

CONTRIBUCIÓ A L'ESTUDI DELS RECEPTORS ESTROGÈNICS EN EL CÀNCER MAMARI HUMÀ

Comunicació presentada el dia 1 de febrer de 1978
a les I Jornades d'Endocrinologia de S.C.B.

per

G. ROCAMORA * i J. M. CASTELLANOS

Unitat Catalana de Recerca en Hormonologia
Muntaner, 492. Barcelona-22

1. INTRODUCCIÓ

Donada la importància que té el càncer de mama a causa de la seva incidència en l'espècie humana, aquesta malaltia ha estat estudiada profusament des de nombrosos aspectes. Els estudis epidemiològics han donat resultats molt interessants com són, la més gran incidència a la raça blanca, l'alt nivell social de la dona i l'edat avançada en la qual pot quedar prenyada. Des del punt de vista del diagnòstic precoç, la situació és bastant descoratjadora ja que malgrat que s'ha especulat molt sobre alguns valors d'hormones al plasma i la relació entre diferents metabòlits excretats per l'orina, els resultats obtinguts són poc conclouents. D'altra banda, s'ha progressat molt en el coneixement bioquímic del comportament del tumor. Llastimosament, aquests estudis tan sols poden servir per millorar la conducta terapèutica i establir un diagnòstic quan el càncer ja ha estat establert.

La dependència hormonal d'aquests tumors s'ha estudiat amb la valoració urinària dels esteroides, alguns enzims plasmàtics, com els nivells de glucosa-6-fosfat-dehidrogenasa, i proteïnes com la caseïna. Però en aquest camp, l'aportació més important ha estat l'estudi dels receptors d'esteroides al teixit tumoral.

* Aquest treball correspon a una part de les experiències de la tesi per optar al grau de Llicenciatura.

Aproximadament en una tercera part de les pacients amb càncer de pit el tumor respon favorablement al tractament endocrí (additiu o ablatiu). Però a les altres dues terceres parts, el tumor continua el seu creixement de manera autònoma tot i rebent tractament. Estudis recents realitzats en teixits considerats *estrògeno-dependents* com és l'úter, han posat en clar l'existència d'una proteïna citoplasmàtica (receptor citosòlic), que lliga els estrògens amb *elevada afinitat* ($K=1 \times 10^{-10}$ M) i és de gran especificitat. La interacció produïda entre el receptor i l'esteroide és la primera etapa perquè es desenvolupi l'acció de l'hormona. Per extensió, aquests estudis han contribuït al coneixement bioquímic del càncer de pit en l'espècie humana. Posteriorment, s'ha comprovat que només responen a l'acció dels estrògens, exògens sintètics, andrògens i antiestrògens, aquells teixits que posseeixen receptors hormonals.

Si el teixit mamari maligne té receptors estrogènics, o altres, en quantitat superior a tres femtomols/mg de proteïna tisular, respon favorablement al tractament endocrí en un 60 % dels casos. D'altra banda, si el nombre de receptors és més petit de tres o de zero, la pacient no respondrà¹.

En aquest treball s'exposen senzillament, les experiències realitzades per a la posta a punt de la tècnica per a la determinació de receptors citosòlics al càncer mamari, i es fa un estudi crític de la metodologia utilitzada.

2. MATERIAL

S'han utilitzat 14 biòpsies de càncer mamari humà, diagnosticades histològicament i de pesos compresos entre 0,12 i 2,36 g (taula 1). Les biòpsies es varen conservar en gel des del moment de l'extracció fins que es congelaren a -40° C. L'esteroide radioactiu utilitzat va ser ($6,7\text{-H}^3$) estradiol de 44 ci/mmol d'activitat específica i puresa del 99 %². L'esteroide no radioactiu, l'estradiol fred, és de la casa VISTER. Es conserva en una solució alcohòlica. El tampó utilitzat és Tris-ClH 0,01M 0,0015M de EDTA pH 7,4 de força iònica baixa.

3. MÈTODE

La biòpsia es neteja del teixit adipós, es pesa i s'homogeneïtza amb tampó refredat a 4° C en un homogeneïtzador Potter-Elvehjem amb pistó de vidre. Quan ja s'ha fet aquesta operació, es repeteix tres vegades fins a assegurar la homogeneïtzació total. Els homogeneïtzats es recullen en un tub d'ultracentrifuga que s'ha d'omplir amb tampó. Seguidament se centrifuga a 105.000 g a 4° C per espai de 60 minuts.

