 y con actividad de tirosina quinasa^{5, 6}.

Nosotros hemos clonado y secuenciado dos fragmentos del gen de HRG de ratón localizados en el dominio de Ig demostrando un 92% de homología con el gen de rata y un 87% con el humano. Nuestros estudios de expresión de HRG a nivel mRNA han demostrado que sólo las líneas de histología ductal expresan HRG. MPA induce un aumento significativo en la expresión de HGR y la transición hacia un fenotipo MPA-I está asociada a un aumento constitutivo de la expresión de HRG (Fig. 2). Estos resultados sugieren un rol mitogénico de HRG en los tumores de histología ductal.

En conclusión, nuestros resultados han demostrado i) que los IGF actúan como reguladores autocrinos/intracrinicos de la proliferación me-

diada por MPA; ii) la amplificación del oncogén-erbB2 está asociada a un fenotipo lobulillar ER- y PR-; iii) HRG, la proteína ligando de la familia de receptores c-erbB 3 y 4, actuaría como un factor autocrino positivo en los adenocarcinomas ductales y, iv) los efectos proliferativos de MPA *in vivo* están asociados a la inhibición de la expresión de TGF- β 1, que actúa *in vitro* como un potente inhibidor de la proliferación en células epiteliales malignas de los tumores de este modelo experimental.

Agradecimientos. Los autores agradecen a los Dres. Claudia Lanari y Alfredo A. Molinolo por su valiosa colaboración en la realización y discusión de este trabajo y a la Dra. Christiane Dosne Pasqualini por su colaboración en la etapa inicial de esta investigación. El trabajo fue financiado por subsidios del CONICET y del Collaborative Research Programme ICGEB UNIDO Contract 94120.

Summary

Growth hormones and oncogenes in mammary adenocarcinomas induced by medroxyprogesterone acetate in BALB/c mice

We have studied the involvement of growth factors (GF), their receptors (GF-R) and oncogenes in modulating tumor growth in the medroxyprogesterone acetate (MPA)-induced mammary tumor model in BALB/c mice. We demonstrated

the presence of both ligands of the insulin-like growth factor family (IGF-I, IGF-II) and the two types of receptors (IGF-RI, IGF-RII). MPA up-regulated IGF-II mRNA and protein levels in hormone-dependent lines (MPA-D). The progression to a hormone-independent phenotype was accompanied by a high constitutive expression of IGF-II and by a significant decrease in IGF-IR number. An antisense strategy used to evaluate the role of IGF in the MPA-induced growth of epithelial MPA-D cells showed that IGF mediate progestin-induced mammary tumor growth by autocrine/intracrine pathways. We also studied the role of heregulins (HRG), the recently identified ligands for the c-erbB3 and c-erbB4 oncogenes. HRG mRNA expression was restricted to tumors of ductal origin. MPA induced an *in vivo* up-regulation of HRG expression. Finally, we also found that MPA may be exerting its proliferative effect on MPA-D lines by inhibiting the expression of transforming growth factor β 1, (TGF- β 1) and the lack of expression of TGF- β 1 in hormone-independent tumors may be related to the acquisition of autonomous growth.

