

FACTORES DE CRECIMIENTO COMO INTERMEDIARIOS DE LA ACCIÓN DE ESTEROIDES EN LA PROLIFERACIÓN CELULAR

Eduardo H. Charreau

Instituto de Biología y Medicina Experimental, CONICET y Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

Resumen

En el presente estudio se investigó la relación existente entre las vías de señalización de la progesterona y del factor de crecimiento heregulina (HRG) en tumores mamarios.

Se utilizó un modelo experimental de carcinogénesis hormonal en el cual el progestágeno sintético acetato de medroxiprogesterona (MPA) indujo adenocarcinomas mamarios en ratones hembras del tipo Balb/c. MPA produjo una regulación *in vivo* de la expresión del mRNA de HRG en las líneas tumorales progestágeno-dependientes (HD). La progresión de los tumores mamarios a un fenotipo progestágeno-independiente (HI) estuvo acompañada de una alta expresión constitutiva de HRG. El mensaje de HRG fue identificado en las células del epitelio tumoral y no en los fibroblastos adyacentes. Se utilizaron los cultivos primarios de las células epiteliales malignas de una línea tumoral HD para investigar la participación de HRG en la proliferación celular. El HRG indujo un potente efecto proliferativo en estas células y potenció los efectos mitogénicos de MPA. Al bloquear la síntesis de HRG endógena por oligodeoxinucleótidos antisentido (ASODN) para mRNA HRG se inhibió el crecimiento celular inducido por MPA, indicando así que la heregulina actúa como mediadora del crecimiento celular inducido por MPA. En las células HD se encontraron altos niveles de expresión de ErbB-2 y ErbB-3 y bajos niveles de ErbB-4. El tratamiento de estas células con MPA o HRG dio como resultado fosforilación en tirosina de ErbB-2 y ErbB-3. Además, se inhibieron los efectos proliferativos de HRG y MPA cuando se trató a las células con ASODN para mRNA ErbB-2, proporcionando así evidencia de un papel crítico del ErbB-2 en el crecimiento inducido por HRG. Finalmente, el bloqueo de la expresión del receptor del factor de crecimiento semejante a la insulina tipo 1 (IGF-IR) con ASODN dio como resultado la inhibición total del efecto proliferativo de HRG, demostrando así que se requiere un IGF-IR funcional para manifestar la actividad mitogénica de HRG. Estos resultados proporcionan la primera evidencia de interacción entre la progesterona y las rutas de transducción de señales HRG/ErbB en el cáncer de mama y la primera demostración de la necesidad de la presencia del receptor de IGF-I para observar los efectos proliferativos de la heregulina.

Abstract

The present study addressed links between progestin and heregulin (HRG) signaling pathways in mammary tumors. An experimental model of hormonal carcinogenesis, in which the synthetic progestin medroxyprogesterone acetate (MPA)

Conferencia pronunciada en su incorporación como Académico Titular, el 4 de julio de 1997.

induced mammary adenocarcinomas in female Balb/c mice, was used. MPA induced an in vivo up-regulation of HRG mRNA expression in progestin-dependent (HD) tumor lines. Mammary tumor progression to a progestin-independent (HI) phenotype was accompanied by a high constitutive expression of HRG. The HRG message arose from the tumor epithelial cells. Primary cultures of malignant epithelial cells from a HD tumor line were used to investigate HRG involvement on cell proliferation. HRG induced a potent proliferative effect on these cells and potentiated MPA mitogenic effects. Blocking endogenous HRG synthesis by antisense oligodeoxynucleotides (ASODNs) to HRG mRNA inhibited MPA-induced cell growth, indicating that HRG acts as a mediator of MPA-induced growth. High levels of ErbB-2 and ErbB-3 expression and low ErbB-4 levels were found in HD cells. Treatment of these cells with either MPA or HRG resulted in tyrosine phosphorylation of both ErbB-2 and ErbB-3. Furthermore, both HRG and MPA proliferative effects were abolished when cells were treated with ASODNs to ErbB-2 mRNA, providing evidence for a critical role of ErbB-2 in HRG-induced growth. Finally, blocking type I insulin-like growth factor receptor (IGF-IR) expression with ASODN resulted in the complete inhibition of HRG proliferative effect, demonstrating that a functional IGF-IR is required for HRG mitogenic activity. These results provide the first evidence of interactions between progestins and HRG/ErbB signal transduction pathways in mammary cancer and the first demonstration that IGF-IR is required for HRG proliferative effects.

Introducción

La familia de las heregulinas o del factor de diferenciación Neu (NDF) comprende una serie de polipéptidos que comparten una fracción de estructura similar al factor de crecimiento epidérmico (EGF) que actúa como dominio de enlace con receptores (Peles y Yarden, 1993; Wen y al., 1994). De acuerdo con la estructura de esta región, se pueden distinguir dos subclases principales de variantes de HRG, alfa y beta (Carraway y Cantley, 1994). HRG ejerce una variedad de acciones fisiológicas mediante una señalización combinatoria única. Dos miembros de la familia de receptores con actividad de quinasas de tirosina-tipo 1 (RTKs-I), el ErbB-3 y el ErbB-4 actúan como mediadores de funciones de la HRG (Carraway y Cantley 1994). Los otros miembros de la familia de las RTKs-I, ErbB-1 (o EGF-R) y ErbB-2 son los co-receptores (Pinkas-Kramarski et al., 1997). La activación de RTKs - I mediante HRG inicia las cascadas de transducción de señales involucradas en las respuestas celulares tales como la proliferación y la diferenciación. El tratamiento con HRG de las células cancerosas mamarias induce la activación de las quinasas Erk/MAP (Marte et al., 1995 A, Sepp-Lorenzino et al., 1996) quinasas Jnk/SAP (quinasas de proteínas activadas por

stress) (Amundadottir y Leder, 1998), quinasas p70/p85 S6 (Marte et al., 1995^a) y la fosfoinositol 3 -quinasa (PI-3K) (Sepp-Lorenzino et al., 1996, Amundadottir y Leder, 1998).

Es particularmente interesante el papel del ErbB-3 en la activación de PI-3K, ya que ErbB-3 posee la capacidad única entre RTKs-I de promover su unión con la subunidad regulatoria p85 de PI-3K (Carraway y Cantley, 1994, Fedi et al., 1994, Graus-Porta et al., 1997). La capacidad de ErbB-3 para asociarse con PI-3K le otorga a este receptor la posibilidad de compartir rutas de señalización con factores de crecimiento semejantes a la insulina (IGFs) porque la activación del receptor IGF tipo 1 da como resultado la fosforilación en tirosina de la proteína IRS-1 que a su vez se une a p85 y provoca su activación (Backer et al., 1993).

