

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

Simposio Internacional

Academia Nacional de Medicina

Buenos Aires, 4 junio 1997

**EN BUSCA DE SECUENCIAS RETROVIRALES RELACIONADAS CON EL
CANCER DE MAMA HUMANO**

**BEATRIZ G. T. POGO^{1,2}, JAMES F. HOLLAND¹, YUE WANG³, STELLA M. MELANA¹,
ISABELLE PELISSON¹, BINGREN LIU¹, VERA GO³, IRA BLEIWEISS³**

¹Departments of Medicine, ²Microbiology and ³Pathology, Mount Sinai School of Medicine, New York, USA

Resumen El rol de los virus en la carcinogénesis mamaria ha sido extensamente estudiado en animales. Un modelo similar al del virus del tumor de mama del ratón (MMTV) fue propuesto anteriormente para el cáncer de mama humano. Aunque hubo observaciones que indicaban que MMTV estaba involucrado en el cáncer de mama humano, otros resultados contradijeron estas conclusiones. Un inconveniente importante para establecer esta relación, era la presencia de secuencias retrovirales endógenas semejantes a las de MMTV en el genoma humano. Para evitar ese problema, nosotros hemos seleccionado una secuencia de 660 pares de bases (bp) del gen de la envoltura (env) de MMTV con baja homología con las secuencias endógenas humanas y utilizando la técnica de reacción de polimerasa en cadena (PCR) la hemos amplificado. La secuencia se encontró en el 38% de los tumores examinados, en el 2% de las mamas normales y no se detectó en ningún otro tipo de tumores. La homología con MMTV fue del 90-98% y sólo 18% semejante a las secuencias retrovirales endógenas. Por medio de la técnica de Southern, se pudo detectar la secuencia en el ADN genómico de tumores, hibridizando con una sonda específica. Usando PCR con transcriptasa reversa (RT-PCR) se pudo demostrar que la secuencia se expresa en la mayoría de los tumores. Resultados preliminares demostraron que las secuencias de los genes LTR y GAG están también presentes en ciertos tumores de mama. El origen de estas secuencias puede ser debido a la integración de un virus humano semejante a MMTV o a secuencias no conocidas que se pueden detectar solamente en los tumores.

Key words: breast cancer, retrovirus, MMTV

La idea que el cáncer de mama en los humanos pueda estar relacionado con un virus no es nueva. El modelo del cáncer de mama del ratón que es causado por un retrovirus (MMTV), aplicado al cáncer humano fue seriamente considerado en los años 70 y 80, en el apogeo de los virus encogénicos¹. En esa época la posibilidad que los virus causaran cáncer en los humanos comenzó a demostrarse experimentalmente con los virus herpes (Epstein-Barr y el linfoma de

Burkitt), los virus papiloma (cáncer de cervix) y el de la hepatitis B (hepatocarcinoma). Más tarde el retrovirus HTLV-I fue reconocido como el agente causal de la leucemia a células T de los adultos. No hay duda que esta lista se agrandará con el tiempo. Es importante aclarar que los virus en los cánceres humanos no son por sí mismos la causa de cáncer. Representan un eslabón más en la cadena de cambios que tienen lugar en el genoma previo al desarrollo del crecimiento maligno. Existen los denominados factores "predisponentes" que facilitan ese proceso y mutaciones en genes supresores que también contribuyen al mismo.

Dirección postal: Dr. Beatriz G.T. Pogo, División of Neoplastic Diseases, Box 1131, Mount Sinai School of Medicine, One Gustave L. Levy Place, New York, NY 10029, USA

El cáncer de mama afecta a una de ocho mujeres en los Estados Unidos. Es frecuente en ciertas familias en donde la posibilidad de desarrollar cáncer es 50%. Este tipo de cáncer representa solamente el 5% al 10% de todos los cánceres; el más común es el denominado esporádico, sin conexión familiar.

En los últimos tres años se han descubierto dos genes^{2,3} que están relacionados con el cáncer de mama familiar: el gen BCRA-1 y el gen BCRA-2.

El gen BCRA-1, localizado en el cromosoma 17q21, está mutado en el 45% de los casos de cáncer de mama hereditarios y en 80% de las familias con cáncer de mama y ovario. Codifica para una fosfoproteína de alto peso molecular que se localiza en el núcleo. Las mutaciones producen una proteína truncada. Este gen tiene propiedades de activador de transcripción y de supresor. Se expresa en el epitelio de la glándula mamaria durante el embarazo y la lactancia. Su expresión disminuye cuando los tumores pasan del estado pre-invasivo al invasivo.

