

DETECCION DE SECUENCIAS HOMOLOGAS AL GEN *env* DEL VIRUS DEL TUMOR MAMARIO MURINO (MMTV) EN CANCER DE MAMA DE PACIENTES ARGENTINAS

STELLA M. MELANA¹, MARIA ALEJANDRA PICCONI², CARLOS ROSSI³, JUAN MURAL³, LIDIA VIRGINIA ALONIO², ANGELICA TEYSSIE², JAMES F. HOLLAND¹, BEATRIZ G.T. POGO¹

¹Departamento de Oncología Médica, Mount Sinai School of Medicine, New York University, New York; ²Servicio Virus Oncogénicos, Departamento Virología, Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas ANLIS Dr. Carlos G. Malbrán;

³Servicio de Ginecología, Hospital Nacional Prof. Alejandro Posadas, Haedo, Provincia de Buenos Aires

Resumen En los últimos años se ha renovado el interés en la investigación sobre la posible etiología viral del cáncer de mama humano. En publicaciones previas se ha demostrado la presencia de secuencias homólogas al gen *env* del virus del Tumor Mamario Murino (MMTV) en alrededor del 38% de cánceres de mama de mujeres procedentes de Estados Unidos e Italia; estas secuencias están generalmente ausentes en otros tumores y en tejido mamario normal. En el presente trabajo se analizó la presencia de una secuencia de 250 pb similar a la del gen *env* de MMTV en biopsias de pacientes argentinas con cáncer de mama. Se detectó este fragmento retroviral en el 31% (23/74) de los tumores analizados, mientras que sólo se obtuvo un caso positivo en tejido de mama normal y ninguno en fibroadenomas. En 46 pacientes con cáncer se analizaron células mononucleares de sangre periférica, detectando la secuencia en el 17% (2/12) de las pacientes portadoras de tumores *env* positivos y en el 3% (1/34) de aquéllas cuyos tumores eran *env* negativos. Los datos de Argentina son similares a los obtenidos en Estados Unidos e Italia donde la incidencia de cáncer de mama es también semejante. Estos resultados apoyarían la hipótesis de un probable agente viral implicado en la génesis de esta neoplasia y alientan los estudios en marcha.

Palabras claves: cáncer de mama, retrovirus, oncogénesis viral, virus del tumor mamario murino

Abstract *Detection of murine mammary tumor virus (MMTV) env gene-like sequences in breast cancer from Argentine patients.* In the last years research on the possible viral etiology of human breast cancer has been revised. Previous studies have demonstrated the presence of a Mouse Mammary Tumor Virus (MMTV) *env* gene-like sequence in about 38% of breast cancers from American and Italian women; these sequences are generally absent in other tumors and in normal mammary tissue. In the present study we have analyzed the presence of a 250-bp sequence of the MMTV *env* gene in breast cancer biopsies from Argentine patients. The retroviral fragment was present in 31% (23/74) of the tumors, only in one normal mammary tissue and in none of the fibroadenomas analyzed. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from 46 cancer patients were also analyzed; the sequence was found in 17% (2/12) of the PBMC from *env* positive tumor patients and in 3% (1/34) of the *env* negatives. The results from Argentine samples are similar to those from USA and Italy, where the breast cancer incidence is alike. These findings support the hypothesis of a viral agent involved in the genesis of this neoplasia and encourage the continuation of these studies.

Key words: breast cancer, retrovirus, viral oncogenesis, Mouse Mammary Tumor Virus

El cáncer de mama es la tercera neoplasia más frecuente en el mundo y la primera en población femenina. Cada año se detectan alrededor de un millón de casos nuevos en el mundo¹, de los cuales el 50% podrá tener una sobrevida superior a los cinco años, según el esta-

dio y el tratamiento recibido. El riesgo de desarrollo de esta neoplasia es mayor en Europa Occidental y Norteamérica, mientras que se informa una menor incidencia en Asia y África¹.

El cáncer de mama afecta a una de cada ocho mujeres en los EE.UU.². En Argentina esta neoplasia representa la primera causa de muerte por cáncer en mujeres, registrándose anualmente alrededor de 5000 fallecimientos por esta enfermedad³. Es probable que existan diferencias de incidencia en las distintas regiones o provincias de nuestro país; sin embargo los datos nacio-

Recibido: 7-II-2002

Aceptado: 29-IV-2002

Dirección postal: Dra. María Alejandra Picconi. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas-ANLIS Dr. Carlos G. Malbrán, Av. Vélez Sarsfield 563, 1281 Buenos Aires, Argentina.