TAULA 1.— Pes d'algunes de les peces utilitzades per valorar el contingut en receptors d'estrògens

<i>Pes biòpsies</i>	
1 —	2,36 g
2 —	0,57 g
3 —	0,60 g
4 —	0,80 g
5 —	0,90 g
6 —	0,12 g
M = 0,89 g	
$\sigma = 0,70$ g	

El citosol es va utilitzar per:

- a) La determinació i estudi dels receptors.
- b) La determinació de les proteïnes totals.
- c) La determinació de l'albumina.

a) *Estudi dels receptors d'estradiol*

A la figura 1 es pot veure l'esquema del procediment que s'ha seguit³. S'incuben per duplicat 4 sèries de tubs que contenen 7,7 pg (28 f.mol), 15,4 pg (56 f.mol), 38,8 pg (140 f.mol), 77 pg (280 f.mol), d'estradiol radioactiu redissolts amb 50 μ l de tampó, i una altra sèrie de tubs amb la mateixa quantitat de radioactivitat i afegint-hi a més a més 100 vegades més d'estradiol no marcat (per determinar el «binding» inespecífic). A tots se'ls afegeix la mateixa quantitat de citosol (0,5-1 ml) en funció de les proteïnes totals. S'equilibra durant 18-24 hores a 4° C. Passat aquest temps, s'afegeixen 500 μ l de suspensió de carbó actiu al 1 % en tampó que conté gelatina al 0,1 % per separar la radioactivitat lligada de la lliura. El sobrenedant es decanta en un vial de centelleig i s'afegeixen 7 ml de líquid de centelleig Istagel RR (Packard Inc.).

Finalment es fa un càlcul de l'eficiència del comptador amb l'anomenat líquid i l'estàndard intern de l'aparell.

Amb els resultats obtinguts es fa una gràfica segons SCATCHARD⁴. A les ordenades posem els valors de la relació hormona lligada-hormona lliure o B/F i a les abscisses el pes d'hormona lligada. Així s'obté una recta que ens dona el valor del *pes màxim d'hormona lligada* i el valor de la *constant de dissociació del complex hormona-receptor*. El valor de la K_d es calcula amb l'invers del pendent de la recta. El valor de n ens el dona la intersecció de la recta amb l'eix d'abscisses (fig. 2).

FIG. 1. — Càlculs.

pg. totals	R.T.	F.	$B_c = B_t - B_i$	pg. lligats	B/F
7,7	4.354	2.334	$2.021 = 2631 - 611$	3,5	0,86
15,4	7.504	4.263	$3.241 = 3852 - 611$	6,6	0,76
38,8	19.504	12.741	$6.763 = 7374 - 611$	13,4	0,53
77,0	39.958	31.051	$8.907 = 9518 - 611$	17,1	0,28

F=Radioactivitat lliure (calculada per diferència: $RT - B_c$) expressat en c.p. $10'$.

R.T.=Radioactivitat total en c.p. $10'$.

B_c =Radioactivitat lligada al receptor o específica, en c.p. $10'$.

B_t =Radioactivitat lligada total, en c.p. $10'$.

B_i =Radioactivitat lligada inespecífica (remanent després d'afegir 100 vegades més d'hormona freda) en c.p. $10'$.

pg. lligats=Calculats a partir de B_c coneixent l'activitat específica de l'hormona tritiada i l'eficiència del comptador.