El otro gen, BRCA-2, está localizado en el cromosoma 13q12-13 y está involucrado en la susceptibilidad genética al cáncer de mama y ovario. Es un gen supresor y la pérdida de un alelo causaría crecimiento maligno.^{2,3}

Es interesante que en el cáncer esporádico, participan varios oncogenes como se resume en

TABLA 1.— *Alteraciones genéticas en el cáncer de mama humano no familiar*

1. Amplificación del oncogene erbB-2 en el 30% de los tumores. El gen erbB-2 codifica para un receptor relacionado con el del factor de crecimiento epitelial.
2. Amplificación de los oncogenes int-2 y hst (factores de crecimiento) y de la ciclina D1 en el 20% de los tumores. Estos genes están localizados en el cromosoma 11q13.
3. Alteraciones moleculares de la proteína 53 en el 50% de los tumores. Localización anómala en el citoplasma.
4. Alteraciones en los genes de varios supresores de tumores.
5. Incremento de la expresión de los genes Wnt5a, Wnt7 y Wnt10B en el cáncer de mama humano.

Int-2, Wnt5a, Wnt7 y Wnt10B son genes relacionados con la integración del virus del cáncer de mama del ratón (MMTV).

la Tabla 1. Algunos de ellos son factores de crecimiento o receptores de los mismos. Es importante hacer notar que *int-2* y los *Wnts* son factores de crecimiento que se expresan en el embrión solamente y son los sitios de inserción del virus del ratón. Es interesante que se amplifican y se expresan en el cáncer humano¹.

El hecho que factores de crecimiento que son exclusivamente embrionarios se expresen en células adultas, causaría un desbalance funcional y podría contribuir al descontrol del crecimiento. Además hay cambios en varios genes supresores de tumores y en la proteína 53 (p53) que está mutada en el 50% de los tumores. La p53 es un supresor relacionado al ciclo celular y al sistema de reparación del ADN.

Davis et al.⁴ calcularon que solamente el 30% de los cánceres de mama están asociados con factores de riesgo endógenos (hormonales) o hereditarios. De manera que una gran proporción puede estar relacionado con factores exógenos ambientales. La posibilidad de que un virus participe en este proceso es por lo tanto todavía válida.

El virus del tumor de mama del ratón (MMTV) es un retrovirus tipo B que trabaja como un activador de genes en su sitio de inserción. Los genes afectados en los sitios de inserción son generalmente genes relacionados con el crecimiento celular⁵. Como se mencionó anteriormente, algunos de estos genes están amplificadas y se expresan en el cáncer humano.

En las Tablas 2 y 3, se describen las evidencias a favor y en contra de la participación de

TABLA 2.— *Evidencias que relacionan el cáncer de mama humano con el virus del ratón*

Presencia de secuencias homólogas a todos los genes del virus del ratón en el cáncer humano.

Inmunorreactividad al virus del ratón en el suero de pacientes con cáncer, en las células tumorales y en el líquido de los quistes de mama.

Presencia de partículas virales en células en cultivo derivadas de tumores humanos.

Presencia de 6.6 kb secuencias exclusivas de los genes gag y pol del virus del tumor de mama del ratón en 2 de 7 líneas celulares de cáncer de mama humano.

Expresión de genes relacionados con el sitio de integración del cáncer de mama del ratón.

TABLA 3.- Evidencias en contra de la participación del virus del ratón en el cáncer humano

Presencia de secuencias retrovirales endógenas en el genoma humano similares al virus del ratón.
Falta de especificidad de las reacciones inmunológicas.
Ausencia de partículas virales infecciosas.
Falta de evidencias epidemiológicas.

MMTV en el cáncer humano. Estas evidencias que relacionaron a MMTV a través de homología de secuencias, inmunorreactividad y partículas virales en células en cultivo, fueron interpretadas más adelante como: la presencia de secuencias endógenas humanas similares a las de MMTV y la falta de especificidad en las reacciones inmunológicas. Otras evidencias en contra fueron la ausencia de partículas virales en los tumores y la falta de datos epidemiológicos¹.

Sin embargo, secuencias específicas para MMTV, se han encontrado en dos de siete líneas de células humanas malignas⁶ y además se han descrito aumentos de la expresión de varios genes *Wnts* en los tumores humanos⁷.