FAX: (54-11) 4301-7428

e-mail: oncovir@sudnet.com.ar

nales se asemejan a los descriptos en los países industrializados.

Se ha estimado que sólo un 30% de los cánceres de mama estarían asociados a factores de riesgo endógenos (ej. hormonas) o hereditarios⁴. Por lo tanto, una gran proporción podría estar relacionada con factores exógenos ambientales, incluyendo las infecciones virales.

En la actualidad se acepta que entre el 15 y el 20% de los cánceres humanos están asociados con infecciones virales⁵⁻⁷. Desde que Bittner descubriera el virus del tumor mamario murino (MMTV) en 1936, numerosas investigaciones se realizaron evaluando una probable etiología viral del cáncer de mama humano^{2,8,9}. Sin embargo los resultados obtenidos fueron contradictorios debido a la inespecificidad de las reacciones inmunológicas que detectaban anticuerpos contra MMTV en pacientes con cáncer de mama. Por otro lado la presencia de secuencias retrovirales endógenas *HER* similares al MMTV en el genoma humano dificultó la detección de posibles retrovirus exógenos asociados con esta neoplasia^{10, 11}.

En la última década este tema fue retomado y utilizando una nueva tecnología como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha sido posible investigar la presencia de secuencias virales homólogas al MMTV en tumores de mama humanos^{2,9, 12}. Para ello se seleccionó un fragmento del gen *env* del MMTV que muestra muy baja homología con las secuencias retrovirales endógenas o con cualquier otro gen humano. Se demostró su presencia en el 38% de los cánceres, sólo en el 2% de tejido de mama normal y no se detectó en otros tumores¹². Estas secuencias se encontraron expresadas como ARN en el 66% de los tumores que las contienen¹³. No se observaron diferencias con respecto a la evolución clínica y la histopatología entre los tumores que contenían o no las secuencias, con excepción de un aumento en la expresión del receptor de laminina en los tumores positivos, considerándose a éste un marcador de progresión y mal pronóstico¹⁴.

En dos tumores de mama se demostró que existe una estructura proviral que incluye todos los genes del MMTV¹⁵. Esta estructura de 9.9 Kb presenta 95% de homología al MMTV y 50% a los endógenos solamente en el gen de la transcriptasa reversa, gen altamente conservado dentro de los retrovirus¹⁵. Las características moleculares del provirus (marcos de lectura abiertos y codones de terminación conservados, presencia del superantígeno y de elementos que responden a los glucocorticoides) sugieren la existencia de un virus con capacidad replicativa^{15, 16}.

Todo parece indicar que las secuencias retrovirales detectadas no serían de origen endógeno y tampoco debidas a polimorfismos, apoyando así el probable rol de un retrovirus exógeno en la génesis de al menos un subgrupo de estos cánceres¹⁷.

En el presente trabajo se analizó la presencia de secuencias similares al gen *env* de MMTV en biopsias de pacientes con cáncer de mama provenientes de Argentina.

Material y métodos

Pacientes: Se incluyeron biopsias frescas y fijadas provenientes de 74 pacientes con cáncer de mama. En 46 de ellas se obtuvo una muestra de sangre entera a fin de analizar la presencia retroviral en tejido sano (células mononucleares sanguíneas) de las mismas pacientes. Como controles de tejido mamario no neoplásico se incluyeron 5 fibroadenomas y 10 muestras de tejido de mama normal procedentes de mastoplastias reductoras.

Extracción de ADN: En las biopsias frescas de mama, el ADN fue extraído y purificado según fue previamente descrito¹⁸. Brevemente, el tejido fue sometido a digestión con proteinasa K y posterior extracción con fenol-cloroformo. Finalmente, el ADN fue precipitado con etanol absoluto, resuspendido en 50 µl de buffer TE estéril (Tris ClH 10⁻² M, EDTA 10⁻³ M, pH 8) y congelado a -20°C hasta su procesamiento. En los cortes histológicos de las biopsias, el ADN fue extraído y purificado en forma similar a lo descrito para las muestras frescas, excepto que el tejido fue previamente desparafinado por tratamiento con n-octano y posteriores lavados con etanol absoluto y etanol 70%.