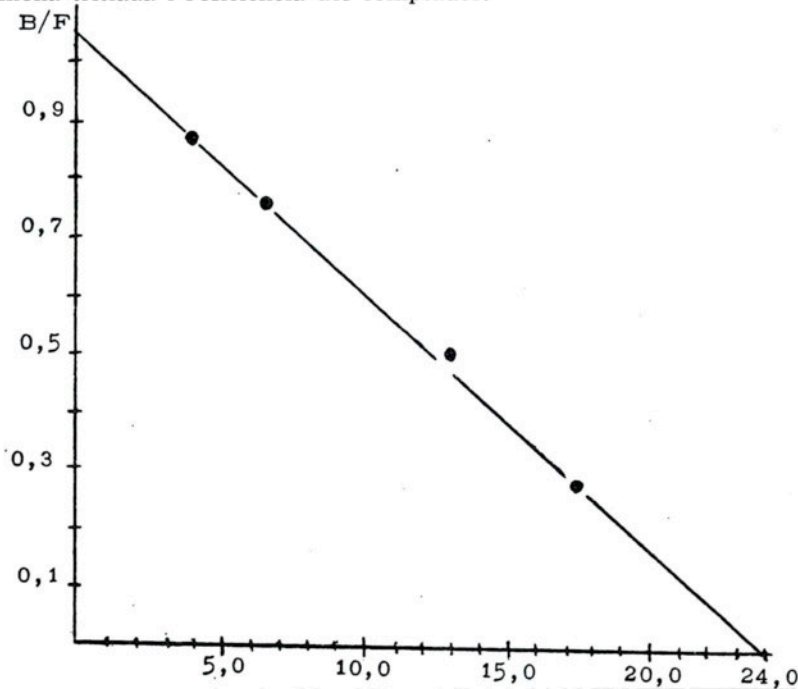


FIG. 2. — Aplicació de la representació gràfica de Scatchard per calcular el nombre màxim de llocs d'unió (n) i la constant de dissociació K .

$$K = \frac{23,9}{1,25} = 19,12 \text{ pg.}$$

$$K = \frac{19,12}{272,3} = 0,0702 \text{ p.mol. (Si el volum d'incubació fos 1 ml).}$$

$$K = 7,02 \times 10^{-14} \text{ mol/ml.}$$

$$K = 7,02 \times 10^{-11} \text{ mol/l.}$$

$$n = \frac{23,9}{272,3} = 0,087 \text{ pmol/ml.}$$

$$n = \frac{0,087}{1,2 \text{ mg prot/ml}} = 0,072 \text{ pmol/mg} = 72,0 \text{ fm/mg.}$$

b) *Determinació de proteïnes totals*

Les proteïnes totals del citosol es determinen pel mètode de Lowry⁵. Amb aquesta dada es calcula el volum de citosol que s'ha de prendre per fer l'assaig. És recomanable que hi hagi 1 mg de proteïna per tub.

c) *Determinació de l'albumina*

L'albumina que conté el citosol es mesura pel mètode del verd de bromocresol. Amb aquesta dada es calcula la contaminació plasmàtica de la mostra. Així es pot saber l'error que es comet en calcular el nombre de llocs d'unió per mg de proteïna (taula 2).

TAULA 2.— Càlcul de la contaminació (C) del citosol pel plasma en sis de les mostres. P.T.=proteïnes totals; DIF., diferència entre P.T. i l'albumina; C.A., contaminació per albumina; 1,3=correcció per a transformar la C.A. en C (plasma, albumines i globulines)

CONTAMINACIÓ					
Mostres	P.T.	Albumina	DIF.	C.A.	C(C=C.A.×1,3)
1	3,00	2,00	1,00	33 %	42,9 %
2	0,60	0,44	0,16	10 %	13,0 %
3	1,50	0,83	0,69	46 %	59,8 %
4	1,00	0,70	0,30	30 %	39,0 %
5	1,82	1,56	0,26	14,3 %	18,6 %
6	0,39	0,30	0,09	23,1 %	30,0 %
					33,88 %

4. RESULTATS

Els estudis de receptors estrogènics s'han fet a 14 biòpsies de tumor mamari. A les 14 mostres s'ha seguit el mateix protocol. A la taula 3 es resumeixen els valors trobats en aquestes mostres del nombre de llocs d'unió i la constant de dissociació. Dels 14 casos analitzats s'han trobat 6 casos positius o que contenen receptors estrogènics. Aquesta proporció equival a un 42 % del total.

El nombre màxim de llocs d'unió (n) s'expressa com *femtoms de estradiol lligat per mg de proteïna tisular*. Els nostres valors oscil·len entre 21,3 i 110,6 fm/mg amb una mitjana de 58,9 f.mol/mg. La *constant de dissociació* ens indica la concentració d'esteroide lliure al moment que el receptor està semisaturat. És de l'ordre de 1×10^{-10} M. Els valors que nosaltres trobem oscil·len entre 0,68 i $5,7 \times 10^{-10}$ M. La mitjana trobada va ésser de $2,08 \times 10^{-10}$ M. (Taula 3.)