Bibliografia

- Bradshaw RA. The control of cell growth: the role of polypeptide growth factors and oncogenes products. *Oncogenes and growth factors*. RA Bradshaw, S Prentis (eds) Amsterdam: Elsevier Science Publishers 1987; p XI-XVI.
- Marx JL. Cell growth control comes under scrutiny. *Science* 1988; 239: 1093-4.
- Goustin AS, Leof EB, Shipley GD, Moses HL. Growth factors and cancer. *Cancer Res* 1986; 46: 1015-29.
- Bascom CC, Sipes NJ, Coffey RJ, Moses HL. Regulation of cell proliferation by transforming growth factors. *J Cell Biochem* 1989; 39: 25-32.
- Dickson RB, Lippman ME. Growth factors in breast cancer. *Endocrine Rev* 1995; 16: 559-89.
- Kenney NJ, Dickson RB. Growth factors and sex steroid interactions in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 1996; 1: 189-198.
- Lanari C, Molinolo AA, Pasqualini CD. Induction of mammary adenocarcinomas by medroxyprogesterone acetate in BALB/c female mice. *Cancer Lett* 1986; 33: 215-23.
- Molinolo AA, Lanari C, Charreau EH, San Juan N, Pasqualini CD. Mouse mammary tumors induced by medroxyprogesterone acetate: immunochemistry and hormonal receptors. *J Natl Cancer Inst* 1987; 79: 1341-50.
- Lanari C, Kordon E, Molinolo AA, Pasqualini CD, Charreau EH. Mammary adenocarcinomas induced by medroxyprogesterone acetate: hormone dependence and EGF receptor of BALB/c *in vivo* sublines. *Int J Cancer* 1989; 43: 845-850.
- Kordon E, Lanari C, Meiss R, Elizalde PV, Charreau EH, Pasqualini CD. Hormone dependence of a mouse mammary tumor line induced *in vivo* by medroxyprogesterone acetate. *Breast Cancer Res Treat* 1990; 17: 33-43.
- Kordon E, Lanari C, Molinolo AA, Elizalde PV, Charreau EH, Pasqualini CD. Estrogen inhibition of MPA-induced mammary tumor transplants. *Int J Cancer* 1991; 49: 900-5.
- Kordon E, Guerra FK, Molinolo AA, Elizalde PV, Charreau EH, Pasqualini CD, Montecchia F, Lanari C. Effect of sialoadenectomy on medroxyprogesterone acetate (MPA)-induced mammary carcinogenesis. *Int J Cancer* 1994; 59: 196-203.
- Elizalde PV, Lanari C, Bussman L, Kordon E, Guerra, FK, Savin M, Charreau EH. Insulin-like growth factor I production and receptors in mammary adenocarcinomas induced by medroxyprogesterone acetate in Balb/c mice. *J Exp Clin Cancer Res* 1990; 9: 193-203.
- Charreau EH, Elizalde PV, Guerra FK, Lanari C, Kordon E, Pasqualini CD. Growth factors in murine mammary adenocarcinomas induced by progestins. In: *Hormonal Carcinogenesis*. JJ Li, S Nandi (eds). New York: Springer-Verlag 1992; 138-44.
- Elizalde PV, Guerra F, Balaña ME, Lanari C, Molinolo A, Iribarren A, Lupu R, Charreau EH. Role on insulin-like growth factors I and II in medroxyprogesterone acetate (MPA)-induced mouse mammary tumors. *Proc Am Assoc Cancer Res* 1997; 38: 56.
- Elizalde PV, Lanari C, Kordon E, Tezon J, Charreau EH. TGF- β -like activities *in vivo* lines of hormonally dependent and independent mammary adenocarcinomas induced by medroxyprogesterone acetate in Balb/c mice. *Breast Cancer Res Treat* 1990; 16: 29-39.
- Elizalde PV, Guerra FK, Gravano M, Lanari C, Lippman ME, Charreau EH, Lupu R. Correlation of TGF- β 1 expression with medroxyprogesterone acetate in mouse mammary adenocarcinomas. *Cancer Investigation* 1995; 13: 173-80.
- Dran G, Luthy IA, Molinolo AA, Montecchia F, Charreau EH, Pasqualini CD, Lanari C. Effect of medroxyprogesterone acetate (MPA) and serum factors on cell proliferation in primary cultures of an MPA-induced mammary adenocarcinomas. *Breast Cancer Res Treat* 1995; 35: 173-86.
- Holmes WE, Sliwkowski MX, Akita RW, Henzel WJ, Lee J, Park JW, et al. Identification of heregulin a specific activator of p185 erbB2. *Science* 1992; 256: 1205-10.
- Dobashi K, Davies JG, Mikami Y, Freeman JK, Hamuro J, Greene MI. Characterization of a neu/c-erbB2 protein specific activating factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 8582-6.