



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
IZTACALA**

**Detección del gen *ENV* del virus de  
tumor mamario murino (MMTV) en  
mujeres mexicanas**

**TESIS**

Que para obtener el Título de

***BIÓLOGO***

Presenta  
**Cano Suárez Carlos Ulises**

*ASESOR: Dr. Diego Julio Arenas Aranda*



Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla de Baz,  
Estado de México. 2010.



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Genética Molecular, Unidad de Investigación Médica del Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, bajo la asesoría del Dr. Diego Julio Arenas Aranda.

El presente trabajo forma parte del trabajo de investigación:

“Estudio de mutagénesis insercional de los genes *env* y *gag* del retrovirus HMTV/MMTV en cáncer de mama de mujeres mexicanas”, el cual fue aprobado por la Comisión Nacional de Investigación Científica con número de registro 2008-785-067 (Anexo I).

## Agradecimientos

A mis Padres Rosendo Cano Estrada y Ma. Elena Suárez Paz, muchas gracias por todo el apoyo incondicional, el sacrificio y esfuerzo que me brindaron, pues a pesar de los errores nunca dejaron de creer en mí, este logro también es de ustedes.

A mi Hermana Brenda Cano Suárez por ser un apoyo en los momentos difíciles y alegres de mi vida.

A mi sobrino Fernando Armando Cano Suárez por que desde tu llegada le diste luz y alegría a la casa, con una sonrisa nos haces olvidar todos los problemas y nos das la fuerza necesaria para salir adelante.

A mi Abuelita María Estrada Ortega por enseñarme a luchar en esta vida, demostrarme que las cosas no son fáciles pero tampoco imposibles, gracias por todos los cuidados además del cariño y comprensión que siempre me has dado.

Al Dr. Diego Julio Arenas Aranda por compartir sus conocimientos y darme la oportunidad de aprender, además de brindarme todo su apoyo y enseñarme día con día que hay que trabajar con dedicación y entrega.

Al Dr. Normand García Hernández gracias por su apoyo en la realización de esta tesis, por sus consejos y revisiones, pero sobre todo por el apoyo brindado dentro y fuera del laboratorio.

A mis sinodales por el tiempo dedicado a la revisión de esta tesis, por su paciencia y sugerencias, pero sobre todo por sus sabios consejos, muchas gracias:

Dra. Marta Elena Hernández Caballero  
M. en C. María de Jesús Laura Castañeda Partida  
M. en C. María Eugenia Heres Pulido  
Dr. Ramón Víctor Moreno Torres

A Sionela Itzel Muñoz Arellano, muchas gracias por todo el apoyo brindado en este tiempo, eres una gran persona y siempre estarás en mi mente.

A David "munrra", David "gasparin", Héctor "pollo", Enrique, Yosimar, Arturo, Ricardo, muchas gracias por estar con migo en las buenas y en las malas, pero sobre todo por su amistad.

A mis compañeros de la FES: Ignacio, Fernando, Rubén Aníbal, Isabel, Daniela, Francisco "paco", Tomas, Carlos Huicochea, Carlos "chachacharly", Emilio, Mireya, Sergio, Rodrigo, Erick, Carmen, Abraham "couch", Martha, Mayra, José Luis, Aarón, Carlos "chimbombo"; gracias por todos esos momentos que compartimos, ya que ustedes fueron parte fundamental para mi desarrollo profesional y social.

A mis compañeros de laboratorio de Genética Humana por todos esos momentos de alegría dentro y fuera del laboratorio: Ruben "ruso", Ruben "gallo", Luz, Socrates, David, Susana, Araceli, Erick, Felipe, Reyna, Israel, Abraham, Jose "pepin", Nitzia.

Al COMECyT por el apoyo brindado para la terminación de este proyecto, en Diciembre del 2009.

A todos aquellos que directa e indirectamente me apoyaron muchas gracias.