Nosotros decidimos atacar este problema usando una estrategia distinta. Razonamos que si hay un virus involucrado en el cáncer de mama sería posible detectarlo amplificando secuencias virales que no fueran homólogas a las endógenas conocidas. Westley y May⁸ y Ono et al⁹ habían publicado que ciertas regiones del gen de la membrana del virus estaban ausentes o no eran semejantes a las secuencias endógenas. Primeramente localizamos en este gen, un segmento de aproximadamente 660 pares de bases (bp) que no es homólogo a las secuencias endógenas ni a otras secuencias conocidas cuando se compararon en el banco de genes. Es parte de la

membrana externa del virus y contiene un solo sitio de glicosilación. Esta región del gen de envoltura, *env*, es muy estable y no varía mucho entre las distintas cepas de virus.

Se diseñaron varios "primers" para usar en la reacción de amplificación y también oligómeros para ser utilizados como sondas para hibridización e identificación de las secuencias amplificadas¹⁰.

La reacción de amplificación se muestra en la Figura 1. A la izquierda se puede ver el producto de la reacción analizado en un gel de agarosa. Cuatro tumores amplificaron la secuencia de 660 bp (a, b, c y d), mientras que dos tejidos mamarios derivados de mamoplastias reductivas como controles fueron negativos (e y f). A la derecha se muestra la radioautografía de la hibridización con una sonda que contiene las secuencias internas de las 660 bp. Se usó como control positivo un plásmido que contiene el gen de envoltura del virus del ratón (g). Los resultados obtenidos con la amplificación de secuencias en tumores, tejidos normales y tumores de otros órganos se han publicado⁹. Estas observaciones demostraron que en el 38-39% de los tumores analizados se encuentra la secuencia homóloga al gen de envoltura de MMTV. Es importante destacar que en los tejidos normales de los pacientes con tumores positivos, esta secuencia no fue detectada. Se extendió esta investigación a 18 líneas celulares en cultivos de cáncer de mama y 4 de mama "normal". Se encontraron que 10 de las líneas celulares de cáncer de mama contienen la secuencia de 660 bp o parte de ella, mientras que las 4 líneas celulares normales fueron negativas.

Para poder estudiar más muestras y extender estos estudios a casos familiares, se utilizó la misma técnica de amplificación en material de tejidos fijados en formol, incluidos en parafina y

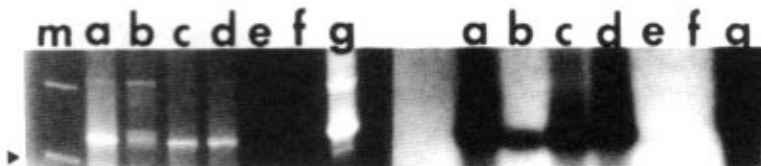


Fig. 1.- Amplificación de 660 bp del gen de envoltura semejante a MMTV. A la izquierda es la fotografía de un gel de agarosa y a la derecha la radioautografía. ADN proveniente de a,b,c,d: cáncer de mama humano; e,f: tejido mamario normal; g: plásmido conteniendo el clon del gen de la membrana de MMTV. La flecha indica la posición de 510 bp en el marcador de peso molecular (m).

seccionados. En estos casos se amplificó una secuencia más pequeña de 250 bp. Como en el caso anterior, el 38% de los tumores fueron positivos¹⁰.

Las secuencias fueron clonadas y secuenciadas. La homología con las secuencias del gen de MMTV fue entre 90 a 99% y menos del 18% a las secuencias retrovirales endógenas humanas cuando se compararon secuencias de 10 distintos clones. Algunas de las diferencias entre las secuencias humanas y las de MMTV se pudieron apreciar en todos los clones, pero también fue evidente que los clones difieren entre sí, lo que elimina la posibilidad de contaminación.

Utilizando como sonda uno de los clones, se investigó la presencia de esta secuencia en el ADN de tumores tratados con enzimas de restricción por medio de hibridación. Los resultados de estos Southern se ven en la Figura 2. En algunos tumores positivos la señal es intensa (B4) y en otros es apenas visible (B5), mientras que los tejidos normales (A1-5) son negativos, lo mismo que los tumores negativos (B1-3). La próxima pregunta fue si se expresan estas secuencias. Usando transcriptasa reversa-PCR se pudo detectar expresión en algunos de los tumores positivos (65%) y en las líneas celulares positivas¹¹.

Hemos tratado de usar la misma estrategia para identificar otros genes virales. Con el gen de la transcriptasa reversa fue imposible conseguir segmentos específicos para MMTV. Sin embargo, con primers diseñados para detectar las repeticiones largas terminales (LTR) fue posible

amplificarlas, clonarlas y secuenciarlas en el ADN de una línea de células de cáncer de mama humana desarrollada en nuestro laboratorio y en varios tumores. Se amplificaron 970 bp con 83 a 97% de homología a las terminales de MMTV y solamente con 69% de homología a las endógenas humanas en un segmento de 20 a 40 bp. Más recientemente un segmento de 2,7 kilobases (Kb) conteniendo secuencias del gen de envoltura y de LTR se pudo amplificar por medio de la técnica llamada "Long PCR". Las secuencias se compararon con las provenientes de 3 cepas de MMTV y con las secuencias retrovirales endógenas humanas. La homología varía entre 93 a 96% con respecto a MMTV y 51% a las secuencias endógenas humanas en un segmento de 230 a 350 bp¹².