Los efectos biológicos de HRG presentan variaciones que dependen del tipo celular, la isoforma de HRG, y los complementos celulares de RTKs-I disponibles para componer heterodímeros funcionales. Algunas isoformas de la HRG son conocidas por inducir la detención del crecimiento y la diferenciación de las células epiteliales mamarias, mientras que otras células mamarias responden mitogénicamente (Yang et al., 1995, Marte et al., 1996b, Ram et al., 1995). Se han informa-

do también, efectos estimulatorios (Holmes et al., 1992, Lewis et al., 1996) e inhibitorios (Peles et al., 1992; Bacus et al., 1993; Culoucou et al., 1993) de HRG en la proliferación de las líneas celulares de cáncer mamario, expresando difentes niveles de ErbB-2. Además se ha encontrado un efecto bifásico de HRG en la proliferación de células que sobreexpresan ErbB-2. En la línea celular BT-474, HRG en bajas dosis induce el crecimiento celular y en dosis elevadas inhibe la proliferación (Grunt et al., 1995). Se amplió la evidencia de la participación de la HRG en la carcinogénesis mamaria por la sobreexpresión de HRG en ratones transgénicos (en estos ratones hembras, los adenocarcinomas mamarios surgen de manera estocástica luego de varias preñeces (Krane y Leder, 1996).

Se han descrito los enlaces entre la ruta de señalización HRG/ErbB-2 y el receptor de estrógeno (ER). El tratamiento de líneas celulares cancerosas mamarias hormonodependientes con HRG da como resultado una disminución de la expresión de ER (Saceda et al., 1996; Pietras et al., 1995). Sin embargo, es aún un punto de controversia si la desregulación de ER inducida por HRG es seguida por inducción (Pietras et al., 1995) o por inhibición (Saceda et al., 1996) de la actividad de ER. Por otra parte, el tratamiento de las células cancerosas mamarias con estrógenos da como resultado una disminución de la expresión de ErbB-2 (Grunt et al., 1995).

El objetivo del presente estudio fue el de investigar las interacciones entre los progestágenos y las rutas de señalización de la HRG usando el modelo bien caracterizado de carcinogénesis hormonal en el cual el progestágeno sintético acetato de medroxiprogesterona induce adenocarcinomas mamarios en ratones hembras Balb/c (Molinolo et al., 1987; Lanari et al., 1989). La mayoría de los tumores inducidos por MPA son de origen ductal, expresan altos niveles de receptores de progesterona y estradiol y se mantienen mediante trasplantes singeneicos en ratones tratados con MPA, demostrando un patrón de crecimiento progestágeno-dependiente (HD) (Lanari et al., 1989). Mediante trasplante a ratones libres de tratamiento se generaron variantes de tumores con un patrón de crecimiento independiente de MPA (HI). Estos tu-

moreos HI expresan el mismo contenido de ER y PR que sus correspondientes HD parentales (Lanari et al., 1989). Finalmente, MPA induce una pequeña cantidad de carcinomas mamarios lobulillares carentes de expresión de ER y PR y evidencian un comportamiento independiente de MPA (HI) (Molinolo et al., 1987; Lanari et al., 1989).

Encontramos que la expresión de HRG *in vivo* en tumores HD está bajo control de MPA. La progresión tumoral mamaria hacia un fenotipo hormono-independiente está acompañada por un expresión altamente constitutiva de HRG. Hemos utilizado cultivos primarios de células epiteliales de una línea tumoral HD para estudiar la participación de HRG en el crecimiento celular y demostrar que la HRG estimula la proliferación celular y puede potenciar los efectos proliferativos de MPA. El tratamiento con MPA y HRG de las células HD da como resultado una fosforilación en tirosina de ErbB-2 y ErbB-3. Hemos bloqueado la expresión de HRG y ErbB2 utilizando oligodeoxinucleótidos antisentido (ASODN) y hemos demostrado que la HRG actúa como mediador de la proliferación inducida por MPA y que el ErbB-2 es esencial en esta vía mitogénica. Finalmente hemos demostrado por primera vez, según nuestro conocimiento, la necesidad de la presencia del receptor del factor de crecimiento IGF-I para que se evidencie la actividad biológica de la heregulina .

Resultados

Expresión del mensajero de heregulina en líneas in vivo de tumores mamarios inducidos por MPA.

A fin de obtener sondas homólogas para el análisis de la expresión de heregulina en los tumores mamarios murinos, se clonaron dos fragmentos de HRG murino utilizando las técnicas de PCR y cDNAs obtenidos a partir de tumores HD de nuestro modelo experimental. El análisis secuencial de los fragmentos localizados en el dominio Ig (fragmento 1) y en el dominio de la cola citoplásmica (fragmento 2) demostraron un alto grado de homología con los genes de la rata (Wen et al., 1992) fragmento 1: 89%, fragmento 2: 92%