*Algún día en cualquier parte, en cualquier lugar indefectiblemente te encontrarás a ti mismo, y ésa, sólo ésa, puede ser la más feliz o la más amarga de tus horas.*

Pablo Neruda

Índice	
Lista de abreviaturas	1
Índice de figuras	1
Índice de tablas	1
Resumen	2
1 Introducción	3
1.1 Cáncer de mama en México	3
1.2 Anatomía de la mama	5
1.3 Tipos de cáncer de mama	7
1.4 Estadios del cáncer de mama	8
1.5 Factores de riesgo de cáncer de mama	9
1.5.1 Edad:	10
1.5.2 Menarquía:	10
1.5.3 Paridad	10
1.5.4 Lactancia	10
1.5.5 Estrógenos	10
1.5.6 Terapia Hormonal de Reemplazo (THR) en la menopausia	11
1.5.7 Dieta	11
1.5.8 Factores genéticos	11
1.6 Virus	13
1.6.1 Clasificación de los virus	14
1.6.2 Replicación	16
1.6.3 Adsorción	17
1.6.4 Penetración	17
1.6.5 Decapsidación	17
1.6.6 Síntesis macromolecular	18
1.6.7 Maduración y liberación	19
1.7 Virus y cáncer	20
1.8 Retrovirus	20

1.9 Virus de Tumor Mamario Murino (MMTV)	23
2 Antecedentes	27
3 Justificación	29
4 Objetivos	30
5 Material y Métodos	31
5.1 Obtención de las muestras de adenocarcinomas	31
5.2 Extracción del ADN	31
5.3 Cuantificación espectrofotométrica del ADN e integridad del ADN	32
5.4 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para el gen <i>ENV</i>	33
6 Resultados	36
6.1. Obtención de muestras	36
6.2 Extracción y cuantificación de ADN	38
6.3 Localización de los oligonucleótidos para el gen <i>ENV</i> del MMTV	39
6.4 Integridad del ADN	40
6.5 Control Interno	42
6.6 Identificación del gen <i>ENV</i>	43
7 Discusión	48
8 Conclusiones	52
9 Anexo I	53
10 Anexo II	54
11 Bibliografía	56

Lista de abreviaturas

AJC	<i>American Joint Commite</i>
ARN	Acido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ADN	Acido desoxirribonucleico
bp	Pares de bases
<i>BRCA 1</i>	Gen cáncer de mama 1
<i>BRCA 2</i>	Gen cáncer de mama 2
EBV	Epstein-Barr virus
<i>ENV</i>	Gen de la envoltura
FeLV	Virus de la leucemia felina
GaLV	Virus de la leucemia en los gibones
<i>HER-2/neu</i>	Gen del factor de crecimiento epidermal humano tipo 2
HERV	Retrovirus Endógeno Humano
HMTV	Human mammary tumor virus
HTLV	Virus linfotrófico de células T humanas
HTLV-1	Virus linfotrópico de las células T tipo 1
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
kDa	Kilodalton
LTR	Repeticiones terminales largas
MMTV	Virus del tumor mamario de ratón
OMS	Organización Mundial de la Salud
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
<i>p53</i>	Gen p53
<i>Rb</i>	Gen de Retinoblastoma
SRV-1	Retrovirus de simio tipo 1
THR	Terapia Hormonal de Reemplazo
VPH	Virus del papiloma humano

## Índice de figuras

Figura 1.- Porcentaje de defunciones en mujeres debidas a tumores malignos 1998-2008.	5
Figura 2.- Anatomía de la glándula mamaria	6
Figura 3.- Ciclo reproductivo de los virus	19
Figura 4.- Genes de los retrovirus.	21
Figura 5.- Ciclo de vida retroviral	22
Figura 6.- Ciclo del virus de tumor mamario de ratón	25
Figuras 7, 8, 9, 10 y 11.- Integridad del ADN extraído.	41
Figuras 12, 13 y 14.- Amplificación del exón 28 del gen <i>Von Wildebrand</i> como control interno.	42 y 43
Figura 15, 16, 17 y 18.- Amplificación del fragmento de 660pb del gen <i>ENV</i> del MMTV.	43 y 44
Figura 19, 20, 21, 22 y 23.- Amplificación del fragmento de 250pb del gen <i>ENV</i> del MMTV.	45 y 46

## Índice de tablas

Tabla 1.- Clasificación de los virus.	16
Tabla 2.- Porcentaje de aparición del MMTV en neoplasias mamarias en diferentes países	26
Tabla 3.- Muestras obtenidas de tumores mamarios y de tejido adyacente, se muestra la edad del paciente y el diagnostico mismo.	36
Tabla 4.- Cuantificación de DNA.	38
Tabla 5.- Relación de las muestras obtenidas	47

## Resumen

El cáncer de mama se presenta como la primera causa de defunción en las mujeres mexicanas mayores de 30 años. Se han estudiado las posibles causas de su origen y alteración a nivel molecular, sin establecer claramente lo que produce dicha neoplasia. Sin embargo, se ha reportado que 15 al 20 % de los tumores malignos que afectan al ser humano tienen un origen viral. El Virus de Tumor Mamario Murino (MMTV) causa adenocarcinomas en el epitelio mamario después de un periodo de latencia en ratones y éste se puede transmitir de forma exógena y endógena.