Las muestras de sangre fueron recogidas con anticoagulante EDTA y conservadas a 4°C no más de 72 horas. Las células mononucleares fueron separadas por centrifugación en gradiente de Ficoll-Hypaque (Lymphoprep, Gibco Life Technologies). La extracción del ADN se efectuó en forma semejante al tejido fresco. Los ADN purificados fueron reconstituidos con agua estéril.

Amplificación del gen β-globina: A fin de controlar la integridad de los ADN obtenidos a partir de las muestras, se amplificó un fragmento de 260 pb del gen de β-globina mediante PCR empleando los primers GH-20 y PC04¹⁹.

Amplificación del gen *env* del virus MMTV: Se amplificó un fragmento de 250 pb del gen *env* del virus MMTV empleando los primers 2N: 5' CCT ACA TCT GCC TGT GTT AC-3' y 3N: 5' ATC TGT GGC ATA CCT AAA GG 3'. Las reacciones contenían: 250 ng. de ADN de la muestra, 100 pmoles de cada primer en PCR *beads* (Amersham Pharmacia Biotech., UK Ltd.). Se aplicaron 40 ciclos de: 94°C, 1 min 30 seg; 55°C, 1 min 30 seg y 72°C, 1 min 30 seg. Los productos de las reacciones fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa 2.0% teñidos con bromuro de etidio (5 µg/ml), durante 1 hora a 100 V. Como marcador de peso molecular se utilizó 1kb *plus ladder* (Gibco BRL). Los geles fueron tratados con solución desnaturalizante (150 mM NaCl, 0.5N NaOH) durante 20 minutos y luego neutralizados con solución neutralizante (Tris -HCl pH: 8.0, Cl Na 150 mM) durante otros 20 minutos. Luego fueron transferidos a filtros de nylon (Nytran-S&S) usando la técnica de Southern Blot¹⁸. Los ADN fueron inmovilizados con luz UV (UV Crosslinker-Fisher Scientific) durante 1 minuto. La hibridación fue realizada utilizando la oligonucleótido sintética¹² 2aN: 5'-CCG TAC GTG CTG CTA CCT GTA marcada radioactivamente con (³²P) y ATP por el método de marcado del extremo terminal 5' y purificado por columnas de *Sephadex* G-25 (*MicroSpin* G-25-Amersham Pharmacia Biotech., UK Ltd.). Los filtros fueron prehibridados con *Rapid Buffer* (Amersham Pharmacia Biotech., UK Ltd.) durante 15 min. e hibridados con la sonda

durante 3 hs. a 42°C. Las condiciones de lavados fueron las recomendadas por el fabricante del buffer de hibridación. Las membranas fueron expuestas a películas Kodak X-Omat durante 16 y/o 72 horas.

Resultados.

Todas las muestras fueron amplificables para el gen de la globina por lo que se consideraron aptas para el estudio. El fragmento de 250 pb del gen *env* de MMTV fue detectado en el 31% (23/74) de los tumores analizados (Tabla 1). La Fig. 1 muestra los productos de la PCR luego de la electroforesis en agarosa e hibridación por Southern blot.

TABLA 1.— Detección de secuencias retrovirales en cáncer de mama humano, tejido mamario no neoplásico y células mononucleares sanguíneas.

Muestra	n	Env + (%)
Mama		
- Cáncer de mama	74	23 (31)
- Mama normal	10	1 (10)
- Fibroadenoma	5	0 (0)
Mononucleares ¹		
- Pacientes Env. (-)	34	1 (3)
- Pacientes Env. (+)	12	2 (17)

¹ Células mononucleares obtenidas de la sangre de un subgrupo de pacientes con cáncer de mama.