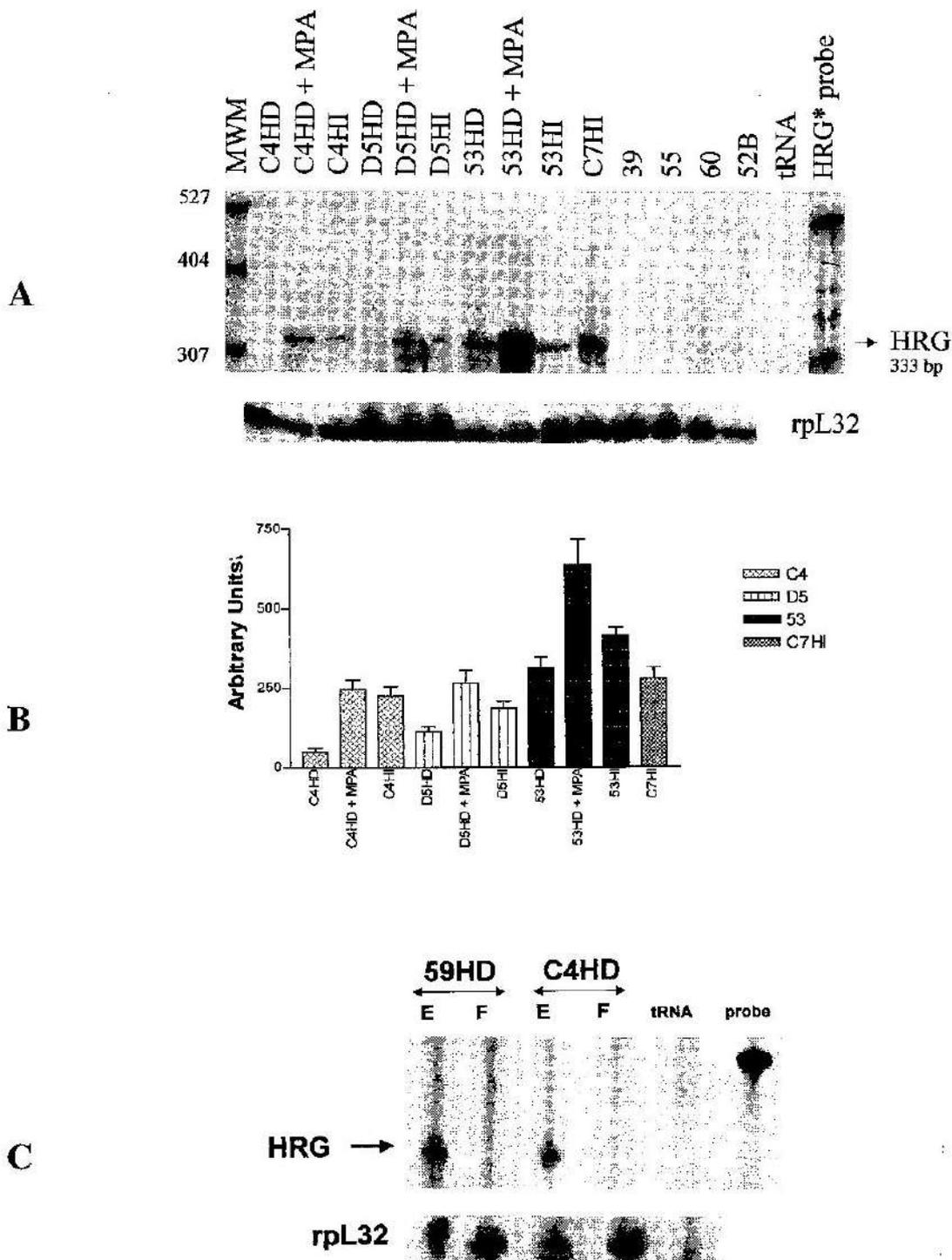


Fig. 1. Expresión de heregulina en adenocarcinomas mamarios inducidos por MPA. A) Treinta microgramos de RNA total fueron estudiados mediante la técnica de protección a RNAsas hibridándolos con sondas para HRG y rpL32. El fragmento protegido para la ERG es de 333 bp y para rpL32 es de 76 bp. MWM: marcadores de peso molecular; +MPA: tumores en crecimiento en animales tratados con MPA. B) Cuantificación del mensajero para HRG. Las señales de las hibridaciones fueron medidas densitométricamente y normalizadas con el control rpL32. El histograma representa los datos de cuatro experimentos con las correspondientes desviaciones estándar del promedio. C) Localización celular de HRG. Los ensayos fueron realizados con RNAs provenientes de cultivos de células epiteliales (E) y fibroblastos (F) de los tumores 59 y C4 HD.

y con genes de HRG humano (Lupu y Lippman 1993) fragmento 1: 83 % fragmento 2: 89%.

La expresión de HRG se estudió mediante ensayos de protección a la RNAsa utilizando el fragmento 1 como sonda. Esta sonda reconoce ambas isoformas de la heregulina.

En el presente estudio se incluyeron los tres tipos de tumores del modelo de carcinogénesis mamaria inducido por MPA ya mencionado.

La expresión *in vivo* del mRNA de HRG se encontró en líneas tumorales hormono dependiente C4, D5 y 53. Se detectó un aumento significativo del mensajero de 2 a 5 veces en tumores desarrollados en ratones tratados con MPA, en comparación con los mismos tumores desarrollados en ratones libres de tratamiento (Figura 1 A y B). El mensajero de HRG también se detectó en las variantes HI de origen ductal, con niveles similares a los observados en tumores HD desarrollados en ratones tratados con MPA (Figura 1 A y B). Sin embargo, el mensaje no fue evidenciado en las líneas HI de histología lobulillar 39,55,60 y 52B (Figura 1 A).

Localización celular del mensajero de heregulina .

A fin de identificar el origen celular de HRG, se investigaron los RNA obtenidos de cultivos primarios de células epiteliales y fibroblastos tumorales. La expresión de mRNA HRG se limitó a células de origen epitelial. En la Figura 1C se muestran los resultados representativos en tumores 59HD y C4HD.

Participación de HRG en la proliferación de los cultivos primarios de la línea tumoral C4HD.

La línea tumoral C4HD fue seleccionada para estudiar la participación de HRG en el crecimiento *in vivo*, porque ha sido extensamente caracterizada en relación a su respuesta al MPA y por su comportamiento proliferativo *in vitro* (Dran et al., 1995). Además la línea C4HD expresa el menor nivel de HRG endógeno entre las líneas HD estudiadas, posibilitando la detección de efectos bio-

lógicos cuando se añade HRG en forma exógena.

Expresión del receptor ErbB.

Primero investigamos los complementos celulares del receptor ErbB expresado en las células C4HD. Se realizó Western Blot en lisados de células C4HD con anticuerpos para ErbB-2, ErbB-3 y ErbB-4. Como control para los niveles de la expresión de ErbB-2 se usó la línea celular MCF-7 de cáncer de mama humano que contiene bajos niveles de ErbB-2. Las células C4HD expresaron significativamente niveles superiores de ErbB-2 que las células MCF-7 (de tres a cinco veces), comparables a las consideradas como sobreexpresión en líneas celulares de cáncer de mama humano (Figura 2) (Lupu y Lippman, 1993). Los niveles de ErbB-3 también fueron altos y comparables con la expresión de ErbB-2. Nuestro análisis de la expresión de ErbB-4 en estas células usando un panel de anticuerpos específicos para ErbB-4, indicó que la expresión de ErbB-4 fue significativamente menor que para ErbB-2 o ErbB-3.

HRG estimula la proliferación de cultivos epiteliales de la línea tumoral C4HD.

La actividad mitogénica de la heregulina fue evidenciada mediante el agregado de HRGb1 en concentraciones que varían de 0,02 a 200 ng/ml a cultivos de células tumorales epiteliales C4HD y la medición de la incorporación de 3H-timidina. HRGb1 en concentraciones de 2ng/ml y mayores aumentó significativamente la incorporación de 3H-timidina respecto a las células controles creciendo en 2,5% de suero fetal bovino libre de esteroides (ChFCS) (Figura 3). Además, la HRG (20-200 ng/ml) fue capaz de potenciar los efectos estimulatorios de MPA (Figura 3).

Oligodeoxinucleótidos antisentido para mRNA HRG inhiben la proliferación de células C4HD.