Por lo que el objetivo de este trabajo fue detectar el gen *ENV* del MMTV en neoplasias mamarias de una muestra de mujeres mexicanas. Para alcanzar dicho objetivo se obtuvo el ADN a 40 muestras tanto tumorales como de tejido mamario no neoplásico de diferentes hospitales; se amplificó mediante PCR el gen *ENV* y el producto fue visualizado mediante electroforesis en geles de agarosa encontrando que 21 muestras de las 40 fueron positivas para MMTV y de éstas, sólo dos fueron positivas tanto para tejido neoplásico como para su tejido adyacente. Lo que nos sugiere que las secuencias retrovirales semejantes al MMTV existen en baja proporción en el genoma humano sano.

De acuerdo con los resultados de este trabajo es probable que el virus tenga algún papel en el desarrollo de la neoplasia.

## 1 Introducción

El cáncer engloba una variedad de padecimientos y ha sido objeto de estudios abordados desde distintas perspectivas, entre las que sobresalen la caracterización de las formas que adopta, el tipo de individuos que afecta, el comportamiento de sus células, los factores que lo originan y las modalidades más efectivas para su prevención y tratamiento (Cortinas, 2003).

Las células cancerosas se pueden multiplicar con algunos factores estimuladores de crecimiento, necesarios para la proliferación de las células normales y son resistentes a señales que normalmente inducen la muerte celular programada (apoptosis). Estas células frecuentemente invaden tejidos circundantes, atravesando la lámina basal que define los límites de los tejidos y diseminándose en todo el organismo para establecer áreas secundarias de crecimiento, un proceso denominado metástasis. Es por eso que las formas mutantes de los genes implicados en la regulación del ciclo celular son candidatos obvios de genes que dan lugar al cáncer. El ciclo celular está regulado por moléculas denominadas ciclinas y cinasas. La actuación de éstas y de los genes que ellas mismas controlan son importantes para la regulación de la división celular, y se está investigando la relación entre estos genes y el proceso de formación de tumores (Lodish *et al*; 2005).

### 1.1 Cáncer de mama en México

México cuenta con una población un poco mayor de 105 millones de habitantes, siendo el cáncer de mama, hoy en día, uno de los desafíos más importantes para el sector salud en nuestro país.

Las tasas de mortalidad por cáncer de mama en México muestran un aumento notorio en las últimas cinco décadas. Entre 1955 y 1960, a partir de la disposición de los primeros datos confiables, la tasa era alrededor de dos a cuatro muertes por 100,000 mujeres. Luego se elevó de manera sostenida en las mujeres adultas

de todas las edades hasta alcanzar una cifra cercana a 9 por 100,000 mujeres para la mitad de la década de 1990.

Para el año 2005, el cáncer de mama se había convertido en la segunda causa de muerte más común en México entre las mujeres de entre 30 a 54 años y la tercera más frecuente entre el grupo de 30 a 59 años (después de la diabetes y las cardiopatías).

Tan sólo en el 2006 murieron 4,451 mujeres mexicanas, lo cual implica un fallecimiento cada 2 horas. La tasa de mortalidad por cáncer mamario se incrementó 2.5 veces de 1992 al 2005, de tal forma que a partir del 2005 la tasa de mortalidad de cáncer de mama es superior a la de cáncer cérvicouterino (Lozano *et al*; 2008).