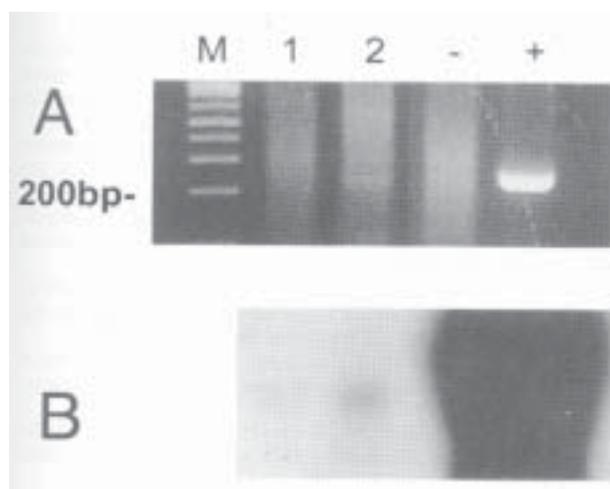


Fig. 1.— Detección de un fragmento del gen similar al *env* del MMTV por PCR- Southern blot. A. Productos de amplificación analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% (1 hora, 80V); puede observarse el fragmento del tamaño esperado (250 pb). B. Radioautografía de la hibridación con la oligosonda correspondiente a la secuencia del gen *env*. Calles: 1: tumor negativo, 2: positivo, (-) control negativo, (+) control positivo, M: marcador de peso molecular.

Como se resume en la Tabla 1, sólo dos de los pacientes con tumores *env* positivos y una de los pacientes con tumor *env* negativo mostraron también dicha secuencia en sus células sanguíneas.

Discusión

El estudio de un probable rol etiológico de retrovirus exógenos en el cáncer de mama humano tuvo dificultades debido a la presencia de secuencias retrovirales homólogas endógenas y la falta de métodos de detección suficientemente sensibles y específicos. A principios de los 90, iniciamos la búsqueda empleando una nueva metodología y estrategia cuyos resultados alentadores permitieron avanzar en los estudios^{2, 9, 12-14, 15, 17}.

El presente trabajo forma parte de un programa multicéntrico internacional en el que participaron países de África, Asia, América y Europa que presentan distinta incidencia de cáncer de mama. Los resultados obtenidos demuestran que la frecuencia de detección de las secuencias retrovirales en pacientes argentinas (31%) es comparable con aquéllas obtenidas en pacientes norteamericanas (38%¹⁷, 37%²⁰), italianas (37%¹⁴) y de otros países latinoamericanos (México y Brasil, 33%) donde la incidencia de la enfermedad es similar. Estos resultados contrastan con los obtenidos en muestras de cáncer de mama de ciertos países africanos como Túnez²¹ donde la enfermedad es predominante y tiene característica de gran malignidad (57-80%); por otro lado, en muestras de países asiáticos donde la incidencia de cáncer de mama es menor, el porcentaje de las secuencias es también bajo (China, 9.8% y Japón 11%) (resultados a publicar).

En los tejidos de mama no neoplásicos no se detectó la secuencia retroviral, con excepción de una muestra de mama normal. La presencia del retrovirus en las células mamarias de esta paciente podría representar un factor de riesgo de desarrollo de la neoplasia.

La positividad hallada en células mononucleares sanguíneas de pacientes cuyos tumores de mama fueron *env* positivo (17%) podría deberse a la presencia de células tumorales en la sangre. Este hallazgo ya había sido descrito en trabajos previos, aunque nunca pudo confirmarse su asociación con invasión²². Sin embargo existen antecedentes que en varios casos se detectaron secuencias retrovirales en células mononucleares luego que las pacientes desarrollaron metástasis (resultados no publicados).

La presencia de secuencias retrovirales en células sanguíneas de una paciente cuyo tumor era *env* negativo es más difícil de explicar. Las reacciones de detección fueron repetidas y los resultados confirmados. Si bien se tomaron todas las precauciones correspondientes¹², no puede descartarse una potencial contaminación durante la manipulación de la muestra. Esta aparente discrepancia

entre los resultados del tumor y la sangre podría también atribuirse a una heterogeneidad del tumor debida a la distribución de las secuencias retrovirales; es decir, podría haber porciones del tumor *env* negativas y otras *env* positivas. Esta posibilidad podría ser confirmada mediante ensayos de hibridación *in situ*. Otra alternativa sería que la secuencia se hubiera dañado o perdido durante la manipulación de la muestra del tumor.