Más recientemente, hemos podido amplificar 1,4 Kb que contienen secuencias de LTR y parte del gen *gag*. Como en los casos anteriores, la homología con la de MMTV fue del 96%¹³.

Hemos construido dos bibliotecas genómicas, una de ellas proveniente de un tumor y la otra de una línea celular en cultivo, con el propósito de aislar un clon genómico que contenga estas secuencias y las adyacentes. Después de escrutar las dos bibliotecas completas (1×10^7 placas), no hemos podido aislar ninguna colonia positiva. Sin embargo, las secuencias están presentes en las bibliotecas, porque si extraemos el ADN y amplificamos por medio PCR, las hemos detectado. Es posible que estas secuencias estén pobremente representadas en la biblioteca y

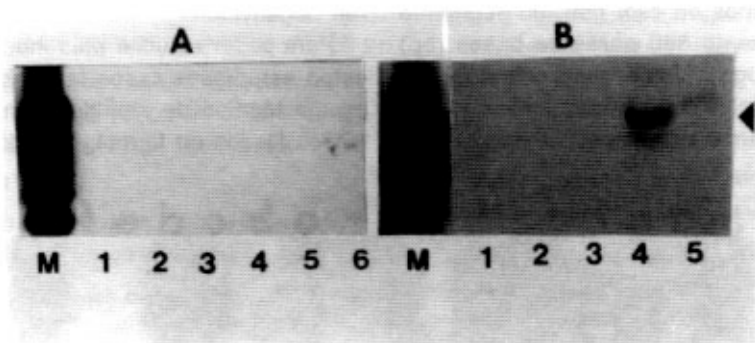


Fig. 2.- Southern de ADN digerido con EcoRI e hibridizado con una sonda marcada que contiene 660 bp, con 98% homología al gen de la membrana de MMTV, proveniente de un tumor humano. A 1-5: ADN de mama normales. B 1-3: ADN de cánceres de mama negativos; B 4-5: ADN de cánceres de mama positivos. La flecha indica la posición de 8 Kbp.

que las otras colonias crezcan más rápidamente e impidan identificarlas. Es también posible que existan lo que se denomina "secuencias venenosas" que impiden que el bacteriofago con esas secuencias crezca en la bacteria. Este fenómeno se ha descrito cuando se trató de clonar el provirus del MMTV. Al parecer algunas secuencias en el gen *gag* son "venenosas"¹⁴.

En la Tabla 4 se resumen nuestros resultados. Las posibles interpretaciones de nuestros hallazgos son: 1) *Polimorfismo de las secuencias endógenas humanas*. No lo podemos descartar completamente, pero la ausencia de las secuencias en los tejidos normales del paciente con cáncer positivo hace que esta posibilidad sea dudosa. 2) *Modificaciones de las secuencias endógenas humanas*. Es posible que estas secuencias estén relacionadas con el proceso tumoral y poco representadas en el genoma y que se encuentren amplificadas en los tumores y por lo tanto detectables solamente en ellos. 3) *La posibilidad es que éstas sean secuencias retrovirales exógenas de un virus humano con homología a MMTV*.

Esto lo podremos aclarar definitivamente cuando podamos obtener un clon genómico completo y sus secuencias adyacentes.

TABLA 4.- Sumario

1. Se detectaron 660 bp del gene de envoltura del virus del tumor de mama del ratón en el ADN del 38% de los tumores humanos.
2. Estas secuencias no se detectaron en el ADN de mamas normales, ni en tumores de otros órganos.
3. Los 660 bp son 90-98% homólogos al gen del tumor de mama del ratón y solamente 18% al retrovirus endógeno humano K-10 (HERK-10).
4. Las secuencias fueron detectadas en algunos tumores por medio de la técnica de Southern.
5. La expresión de las secuencias se detectó por medio de RT-PCR.
6. En los tumores humanos se detectaron 630 bp con 86-97% homología a los LTRs del virus del ratón.
7. Además, en los tumores humanos se detectaron 2,7 Kbp con 90-98% homología a los genes de envoltura y LTRs del virus del ratón y 1.4 Kbp con 90-95% homología a los genes *gag* y LTR.