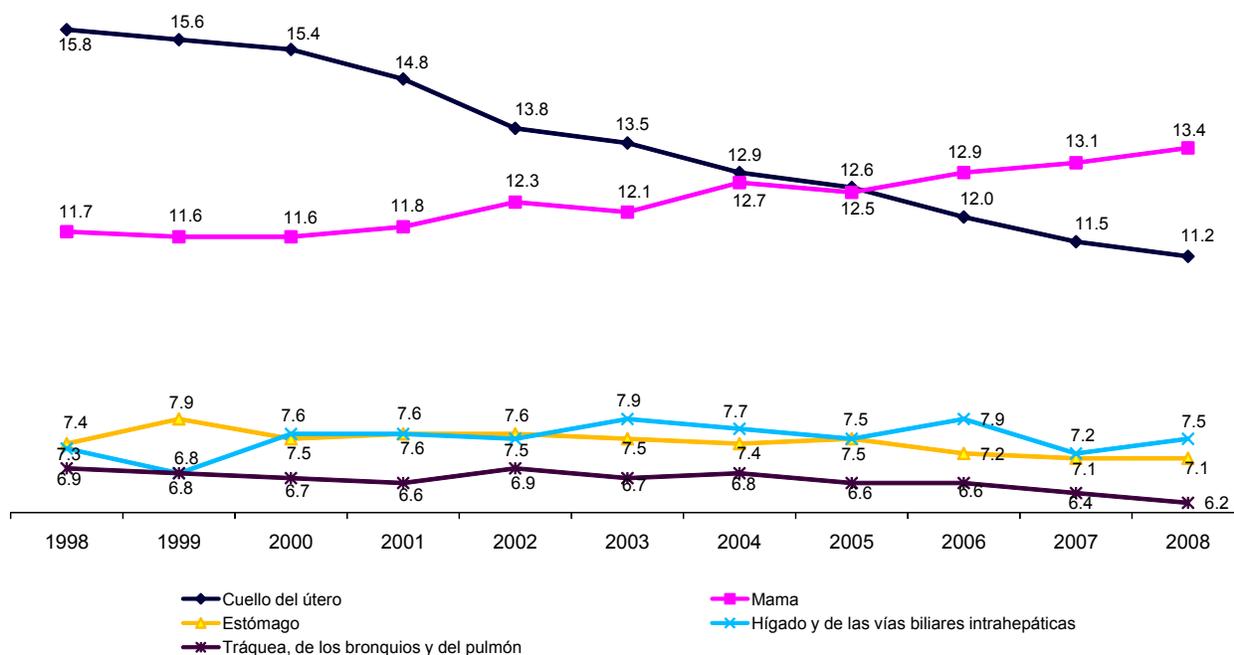
Por lo anterior, la tasa de mortalidad por cáncer mamario en México ha registrado un aumento importante de 1950 a 2005, pasando de una tasa de 2 por 100,000 mujeres a 9 por 100,000 mujeres y aumentando 2.5 veces de 1992 a 2005, por el contrario, la mortalidad por cáncer cérvico uterino ha ido descendiendo a partir de 1990, de tal forma que desde el 2005 la tasa de mortalidad de cáncer de mama es superior a la del cáncer cérvicouterino (Knaul *et al*; 2008), como se muestra en la Figura 1. En algunos estados como Jalisco la tasa de mortalidad es de 15.82% por 100,000 mujeres (Aceves, 2003). En el 2006 las mujeres mexicanas de entre 30 y 65 años presentaron un riesgo mayor de morir por cáncer mamario que por cáncer cérvico uterino, mientras que en 1980 el riesgo de morir por cáncer cérvico uterino era dos veces mayor que por cáncer mamario (Knaul *et al*; 2008).

En América Latina y el Caribe, aproximadamente 35 mil mujeres fallecen de cáncer de mama al año (Knaul *et al*; 2008).

Esta tendencia parece mantenerse en la mayoría de los estados, lo que permite estimar que en muy poco tiempo será ya la primera causa de muerte por cáncer en todo el país (Aceves, 2003).

**Porcentaje de defunciones en mujeres debidas a tumores malignos (cinco principales causas)**

1998-2008



Nota: El porcentaje está en relación con el total de defunciones por tumores registradas en cada año, en general y por sexo.

Fuente: INEGI. Estadísticas Vitales, 1998-2008. Bases de datos.

Figura 1.- **Porcentaje de defunciones en mujeres debidas a tumores malignos 1998-2008.** Los datos de defunciones ajustados por 100,000 mujeres muestran que a partir del 2005 la tasa de mortalidad del cáncer de mama es superior a la del cáncer cervicouterino (INEGI 2008).