Stewart y col. postularon la posible naturaleza zoonótica del cáncer de mama humano a través de la transmisión de un virus similar al MMTV, teniendo como vector al ratón *Mus domesticus*²³. Este roedor, de amplia distribución en regiones con alta incidencia de cáncer de mama (Europa Occidental, América, Australia y Nueva Zelanda), presenta un elevado número de copias provirales del MMTV endógeno. Serán necesarias nuevas investigaciones a fin de establecer mediante estudios filogenéticos si las secuencias halladas representan un nuevo virus adaptado al hombre o una verdadera zoonosis²⁴. Por otro lado, la probable asociación etiológica con un agente infeccioso alienta la posibilidad del control de esta patología mediante el desarrollo de una vacuna²⁵.

Para establecer que un virus presente en un tumor está relacionado con su patogénesis se deben demostrar ciertos criterios virológicos y epidemiológicos^{26,27}. El aislamiento de partículas virales, la demostración de infectividad o de inducción de transformación celular, la integración del genoma viral total o parcial en el DNA del tumor, son algunos de los requisitos virológicos en los cuales se está activamente trabajando²⁸.

En conclusión, la frecuencia de las secuencias virales en cáncer de mama en las muestras argentinas revela un patrón común con la de otros países de América y Europa donde el cáncer de mama es también de alta incidencia. Este estudio aporta datos que contribuyen a cumplir los postulados epidemiológicos de causalidad en relación con la hipótesis de una asociación entre retrovirus y cáncer de mama humano, al menos en un subgrupo de pacientes.

Agradecimientos: Los autores agradecen la valiosa asistencia técnica de Silvia Núñez y Joaquín V. González (Instituto Malbrán) y de la Lic. Paula Bos (Mount Sinai School of Medicine), destacando la dedicada colaboración de la Sra. Silvana Giuliano (voluntaria de LALCEC, Hospital Posadas). Las muestras de tejido de mama normal fueron provistas gentilmente por el Dr. J. Guerrisi (Servicio de Cirugía Plástica, Hospital Cosme Argerich, Buenos Aires).

Este trabajo fue subsidiado en parte por la Fundación Mosoteguy (Argentina) y T.J. Martell Foundation for Leukemia, Cancer and AIDS Research, the Hellen Block Memorial Fund and the Chemotherapy Fund (EEUU).

Bibliografía

- Keydar I. Retroviruses in breast cancer. A challenge for future research. *Women & Cancer* 1998; 1: 1-7.
- Pogo BGT, Holland JF. Possibilities of a Viral Etiology for Human Breast Cancer. *Biol Trace Element Res* 1997; 56: 131-42.
- Programa Nacional de Estadísticas de Salud. Estadísticas vitales. Ministerio de Salud de la Nación. Serie 5, N° 43, 2000.
- 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.
- Zur Hausen H. Viruses in human cancers. *Eur J Cancer* 1999; 35: 1878-85.
- Parkin DM, Pisani P, Muñoz N, Ferlay J. The global health burden of infection associated cancers. *Cancer Surv* 1999; 33: 5-33.
- Alonio LV, Picconi MA, Distéfano AL, Teyssié AR. Mecanismos de oncogénesis viral. *Infectología Clínica* 1997; 9: 7-18.
- Pasqualini CD. Visión retrospectiva de la relación entre los retrovirus y el cancer. *Medicina (Buenos Aires)* 1997; 57 (Supl II): 3-18.
- Pogo BGT, Holland JF, Wang Y *et al.* En busca de secuencias retrovirales relacionadas con el cáncer de mama humano. *Medicina (Buenos Aires)* 1997; 57: 75-80.
- Ono M, Yasunaga T, Miyata T, Ushikubo H. Nucleotide sequences of human endogenous retrovirus genome related to the mouse mammary tumor virus genome. *J Virol* 1986; 60: 589-98.
- Seifarth W, Baust C, Murr A *et al.* Proviral structure, chromosomal location and expression of HERV-K:T47D, a novel human endogenous retrovirus derived from T47D particles. *J Virol* 1998; 72: 8384-91.
- Wang Y, Holland JF, Bleiweiss IJ *et al.* Detection of Mammary Tumor Virus *env* gene-like sequences in human breast cancer. *Cancer Res* 1995; 55: 5173-9.
- Wang Y, Go V, Holland JF, Melana SM, Pogo BGT. Expression of Mouse Mammary Tumor Virus-like *env* gene sequences in human breast cancer. *Clin Cancer Res* 1998; 4: 2565-8.
- Pogo BGT, Melana SM, Holland JF *et al.* Sequences homologous to the Mouse Mammary Tumor Virus *env* gene in human breast carcinoma correlate with overexpression of laminin receptor. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 2108-11.
- Liu B, Wang Y, Melana SM *et al.* Identification of a proviral structure in Human Breast Cancer. *Cancer Res* 2001; 61: 1754-9.
- Piazzon I, Nepomansky I, Buggiano V *et al.* Superantígenos y retrovirus del tumor mamario murino. *Medicina (Buenos Aires)* 1997; 57: 21-33.
- Melana SM, Holland JF, Pogo BGT. Search for MMTV-like *env* sequences in cancer and normal breast from the same individuals. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 283-4.
- Maniatis T, Fritsch E, Sambrook J. Molecular cloning: a laboratory manual. J. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1989.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S *et al.* Primed-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988; 239: 487-97.
- Etkind P, Du J, Khan A, Pillitteri J, Wiernik PH. Mouse Mammary Tumor Virus-like *env* gene sequences in human breast tumors and in a lymphoma of a breast cancer patient. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 1273-8.
- Levine PH, Mesa-Tejada R, Keydar I, Tabbane F, Spiegelman S, Mourali N. Increased incidence of mouse mammary tumor virus-related antigen in Tunisian patients with breast cancer. *Int J Cancer* 1984; 33: 305-8.
- Crépin M, Lidereau R, Chermann JC, Pouillart P, Magdamenat H, Montagnier L. Sequences related to