La incubación de células epiteliales C4HD con oligodeoxinucleótidos antisentido (ASODNs) para mRNA HRG dio como resultado una inhibición, de la proliferación celu-

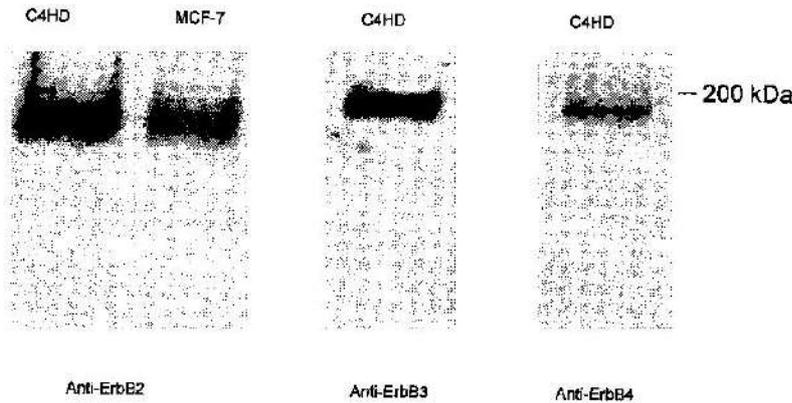


Fig. 2. Expresión de receptores ErbB en células epiteliales del tumor C4HD. Se realizó electroforesis de ochenta microgramos de proteínas provenientes de lisados celulares del tumor C4HD. La identificación fue realizada mediante anticuerpos específicos para ErbB2, ErbB3 y ErbB4. Extractos de las células MCF-7 fueron utilizados como control de expresión de los niveles de ErbB2.

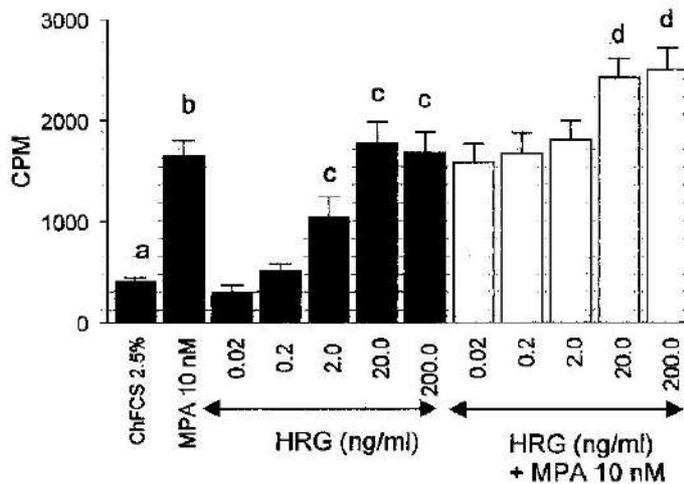


Fig. 3. Efecto de la heregulina sobre la proliferación de las células C4HD en cultivo. Cultivos primarios de células epiteliales del tumor C4HD se incubaron con medio conteniendo 2,5% de suero fetal bovino libre de esteroides suplementado con 10 nM MPA, heregulina en diferentes concentraciones y MPA con HRG. La incorporación de ^3H -timidina fue utilizada como parámetro de síntesis de DNA. b vs a, c vs a: $p < 0.001$. Los datos presentados son promedio \pm SD de tres experimentos.

lar mediada por MPA (Figura 4A). La adición de HRGb1 a las células C4HD tratadas con ASODNs revirtió completamente la inhibición del crecimiento (Figura 4A). Los oligonucleótidos controles *sense* (SODNs) y *scrambled*, en las mismas concentraciones (Figura 4) no tuvieron efecto alguno en el crecimiento celular. El crecimiento basal de células C4HD, también fue inhibido por ASODNs (Figura

4A). No hubo evidencia de toxicidad celular en respuesta a la adición de ODNs. La evaluación del efecto de los oligodeoxinucleótidos en la expresión de HRG fue realizada mediante *immunoblotting* de lisados de células C4HD. La evaluación densitométrica demostró que se redujeron los niveles de HRG en 76% luego de tratamiento de ASODN 4 μM , mientras que los SODNs no modificaron los niveles de

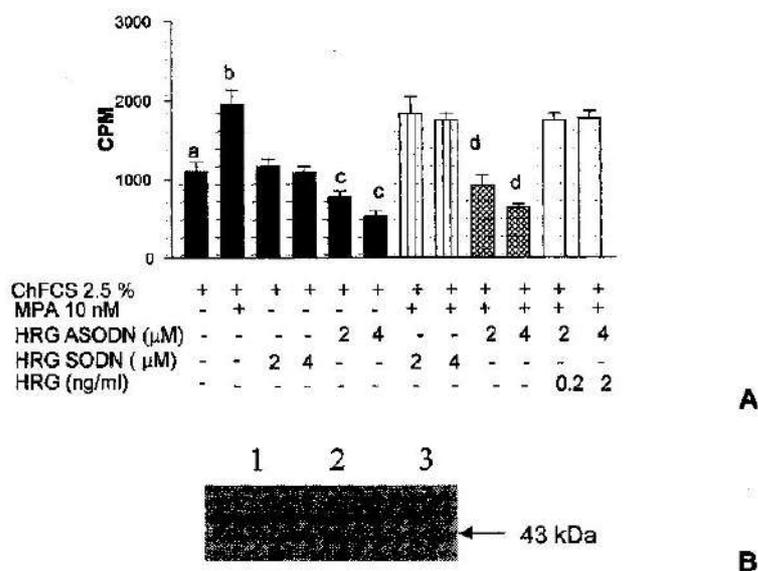


Fig. 4. Inhibición de la proliferación de las células C4HD por oligodeoxinucleótidos antisentido del mensajero de heregulina. **A)** Células epiteliales del tumor C4HD fueron incubadas durante 48 horas con ASDNAs para HRG mRNA, con 10 nM MPA + 4 μ M ASODN suplementados con 2ng/ml de HRG. La incorporación de timidina tritiada fue evaluada como índice de síntesis de DNA. Los datos representan el promedio \pm SD de cuatro experimentos. b vs a, c vs a, y d vs b: $p < 0.001$. **B)** Efecto de HRG ASODNs sobre la síntesis de heregulina. Ochenta μ g de proteínas de lisados de células del tumor C4HD fueron sometidos a electroforesis en gels de poliacrilamida, transferidos a membranas de nitrocelulosa y revelados con anticuerpos específicos para HRG. Línea 1: células creciendo en medio conteniendo 10 nM MPA, línea 2: 10 nM MPA + 4 μ M SODN; línea 3: 10 nM MPA + 4 μ M ASODN. El análisis densitométrico de la banda correspondiente a HRG está expresado como porcentaje del control.

este factor (Figura 4B).

Fosforilación en tirosina de la familia de receptores ErbB.

A fin de ampliar nuestras observaciones de que HRG puede actuar como mediador de los efectos proliferativos de MPA, estudiamos el nivel de la fosforilación en tirosina de los receptores ErbB como marcadores de activación. Por lo tanto, se realizó inmunoprecipitación de extractos de células C4HD tratadas con MPA o HRG con anticuerpos anti ErbB-2 o ErbB-3 y se determinó el contenido de fosfotirosina de estos receptores mediante Western blotting con un anticuerpo anti-fosfotirosina. La Figura 5 muestra que la fosforilación de la tirosina de ambos receptores fue indetectable en las células que crecen en 2,5% ChFCS, mientras que MPA y HRG indujeron una fuerte fosforilación tanto de ErbB-2 como

de ErbB-3.