## 1.2 Anatomía de la mama

La mama que contiene a la glándula mamaria (tejido secretor) se extiende verticalmente desde la segunda a la sexta costilla inclusive y horizontalmente desde el lado del esternón a la línea axilar media. Cada glándula mamaria esta constituida por un parénquima, conformado por el componente epitelial glandular y el estroma formado por el tejido conjuntivo, que le da armazón de sostén. El elemento glandular que se desarrolla en un solo conducto lactífero (conducto galactóforo) se denomina lóbulo, y está subdividido en lobulillos que corresponden a las ramificaciones del sistema de conductos. Los conductos lactíferos varían entre 16 y 24. Los conductos mamarios reciben nombres diferentes en sus distintas partes, reconociéndose así, desde el pezón y en sentido distal para cada lóbulo, el conducto colector, el seno galactóforo, el conducto galactóforo, los

ductos mayores y las unidades terminales ductales, que constituyen los lobulillos mamarios (Ordi J, 2003).

El tejido conjuntivo de sostén de la mama no forma una verdadera cápsula y se continua con el tejido subcutáneo adyacente. El tejido conjuntivo además contiene acúmulos de tejido adiposo relativamente grandes, excepto bajo el pezón y la areola (Arraztoa, 2004).

Los engrosamientos fibrosos del tejido conjuntivo se interdigitan entre el tejido parenquimoso de la mama, se extienden desde la capa profunda de la aponeurosis superficial (hipodermis) y se fijan a la dermis de la piel. Estas estructuras suspensorias, que se denominan ligamentos de Cooper, se insertan en forma perpendicular con respecto a las delicadas capas de la aponeurosis superficial de la dermis y por ende permiten una notable movilidad de la mama a la vez que proporcionan sostén (Ver Figura 2) (Kirby, 2000).

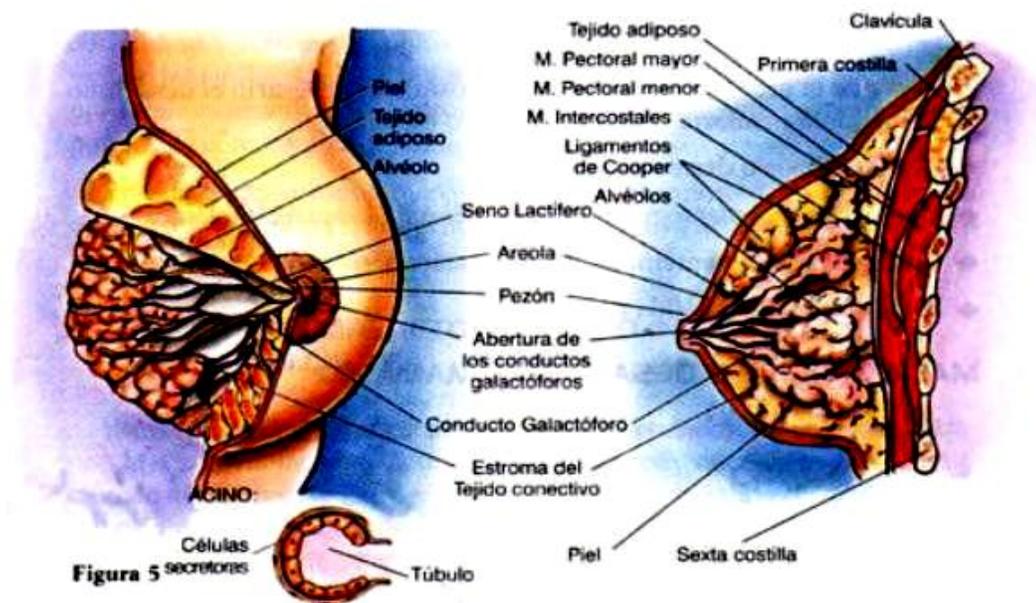


Figura 2.- Anatomía de la glándula mamaria (Avilés, 2010).

En la vida postnatal de los varones normalmente existe poco desarrollo adicional y la glándula sigue siendo rudimentaria. En la mujer en cambio, las mamas experimentan un desarrollo posterior importante que se correlaciona con la edad está regulado por hormonas que influyen en la función reproductora. Alrededor de

los 20 años de edad las mamas han alcanzado un desarrollo máximo y hacia los 40 comienzan los cambios atróficos (Arraztoa, 2004).