Summary

Searching for retroviral sequences related to human breast cancer

The participation of viruses in mammary carcinogenesis has been largely studied in animals. A model similar to the mouse mammary tumor virus (MMTV) was previously proposed. Several lines of research supported the participation of MMTV in human breast cancer, but these evidences were contradicted when further research was performed. One major issue was the presence of human endogenous retroviral sequences that confounded results reporting MMTV-like sequences in human breast cancer. To overcome this problem we selected a 660 bp sequence of the MMTV *env* gene with low homology to endogenous sequences and search for a sequence to it using the polymerase chain reaction (PCR). The sequence was found in 38% of the human breast cancers and in 2% of the normal breasts studied. The sequence was not present in tumors from other organs. It was 90-98% homologous to MMTV and only 18% to human endogenous retrovirus (HERV) K-10. It was also detected in some of the positive tumors by Southern blot hybridization using one of the cloned 660 bp as a probe. Using reverse transcriptase PCR, it was possible to demonstrate that the 660 bp sequence is expressed in the majority of the tumors. Also, preliminary experiments revealed that sequences related to the LTR and *gag* genes of MMTV were present in the DNA of breast tumors.

The origin of the MMTV-like sequences in tumor DNA could be the result of integrated MMTV-like sequences derived from a human mammary virus or may represent unknown endogenous sequences that can only be detected in breast tumors.

Bibliografía

1. Pogo, BGT, Holland JF. Possibilities of a viral etiology for human breast cancer. A review; 1st International Symposium in human viral disease. *Biol. Trace Element Res.* 1997; 56: 1-12.
2. Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman K, et al. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science* 1994; 266: 66-71.
3. Wooster R, Neuhausen SL, Mangion J, Quirk Y, Ford D, et al. Localization of a breast cancer susceptibility gene BRCA2, chromosome 13q12-13. *Science* 1994; 265: 2088-90.
4. Davis DL, Bradlow HL, Wolff M, Woodruff T, Hoel

- DG, Anton-Culver H. Medical hypothesis: xenoestrogens as preventable causes of breast cancer. *Environ Health Perspect.* 1993; 101: 372-7.
5. Nusse R, Varmus HE. Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. *Cell* 1982; 31: 99-109.
 6. May FEB, Westley BR. Characterization of sequences related to the mouse mammary tumor virus that are specific to MCF-7 breast cancer cells. *Cancer Research* 1989; 49: 3879-83.
 7. Bui TD, Rankin J, Smith K, Huguet EL, Ruben S, Strachan T, Harris AL, Lindsay S. A novel human Wnt gene, WNT 10B, maps to 12q13 and its expressed in human breast carcinomas. *Oncogene* 1997; 14: 1249-53.
 8. Westley B, May FEB. The human genome contains multiple sequences of varying homology to mouse mammary tumour virus DNA. *Gene* 1984; 28: 221-7.
 9. Ono M, Yasunaga T, Miyata T, Ushikubo H. Nucleotide sequence of human endogenous retrovirus genome related to the mouse mammary tumor virus genome. *J Virol.* 1986; 60: 589-98.
 10. Wang Y, Holland JF, Bleiweiss IJ, Melana SM, Liu X, Pelisson I, Cantarella A, Stellrecht K, Mani S, Pogo GGT. Detection of mammary tumor virus env gene-like sequences in human breast cancer. *Cancer Research* 1995; 55: 5173-9.
 11. Wang Y, Go V, Holland JF, Melana SM, Pogo BGT. Expression of MMTV-like env gene sequences in human breast cancer. (submitted)
 12. Wang Y, Pelisson I, Holland JF, Melana SM, Pogo BGT. Detection of a 2.7 kb comprising MMTV-like env and LTR genes in human breast cancer. (in preparation)
 13. Liu B, Pelisson I, Wang Y, Holland JF, Pogo BGT. Amplification of MMTV-like GAG and LTR genes from human breast cancer. (in preparation)
 14. Brookes S, Placzek M, Moore R, Dixon M, Dickson C, Peters G. Insertion elements and transitions in cloned mouse mammary tumour virus DNA: further delineation of the poison sequences. *Nucleic Acids Res.* 1986; 14: 8231-45.

In research, the usefulness of error is that it leads to more research, and this is what the word tells us In order to get anything right, we are obliged first to get a great many things wrong.

En la investigación, lo útil del error es que conduce a más investigación, y eso es lo que la misma palabra nos dice.... Para encontrar la verdadera solución, primero tenemos que equivocarnos muchas veces.

Lewis Thomas

The Youngest Science, Notes of a Medicine Watcher, New York: Viking, 1983, p 82