TAULA 3

RESULTATS				
Mostra	P.T.	C	n	$K_d (1 \times 10^{-10} \text{ M})$
1	3,00	34 %	—	—
2	0,60	34 %	87,3	0,77
3	1,50	34 %	—	—
4	1,00	34 %	21,3	0,68
5	1,80	34 %	—	—
6	0,39	34 %	45,6	0,75
7	0,70	34 %	—	—
8	1,60	34 %	21,3	3,20
9	1,60	34 %	—	—
10	0,17	34 %	—	—
11	1,30	34 %	67,7	5,70
12	0,60	34 %	—	—
13	0,49	34 %	—	—
14	1,20	34 %	110,6	1,40

P.T.=Proteïnes totals. C=Contaminació plasmàtica. n =Nombre de llocs d'unió (f.mol/mg p.t.). p.t.=Proteïna tisular. $K_d=2,08+10^{-10}$ M. $n=58,98$ f.mol/mg p.t.

5. CRÍTICA DEL MÈTODE I COMENTARI DELS RESULTATS

a) Comparació amb altres mètodes

La determinació de receptors estrogènics pot fer-se per altres mètodes diferents de l'utilitzat per nosaltres.

A la taula 4 es mostra un resum de les tècniques que es fan servir per a mesurar els receptors estrogènics (ER).

1. El gradient de densitat en sucrosa (SDG) és un mètode que a més de quantitatiu, ens caracteritza el receptor estrogènic. Un dels inconvenients del mètode és que el nombre de mostres per analitzar d'una vegada és inferior a altres mètodes.

2. El mètode de filtració en gels és un bon mètode, però amb l'inconvenient que la manipulació de moltes columnes de cromatografia és difícil. El gel que es fa servir normalment és de sephadex G-25.

3. Una altra tècnica és l'electroforesi, utilitzada per molts autors com tècnica rutinària al laboratori. És l'únic mètode que separa la «Sex Human Binding Globulin» (SHBG) que és una beta globulina i que també lliga andrògens i estrògens (6, 7). Donat que es treballa amb quantitats tan baixes d'hormona, només es lliga a la proteïna amb la qual té més afinitat. Per tant, en els altres mètodes no es considera l'error degut a la SHBG⁷.

TAULA 4.—Mètodes d'anàlisi de receptors

-
1. Gradient de sucrosa
 2. Carbó
 3. Filtració en gels (sephadex)
 4. Electroforesi
 5. Incubació amb trossos de teixit
-

4. El mètode del cultiu de teixits és l'únic que fa servir el teixit en fresc. És una mica antiquat i a més no és quantitatiu.

b) *Mètode exposat en el treball*

El mètode que fem servir nosaltres consisteix en la separació de la radioactivitat lligada de la lliure amb carbó actiu prèviament tractat per eliminar partícules de poca densitat.

A continuació anomenarem les dificultats que presenta la tècnica.

1. Potser un dels factors més importants és la mesura del volum de citosol al medi d'incubació. Això depèn de la concentració en proteïnes del citosol. Normalment prenem de 0,5 a 1 ml de citosol. En aquest aspecte, seguim el criteri de T. O. Abney³, que recomana posar 1 mg de proteïnes per tub. Si corregim per la contaminació plasmàtica es dona 0,57 mg de proteïna tisular.

2. La separació amb carbó és una tècnica que requereix molta precisió al moment de la separació. S'ha de calcular el temps, ha de ser de 10', i la temperatura no pot passar de 4° C.

També tenim experiència de separar amb columnes de sephadex, G-25. Per cada mostra s'ha de preparar una columna sempre de les mateixes característiques: la quantitat de sephadex, alçada i diàmetre de les columnes, flux de la columna (ml/min.). Els eluats es recullen en fraccions d'1 ml de volum, i es compta la radioactivitat d'una alíquota. És una bona tècnica, però poc pràctica a causa del gran nombre de mostres. A més a més no resol el problema de separar la SHBG del receptor.