Oligodeoxinucleotidos antisentido del mRNA ErbB-2 inhiben tanto la proliferación de células C4HD inducida por MPA como por HRG.

La incubación de las células C4HD con ASODNs del mRNA ErbB-2 inhibió la proliferación mediada por HRG (Figura 6A). Nuestros resultados indican que el crecimiento inducido por MPA de las células C4HD está mediado por HRG, produciendo la activación de ErbB-2 y ErbB-3, por ello investigamos si ErbB-2 es un componente crítico en esta ruta de señalización. La incubación de células C4HD con ASODN a ErbB-2 dio como resultado una inhibición de la proliferación celular mediada por MPA (Figura 6A).

El efecto de los ODNs a ErbB-2 sobre la expresión de proteínas se evaluó mediante inmunodetección en lisados de células C4HD.

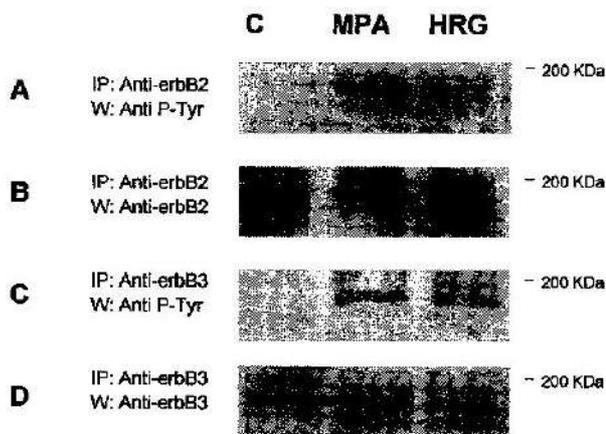


Fig. 5. Inducción de la fosforilación en tirosina de ErbB2 y ErbB3 por MPA y HRG. Cultivos primarios de células epiteliales del tumor C4HD fueron tratados con 10 nM MPA o 2ng/ml HRG. Como control se utilizaron células creciendo en medio de cultivo conteniendo 2,5% suero fetal bovino libre de esteroides. De los lisados celulares se inmunoprecipitaron ErbB2 y ErbB3 y los inmunocomplejos fueron sometidos a electroforesis y analizados por Western blot con un anticuerpo monoclonar anti P-tirosina (A y C). Alícuotas equivalentes de cada inmunoprecipitado fueron analizadas con anti ErbB2 (B) o anti ErbB3 (D). W: western blot; IP: inmunoprecipitación.

La Figura 6B muestra los resultados obtenidos cuando se usó ASODNs para inhibir la proliferación inducida por MPA. La evaluación densitométrica demostró que los niveles de ErbB-2 se redujeron en un 68% luego de tratamiento con 2mM ASODNs mientras que SODNs no redujeron los niveles de ErbB-2. Se obtuvo una inhibición similar de la expresión de la proteína ErbB-2 cuando se usó ASODNs para inhibir el crecimiento estimulado por HRG.

Oligodeoxinucleótidos antisentido para el mRNA del receptor de factor de crecimiento semejante a la insulina tipo 1 (IGF-IR) inhiben la proliferación inducida por HRG en las células C4-HD.

Hemos demostrado previamente, mediante el uso de oligodeoxinucleótidos

antisentido para mRNA IGF-IR, que se requiere un IGF-IR funcional para evidenciar la proliferación inducida por MPA en las células HD (Elizalde et al., 1998). Por lo tanto, decidimos investigar si la HRG también requería la presencia de un receptor de IGF-I funcional para demostrar su actividad mitogénica. La Figura 7 muestra que el tratamiento de las células C4HD con ASODNs para IGF-IR dio como resultado una inhibición completa de la proliferación inducida por HRG de las células C4HD. Las células tratadas con ASODNs mostraron una disminución de 78% en la cantidad de IGF-IR según el análisis de Scatchard. La cantidad de receptores en las células epiteliales controles C4HD tratadas con SODNs fue de 48,6 +4,1 fmol/mg proteína, mientras que en las células tratadas con ASODNs fue de 10,5+1,1 fmol/mg proteína.

Discusión

En el presente estudio, hemos detectado la expresión HRG en líneas tumorales *in vivo* de un modelo de carcinogenesis mamaria inducido por MPA en ratones Balb/c (Molinolo et al., 1987; Lanari et al., 1989). El mensajero de HRG se confinó a tumores de origen ductal, ER y PR positivos, no encontrándose en tumores de histología lobulillar carentes de receptores hormonales esteroideos. La expresión de mRNA HRG fue estudiada por otros autores, en un número pequeño de carcinomas mamarios primarios humanos (Normanno et al., 1993, 1995) no encontrando correlaciones entre su expresión, el estado nodular y la presencia de EGF-R o ErbB-2 (Normanno et al., 1993, 1995). Algunos autores han descrito una asociación entre la expresión HRG y ausencia de metástasis en nódulos linfáticos en tumores mamarios humanos (Bacus et al., 1993). Se ha descrito también, que la síntesis de mRNA HRG estaba muy restringida a las líneas celulares de cáncer mamario (Normanno et al., 1993; Lupu y Lippmann, 1993) y no era afectada por 17 β -estradiol en las células MCF-7 (Normanno et al., 1993).

En nuestros estudios, hemos encontrado que el MPA indujo un regulación *in vivo* de los niveles de mRNA HRG en las líneas