- mouse mammary tumor virus genome in tumor cells and lymphocytes from patients with breast cancer. *Biochem Biophys Res Comm* 1984; 118: 324-31.
23. Stewart THM, Sage RD, Stewart AFR, Cameron DW. Breast cancer incidence highest in the range of one species of house mouse, *Mus domesticus*. *Br J Cancer* 2000; 82: 446-51.
 24. Imai S. Mouse mammary tumor virus and mammary tumorigenesis in wild mice. *Pathol Int* 1996; 46: 919- 22.
 25. Franceschi S. Strategies to reduce the risk of virus-related cancers. *Ann. Oncol.* 2000; 11: 1091-6.
 26. Evans AS, Mueller NE. Viruses and cancer causal associations. *Ann Epidemiol* 1990; 1: 71-92.
 27. Hill AB. The environment and disease: Association or causation?. *Proc P. Soc Med* 1965; 58: 295-300.
 28. Melana SM, Wang Y, Dales S, Holland JF, Pogo BGT. Characterization of retroviral particles from human breast cancer. Proc. 92nd American Association Cancer Research Annual Meeting, Marzo 24-28, 2001, New Orleans, EEUU.

The WHO defined health as a state of complete physical, mental and social wellbeing- this, according to the late Petr Skrabanek, is an apt description of simultaneous orgasm, a rather celestial condition. Subsequently, "Health for All" was promised by the year 2000. In the meantime health remains undefined, defined in the negative or altogether undefinable.

La OMS definió la salud como un estado de completo bienestar físico, mental y social- esto, de acuerdo al fallecido Petr Skrabanek, es una apta descripción del orgasmo simultáneo, una condición más bien celestial. Subsecuentemente, se prometió "Salud para Todos" para el año 2000. Mientras tanto la salud permanece indefinida, definida por la negativa o indefinible.

Imre J. Loeffler

Managing chronic disease. BMJ 2001; 323: 241.

(Número del 28 de julio, dedicado a la salud de los excluidos; acceso libre: www.bmj.com).

Nota: Loeffler cita probablemente de memoria, ya que, releyendo *Follies and Fallacies in Medicine*, libro de Petr Skrabanek y James McCormick (Glasgow: Tarragon Press, 1986) dice en la página 139: *"it does not matter so much that 'a state of complete physical, mental and social well-being' is an unachievable goal (except perhaps at orgasm), although it may serve as an ideal."*

Imre J. Loeffler es cirujano en Kenia; ganó, en 1996, el Premio Wakley de la revista *The Lancet* con el ensayo: *Microbes, chemotherapy, evolution, and folly* (*Lancet* 1996; 348: 1703-4). **JAB**