### 1.3 Tipos de cáncer de mama

El cáncer de mama se presenta con mayor frecuencia en células de la estirpe epitelial (de tipo ductal en un 70-85% y en el lobulillar en un 5-15% de los casos), aunque cualquiera de los tejidos que componen la mama puede albergar una neoplasia (Ruiz, 1993). Cuando los cánceres de mama son de tipo epitelial se denominan más propiamente carcinomas; al proceder de una glándula se denominan adenocarcinomas. Siguiendo la clasificación histológica de la OMS, para los tumores mamarios malignos, podemos dividir a los tumores epiteliales según la clasificación siguiente:

*Carcinoma ductal in situ*: Se origina en las células de las paredes de los conductos mamarios. Es un cáncer muy localizado, que no se ha extendido a otras zonas no ha producido metástasis. Este tipo de tumor se puede detectar a través de una mamografía.

*Carcinoma ductal infiltrate (o invasivo)*: Se inicia en el conducto mamario pero logra atravesarlo, pasa al tejido adiposo de la mama luego puede extenderse a otras partes del organismo. Es el más frecuente de los carcinomas de mama, se da en un 80% de los casos.

*Carcinoma lobular in situ*: Se produce en las glándulas mamarias (o lóbulos) y aunque no es un verdadero cáncer, aumenta el riesgo de que la mujer puede desarrollar un tumor en el futuro. Suele presentarse antes de la menopausia, pero una vez detectado es importante que la mujer se realice una mamografía de control anual, para poder vigilar un posible desarrollo de cáncer.

*Carcinoma lobular infiltrante (o invasivo)*: Comienza en las glándulas mamarias pero se puede diseminar y destruir otros tejidos del cuerpo. Del 10 – 15% de los

tumores de mama son de este tipo. Este carcinoma es más difícil de detectar a través de una mamografía.

Carcinoma inflamatorio: Es un cáncer poco común, tan solo representa un 1% del total de los tumores cancerosos de mama. Es agresivo y de rápido crecimiento. Hace enrojecer la piel del seno y aumentar su temperatura. La apariencia de la piel se vuelve gruesa y ahuecada, como la de una naranja y pueden aparecer arrugas y protuberancias. Estos síntomas se deben al bloqueo que producen las células cancerosas sobre los vasos linfáticos [NBCO, 2004].

#### 1.4 Estadios del cáncer de mama

Se emplean dos nomenclaturas bien conocidas para la estadificación de los pacientes, que si bien tienen algunas diferencias emplean los mismos conceptos. Éstas son AJC (*American Joint Commite*) y TNM (tumor (T), el grado de diseminación a los ganglios linfáticos (N), y la presencia de metástasis (M)). Ambas con cuatro estados:

##### Estadio I

En el estadio I, el cáncer se ha formado. El tumor mide dos centímetros o menos y no se diseminó fuera de la mama.

##### Estadio II, este estadio se divide en IIA y IIB

En el estadio IIA el cáncer se encuentra en los ganglios linfáticos axilares además el tumor puede medir mas de dos centímetros pero no más de cinco centímetros.

En el estadio IIB el tumor tiene alguna de las siguientes características: Mide más de dos centímetros, pero no más de cinco centímetros y se diseminó hasta los ganglios linfáticos axilares o mide más de cinco centímetros, pero no se diseminó hasta los ganglios linfáticos axilares.

El estadio III se divide en IIIA, IIIB y IIIC

En el estadio IIIA el cáncer se encuentra en los ganglios linfáticos axilares que están unidos entre sí o a otras estructuras; el cáncer se puede encontrar en los ganglios linfáticos cercanos al esternón; el tumor puede medir más de cinco centímetros.

En el estadio IIIB, el tumor puede tener cualquier tamaño y el cáncer se diseminó hasta la pared del pecho o a la piel de la mama y se puede haber diseminado hasta los ganglios linfáticos axilares que están unidos entre sí o a otras estructuras; por otro lado el cáncer se puede haber expandido hasta los ganglios linfáticos cercanos al esternón.