3. El sistema de comptatge de la radioactivitat es va fer per centelleig líquid, per mitjà d'un comptador de radiacions beta d'Intertechnique S-L30. En un principi es feia servir el líquid de centelleig (Tolué, Triton X-100 i PPO, 1.000:500 : 3; V/V/P), però així no aconseguíem dissoldre completament les proteïnes i quedava tèrbol. Tot seguit es va provar amb 7 ml d'istagel que va ser suficient perquè quedés transparent.

Amb el líquid de rutina trobàvem una eficiència d'un 25 % i amb istagel un 30 %. Encara que la diferència d'eficiències és petita, és interessant d'augmentar-la al màxim donat que treballem amb esteroides tritiats d'activitat específica relativament baixa (47 Ci/mMol).

4. També hem de dir que els mètodes del carbó s'anomenen mètodes del Carbó-Dextrà (DCC), però nosaltres només utilitzem carbó. Donat que tenim una llarga experiència en la separació amb carbó sol, creiem que no cal afegir-li el dextrà.

c) Contaminació plasmàtica

El resultat del nombre màxim de llocs d'unió l'expressem com femtomols d'estradiol per mg de proteïna tisular.

Les biòpsies sempre contenen una mica de sang que és la font més important de contaminació, i per tant s'ha de tenir en compte al moment de calcular el contingut de proteïna tisular. L'albumina es determina pel mètode del Verd de Bromocresol, i ens serveix per calcular la contaminació plasmàtica si tenim en compte que el quocient albumina/globulines del sèrum és de 1,3⁶.

L'albumina és una proteïna que té molta capacitat, però d'afinitat i d'especificitat molt baixes. Per tant no modifica l'equilibri receptor-estradiol. El plasma conté la SHBG, proteïna de propietats semblants als receptors hormonals que lliga l'estradiol amb menys afinitat que el receptor ($K_d=1 \times 10^{-7}$). La presència d'aquesta proteïna és la causa d'error més important a tots els mètodes de mesura de receptors. L'únic mètode que separa la SHBG del receptor és l'electroforesi sobre agar. La SHBG es dirigeix al càtode i el receptor a l'ànode.

d) Comentari dels resultats

Els valors trobats de K_d i (n) són sobreposables als descrits per altres autors⁸. De cara a la clínica, el càlcul de K_d no és necessari però a nosaltres ens ha interessat fer-ho per tal d'estar segurs de l'especificitat dels resultats. Els valors trobats per K_d i (n) obtinguts del «Scatchard plot», són més exactes que els valors de (n) calculats per saturació.

La proporció de casos considerats com positius, o millor dit, aquells que contenen receptors estrogènics, és inferior a la que es troba a la literatura. La nostra incidència és d'un 42 %, mentre d'altres autors^{1, 8} en troben fins un 60 %. No hem donat importància a aquest fet perquè el nombre de casos estudiats és insuficient —només 14— per treure conclusions definitives.

e) *Comentari al fonament matemàtic de Scatchard*

Per fer un estudi de les reaccions entre molècules de gran i de petit volum, hi ha diferents autors a seguir, per exemple, MICHAELIS-MENTEN, LINEWEAVER-BURK i SCATCHARD⁹. Aquests autors, simplifiquen la reacció a una fórmula matemàtica. Nosaltres hem escollit SCATCHARD perquè és el que ha estudiat més a fons les interaccions entre hormones i receptors (vegeu fig. 2).

BIBLIOGRAFIA

1. ABNEY, T. O. — «Endocrinology». Vol. 99, 2, 555 (1976).
2. BULLER, R. E. — «Jour. of Steroid Biochem.», 7: 321 (1976).
3. CASTELLANOS, J. M. i CASES, E. — «Análisis Clínicos», 8: 11 (1977).
4. LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, M. J., FARR, A. L. i RANDALL, R. J. — «Jour. of Biol. Chem.», 193: 265 (1951).
5. MCGUIRE, W. L., CARBONE, P. P. i VOLLMER, E. P. — In *Estrogen receptors in human breast cancer*, p. 1. «Raven Press New York» (1975).
6. SCATCHARD, G. — «Ann. New York Acad. of Sciences», 51: 660 (1949).
7. TEULINGS, F. A. G. — En *Avances en análisis de esteroides (III)*, p. 47. Edit. J. M. Castellanos, Gráficas Per. Barcelona (1977).
8. WAGNER, R. K. — «Supplementum 193, Acta Endocr.», 78: 158 (1975).