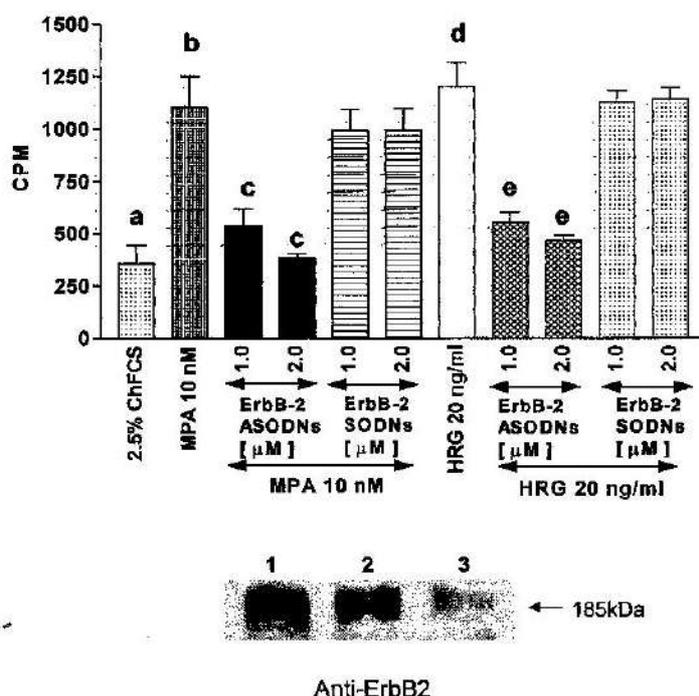


Fig. 6. Inhibición de la producción de HRG y de la proliferación inducida por MPA mediante la utilización de oligodeoxinucleótidos antisentido (ASDNs) del ErbB2-mRNA. **A)** Cultivos primarios de células epiteliales de tumores C4HD fueron incubados durante 48 horas en medio con 2,5% de suero fetal bovino suplementado con 10 nM MPA, 20ng/ml HRG, MPA o HRG + ASODNs o SODNs para ErbB2-mRNA. Los datos son promedio de cuatro experimentos, b vs a y c vs b, d vs a, e vs d ;p<0.001. **B)** Efecto del ASDNs sobre la síntesis proteica de ErbB2. Western blot de; línea 1: extractos de células creciendo en 10 nM MPA; línea 2: 10 nM MPA + 2μM SODN; línea 3: 10 nM MPA + 2μM ASDN. El análisis densitométrico de la banda de ErbB2 se expresa como porcentaje del control.

HD. Según nuestro conocimiento, este es el primer estudio que explora la regulación por progestágenos de la síntesis de HRG en cáncer mamario; no obstante Yang et al. (1995), demostraron que la expresión de HRG en la glándula mamaria del ratón está bajo estricto control hormonal. La HRG se expresa en las células mesénquimáticas adyacentes al epitelio ductal durante el desarrollo lóbulo-alveolar en la preñez. El mensajero de HRG no fue detectado durante el período prepube-ral y su expresión disminuyó abruptamente durante la lactancia y está ausente durante la involución glandular (Yang et al., 1995). Estos descubrimientos, como los nuestros, sugieren que la progesterona controla la síntesis de HRG. Sin embargo, en nuestro modelo tumoral mamario, la fuente de HRG es la célula epitelial maligna, que también expre-

sa los receptores de HRG ErbB-3 y ErbB-4 y el coreceptor ErbB-2. De esta forma, el cambio realizado de un rol parácrino del HRG en la glándula mamaria normal a un rol autócrino en el cáncer mamario, puede reflejar una subversión de los mecanismos normales de control del crecimiento, que da como resultado una ventaja proliferativa para las células tumorales.

La progresión a un fenotipo hormo-no-independiente de los tumores ductales estuvo acompañada por una expresión altamente constitutiva de HRG. Este descubrimiento concuerda con los resultados anteriores (Pietras et al., 1995) que demostraron que la transfección estable de las células MCF-7 con un gen completo de HRG que produce la sobreexpresión de HRG posibilitó que las células transfectadas MCF-7 crezcan en ratas atí-

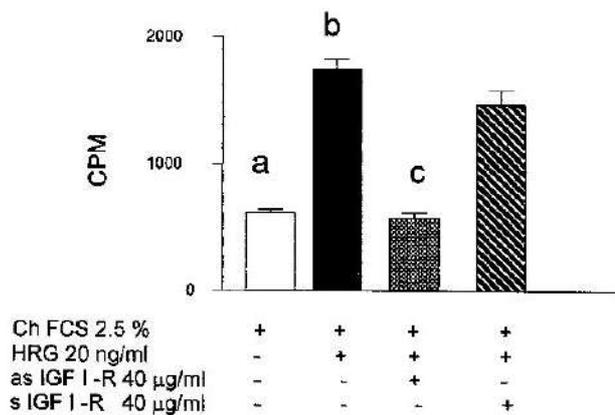


Fig. 7. Inhibición de la proliferación celular de las células C4HD, inducida por HRG, mediante oligonucleótidos antisentido para el mRNA del receptor de IGF-I. Cultivos primarios de células epiteliales C4HD fueron incubadas durante 48 horas en medio con 2,5% suero fetal bovino libre de esteroides suplementado con 20ng/ml HRG o 20ng/ml HRG + 40 ng ASODNs o SODNs para IGF-IR mRNA. Se determinó la incorporación de timidina tritiada como índice de síntesis de DNA. Los resultados son promedio de tres experimentos; b vs a; c vs b: $p < 0.001$.

micas, ovariectomizadas sin suplemento de estrógenos. En forma similar, el crecimiento estrógeno-independiente y la resistencia a antiestrógenos *in vitro* e *in vivo*, se observó cuando las células MCF-7 fueron transfectadas con el gen mencionado (Tang et al., 1996). Además se demostró que la transfección de células MCF-7 con HRG cDNA o el tratamiento de estas células con HRG provocó una disminución significativa en la expresión del receptor estrogénico (Pietras et al., 1995, Saceda et al. 1996). La exposición prolongada de las células MCF-7 a HRG también dio como resultado una disminución del contenido de PR (Pietras et al., 1995). Al respecto, es importante destacar que en nuestro modelo *in vivo*, la progresión hacia un fenotipo hormono-independiente asociada con una alta expresión constitutiva de HRG, no involucra ningún cambio en el número ni en la afinidad de los receptores para estradiol y progesterona.

Los estudios *in vitro* de los efectos del HRG exógeno sobre el crecimiento de cultivos

primarios de células epiteliales C4HD demostró que la HRG es capaz de inducir una respuesta proliferativa tan potente como el MPA en estas células. Además la HRG potenció los efectos estimulatorios de MPA. Aún debe dilucidarse si los efectos proliferativos de HRG y la potenciación del crecimiento inducido por MPA involucra la activación del receptor de progesterona, como se evidenció para el receptor de estrógeno (Pietras et al., 1995). La participación de la HRG como mediador del crecimiento inducido por MPA de las células C4HD fue demostrado mediante el uso de una estrategia antisentido para el mRNA HRG en la cual el bloqueo de HRG endógeno mediante ASODNs inhibió el crecimiento celular inducido por MPA.

Los efectos biológicos de HRG pueden atribuirse en parte a los complementos celulares de los receptores con actividad de quinasas tipo I (RTKs-I) disponibles para componer heterodímeros funcionales. En las células C4HD hemos encontrado altos niveles de ErbB-2 y ErbB-3 y muy bajos niveles de expresión de ErbB-4. Hemos demostrado previamente que estas células carecen de ErbB-1, (Lanari et al., 1989). El tratamiento con heregulina de células C4HD indujo fosforilación en tirosina a tanto de ErbB-2 como de ErbB-3. La incubación con MPA, que indujo una regulación de los niveles de HRG, también dio como resultado fosforilación en tirosina de ErbB-2 y ErbB-3. Estos resultados proporcionan clara evidencia del papel de la HRG como mediadora de los efectos proliferativos del MPA, porque la HRG producida en respuesta al MPA podría ser el ligando responsable de la fosforilación de ErbB-2 y ErbB-3.

Varios trabajos han establecido que ErbB-2 es un componente crítico en la mediación del crecimiento celular en cáncer mamario inducido por HRG. La estimulación por HRG del crecimiento celular de MCF-7 y T-47D fue inhibido mediante anticuerpos monoclonales anti-ErbB-2 (Lewis et al., 1996.). Un enfoque diferente basado en la retención intracelular de ErbB-2 usando un anticuerpo de cadena única contra ErbB-2 también demostró que la estimulación del crecimiento mediada por HRG disminuyó dramáticamente en células MCF-7 (Berlii et al.,

1995) y T-47D (Graus-Porta D. et al., 1995). Los resultados presentados que demuestran que el crecimiento inducido por HRG es suprimido por ASODNs ErbB-2 indican que en nuestro modelo ErbB-2 es esencial en la ruta de señalización de HRG. También hemos encontrado que la proliferación inducida por MPA es inhibida por ASODNs a ErbB-2, sosteniendo el papel de la HRG como mediadora del crecimiento inducido por MPA. De esta forma se puede concluir que el bloqueo de la respuesta al MPA mediante ASODNs ErbB-2 es el resultado de la inhibición de la formación de complejos de heterodímeros de ErbB-2, mas probablemente con ErbB-3 porque los niveles de expresión de ErbB-4 son extremadamente bajos, que actúan mediando la acción de HRG en las células C4HD.

Se ha demostrado previamente, en la línea celular epitelial mamaria humana MCF 10 A, que HRG actúa como un factor de crecimiento de especificidad dual capaz de conducir rutas de transducción de señales que normalmente requieren EGF y factor de crecimiento semejante a la insulina (IGF-I) (Ram et al., 1995). Una explicación posible para esta observación es que en las células MCF-10 A que expresan ErbB-2, ErbB-3 y EGF-R la estimulación por HRG da como resultado la activación de las rutas de transducción de señales normalmente activadas en forma separada mediante EGF e IGF-I. Esto puede tener lugar mediante la formación de heterodímeros entre los miembros de la familia ErbB que producen tanto señales semejantes a IGF-I como a EGF. Al respecto, se ha documentado que el ErbB-3 posee la capacidad única entre la familia de las quinasas ErbB de unirse y activar a la subunidad reguladora p85 de PI-3K (Carraway and Cantley, 1994; Fedi et al., 1994, Graus-Porta et al., 1997). La habilidad de ErbB-3 para asociarse con PI-3K confiere a este receptor la capacidad de compartir rutas de transducción de señales con IGFs, porque la activación del IGF-R tipo I da como resultado una fosforilación en tirosina de la proteína IRS-1, que a su vez se une a p85 y lo activa (Backer et al., 1993). La activación de PI-3K en células tumorales mamarias que surgen en ratones transgénicos con sobreexpresión de HRG ha sido estudiada por otros autores

(Amundadotir y Leder, 1998). Nuestro grupo ha demostrado recientemente al bloquear la expresión de receptores IGF tipo I usando oligodeoxinucleótidos antisentido, que un IGF-R funcional es esencial para la proliferación inducida por MPA de las células C4HD (Elizalde et al., 1998). Por lo tanto, en el presente trabajo hemos investigado si la HRG también requiere un IGF-R funcional tipo I para evidenciar su actividad mitogénica. Los resultados obtenidos bloqueando IGF-R tipo I y tratando las células C4HD con HRG demuestran por primera vez, según nuestro entender, que las células epiteliales mamarias malignas que sobreexpresan ErbB-2 y ErbB-3 y expresan bajos niveles de ErbB-4 no pueden responder a la HRG en ausencia de un receptor funcional para el factor IGF-I. Este resultado excluye la posibilidad de que en células con altos niveles ErbB-3 tales como C4HD, la HRG pueda, mediante la activación de ErbB-3, hacer surgir rutas de transducción de señales compartidas con IGF-R tipo I, evitando la necesidad de un IGF IR activado. En ese sentido, se ha demostrado que los fibroblastos del embrión de ratón que sobreexpresan EGF-R pero que carecen de IGF-R tipo I no responden a la transformación o mitogénesis inducida por EGF (Coppola et al., 1994). Nuestros resultados son coherentes con la hipótesis de que hay una interdependencia entre los receptores de los factores de crecimiento y que IGF-R tipo I es el final del proceso de la familia de receptores ErbB, según lo prevé el modelo de progresión de competencia de proliferación celular (Coppola et al., 1994). Además, recientes descubrimientos han indicado la existencia de una ruta mitogénica por IGF R tipo I que no involucra la cascada de quinasas MAP o la activación de PI-3K (Barone y Courtneidge, 1995; Sell et al., 1994; Lowe et al., 1997). Los resultados de Sell et al. (1994) han demostrado que esta vía no es compartida con receptores para PDGF y EGF.

En conclusión, nuestros resultados proporcionan evidencia de interacciones entre progestágenos y rutas de señalización de la HRG en tumores mamarios y demuestran que un receptor funcional para un IGF-I es esencial para evidenciar los efectos proliferativos de la heregulina en células tumorales mamarias.

Agradecimientos

Mi agradecimiento a la invaluable colaboración de la Dra. Patricia Elizalde, que junto a la Dra. Claudia Lanari y los participantes de sus respectivos grupos de trabajo, especialmente la Dra. María E. Balaña, han permitido que el modelo de carcinogénesis mamaria experimental desarrollado desde 1986 haya servido para caracterizar los eventos moleculares producidos por progestágenos y que inducen la proliferación celular.

Estos trabajos fueron realizados con la ayuda de subsidios para investigación del CONICET, ICGEB y la Fundación Roemmers.

Referencias

- AMUNDADOTTIR L.T. and LEDER P. (1998). *Oncogene*, 16, 737-746.
- BACKER J.M., MYERS M.G., SUN X.J., CHEN D.J., SCHOELSON S.E., MIVALPEIX M. and WHITE M.F. (1993). *J. Biol. Chem.*, 268, 8204-8212.
- BACUS S.S., GUDKOV A.V., ZELNICK C.R., CHIN D., STERN R., STANCOVSKI H., PELES E., BEN-BARUCH N., FARBSTEN H., LUPU R., WEN D., SELA M. and YARDEN Y. (1993). *Cancer Res.*, 53, 5251-5261.
- BARONE M.V. and COURTNEIDGE S.A. (1995). *Nature*, 378, 509-512.
- BERLII R., GRAUS PORTA D., WOODS-COOK K., CHEN X., YARDEN Y. and HYNES N.E. (1995). *Mol. Cell. Biol.*, 15, 6496-6505.
- CARRAWAY K.L. and CANTLEY L.C. (1994). *Cell*, 78, 5-8.
- COPPOLA D., FERBERA., MASAHIKO M., SELL C., D'AMBROSIO C., RUBIN R. and BASERGA R. (1994). *Mol. Cell. Biol.*, 14, 4588-4595.
- CULOUSCOU J.M., PLOWMAN G.D., CARLTON G.W., GREEN J.M. and SHOYAB M. (1993). *J. Biol. Chem.*, 268, 18407-18410.
- DRAN G., LUTHY I.A., MOLINOLO A.A., MONTECCHIA F., CHARREAU E.H., DOSNE PASQUALINI C. and LANARI C. (1995). *Breast Cancer Res. Treat.*, 35, 173-186.
- ELIZALDE P.V., LANARI C., MOLINOLO A.A., GUERRA F.K., BALAÑA M.E., SIMIAN M., IRIBARREN A.M. and CHARREAU E.H. (1998). *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, in press.
- FEDI P., PIERCE J., DI FIORE P.P. and KRAUS M. (1994). *Mol. Cell. Biol.*, 14, 492-500.
- GRAUS-PORTA D., BEERLI R.R. and HYNES N.E. (1995). *Mol. Cell. Biol.*, 15, 1182-1191.
- GRAUS-PORTA D., BEERLI R.R., DALY J.M. and HYNES N.E. (1997). *EMBO J.*, 16, 1647-1655.
- GRUNT T.W., SACEDA M., MARTIN M.B., LUPU R., DITTRICH E., KRUPITZA G., HARANT H., HUBER H. and DITTRICH C. (1995). *Int. J. Cancer*, 63, 560-567.
- GUERRA F.K., EIJAN A.M., PURICELLI L., ALONSO D.F., BAL DE KIER JOFFÉ E., KORNBLIHTT A.R., CHARREAU E.H. and ELIZALDE P.V. (1996). *Int. J. Cancer*, 65, 812-820.
- HOLMES W.E., SLIWKOWSKI M.X., AKITA R.W., HENZEL W.J., LEE J., PARK J.W., YANSURAD., ABADIN., RAAB H., LEWIS G.D., SHEPARD M., WOOD W.I., GOEDEL D.V. and VANDLEN R.L. (1992). *Science*, 256, 1205-1210.
- KRANE I.M. and LEDER P. (1996). *Oncogene*, 12, 1781-1788.
- LANARI C., KORDON E., MOLINOLO A.A., DOSNE PASQUALINI C. and CHARREAU E.H. (1989). *Int. J. Cancer*, 43, 845-850.
- LEWIS G.D., LOFGREN J.A., MCMURTREY A.E., NUIJENSA., FENDLY B.M., BAUER K.D. and SLIWKOWSKI M.X. (1996). *Cancer Res.*, 56, 1457-1465.
- LOWE W.L., FU R. and BANKO M. (1997). *Endocrinology*, 138, 2219-2226.
- LUPU R. and LIPPMAN M.E. (1993). *Breast Cancer Res. Treat.*, 27, 83-93.
- MARTE B.M., GRAUS-PORTA D., JESCHKE M., FABBRO D., HYNES N.E. and TAVERNA D. (1995a) *Oncogene*, 10, 167-175.
- MARTE B.B., JESCHKE M., GRAUS-PORTA D., TAVERNA D., HOFER P., GRONER B., YARDEN Y. and HYNES N. (1995b). *Mol. Endocrinol.*, 9, 14-23.
- MOLINOLO A.A., LANARI C., CHARREAU E.H., SAN JUAN N. and DOSNE PASQUALINI C. (1987). *J. Natl. Cancer Inst.*, 79, 1341-1350.
- NORMANNO N., KIM N., WEN D., SMITH K., HARRIS A.L., PLOWMAN G., COLLETTA G., CIARDELLO F. and SALOMON D. (1995). *Breast Cancer Res. Treat.*, 35, 293-297.
- NORMANNO N., QI C., GULLIK W.J., PERSICO M.G., YARDEN Y., WEN D., PLOWMAN G.D., KENNEY N., JOHNSON G.R., KIM N., BRANDT R., MARTINEZ-LACACI I., DICKSON R.B. and SALOMON D.S. (1993). *Int. J. Oncol.*, 2, 903-911.
- PELES E. and YARDEN Y. (1993). *BioEssays*, 15, 815-824.

- PELES E., BACUS S.S., KOSKI R.A., LU H.S., WEN D., ODGEN S.G., BEN LEVY R. and YARDEN Y. (1992). *Cell*, 69, 205-216.
- PIETRAS R.J., ARBOLEDA J., REESE D.M., WONGVIPAT N., PEGRAM M.D., RAMOS L., GORMAN C.M., PARKER M., SLIWKOWSKI M.X. and SLAMON D. (1995). *Oncogene*, 10, 2435-2446.
- PINKAS-KRAMARSKI R., ALROY I. and YARDEN Y. (1997). *J. Mam. Gland Biol. Neoplasia*, 2, 97-107.
- RAM T.G., KOKENY K.E., DILTS C.A. and ETHIER S.P. (1995). *J. Cell. Physiol.*, 163, 589-596.
- SACEDA M., GRUNT T.W., COLOMER R., LIPPMAN M.E., LUPU R. and MARTIN M.B. (1996). *Endocrinology*, 137, 4322-4330.
- SELL C., DUMENIL G., DEVEAUD C., MIURA M., COPPOLA D., DEANGELIS T., RUBIN R., EFSTRATIADIS A. and BASERGA R. (1994). *Mol. Cell. Biol.*, 14, 3604-3612.
- SEPP-LORENZINO L., EBERHARD I., MA Z., CHO C., SERVE H., LIU F., ROSEN N. and LUPU R. (1996). *Oncogene*, 12, 1679-1687.
- TANG C., PEREZ C., GRUNT T., WAIBEL C., CHO C. and LUPU R. (1996). *Cancer Res.*, 56: 3350- 3358.
- WEN D., SUGGS V., KARUNAGARAN D., LIU R., CUPPLES L., LUO Y., JANSEN A.M., BEN BARUSH N., TROLINGER D.B., JACOBSON V.L., MENG T., LU H.S., HU S., CHANG D., YANIGAHARA D., KOSKI R.A. and YARDEN Y. (1994). *Mol. Cell. Biol.*, 14, 1909-1919.
- WEN D., PELES E., CUPPLES R., SUGGS S.V., BACUS S.S., LUO Y., TRAIL G., HU S., SILBINGER S.M., BEN-LEVY R., KOSKI R.A., LU H.S. and YARDEN Y. (1992). *Cell*, 69, 559-572.
- YANG Y., SPITZER E., MEYER D., SACHS M., NIEMANN C., HARTMANN G., WEIDNER K.M., BIRCHMEIER C. and BIRCHMEIER W. J. (1995). *J. Cell. Biol.*, 131, 215-226.

Manuscrito recibido en marzo de 1999.