En el estadio IIIC, el tumor puede tener cualquier tamaño y se puede haber diseminado hasta la pared del pecho o a la piel de la mama. Asimismo, el cáncer se diseminó hasta los ganglios linfáticos por arriba o debajo de la clavícula; y se puede haber esparcido hasta los ganglios linfáticos axilares o hasta los ganglios linfáticos cercanos al esternón.

En el estadio IV, el cáncer se diseminó hasta otros órganos del cuerpo, con mayor frecuencia hasta los huesos, los pulmones, el hígado o el cerebro (Arraztoa, 2004; NCI).

### 1.5 Factores de riesgo de cáncer de mama

Los estudios epidemiológicos han mostrado la existencia de asociación entre diferentes atributos o exposiciones y una mayor frecuencia de la enfermedad. Los factores de riesgo del cáncer de mama que ha evidenciado la epidemiología son de diversos tipos incluyéndose componentes genéticos y familiares, endocrinos, sexualidad, natalidad y dieta entre otros (Pike *et al*; 1981; Dupont *et al*; 1985) éstos deben de ser tomados en cuenta en la valoración del cáncer de mama y a continuación se describen algunos de ellos:

#### 1.5.1 Edad:

La incidencia de cáncer de mama aumenta rápidamente con la edad, especialmente durante los años reproductivos, y continúa su incremento. El riesgo de tener cáncer de mama a los 50 años se considera aproximadamente de 1 a 400, siendo 10 veces mayor que a los 30 años de edad cuando el índice es de 1 en 4200.

#### 1.5.2 Menarquía:

Diversos estudios han publicado que por cada dos años de atraso en el comienzo de la menarca, influyen sobre el riesgo disminuyéndolo un 10%. Por el contrario el riesgo es dos veces mayor cuando la menopausia ocurre después de los 55 años.

#### 1.5.3 Paridad

En la mujer cuyo primer embarazo ocurre antes de los 18 años, se aprecia un efecto protector del embarazo al estar asociado con una reducción del 50% en el riesgo de presentar cáncer de mama, esto al compararlas con mujeres cuyo primer embarazo ocurrió después de los 30 años.

#### 1.5.4 Lactancia

Cuando la lactancia es muy prolongada ella tiene un marcado efecto protector sobre la mama, debido a que ésta es una etapa anovulatoria en la que los niveles de estrógenos son reducidos y por lo tanto el desarrollo tumoral no es favorecido (Avilés, 2010).

#### 1.5.5 Estrógenos

La epidemiología de la enfermedad muestra claramente que los factores hormonales juegan un papel importante en la carcinogénesis mamaria.

El estrógeno estimula la mitosis en las células epiteliales de la mama y este efecto mitogénico puede verse aumentado por la progesterona. La menarquía precoz y la menopausia tardía aumentan el riesgo relativo debido a un mayor tiempo de exposición a altas concentraciones de estrógeno a que están sometidas las mamas durante el periodo activo de la mujer.

#### 1.5.6 Terapia Hormonal de Reemplazo (THR) en la menopausia

La THR es una de las terapias más efectivas para corregir la deficiencia de los estrógenos y mejorar la sintomatología producida por la declinación de la función ovárica que se manifiesta en la menopausia. El riesgo va en aumento de 2% por año, cuando se usa el estrógeno solo y de 4% por año cuando se emplea estrógeno combinado con progesterona.

#### 1.5.7 Dieta

El alcohol parece aumentar el riesgo, probablemente por el aumento de los niveles de estradiol en la fase periovulatoria. Sin embargo, en cuanto a la ingesta de grasa no hay estudios concluyentes, en la mayoría de los casos no parece haber asociación entre el riesgo de padecer cáncer de mama y el consumo de grasa en adultos. El consumo de tabaco parece aumentar el riesgo relativo e incluso algunos trabajos describen el aumento de la agresividad del tumor, esto quizás debido a la cantidad y calidad de los componentes como el benzopireno, las nitrosaminas y las aminas aromáticas (Zamora *et al*; 2001).

#### 1.5.8 Factores genéticos

Se estima que 15 a 20% de mujeres con cáncer de mama tienen historia familiar de la enfermedad, con un 5 al 10% de todos los casos de esta neoplasia atribuidos a susceptibilidad de alelos dominantes, y se han encontrado varios genes asociados a la enfermedad.

El cáncer de mama, al igual que otros cánceres, se desarrolla en un proceso complejo que involucra diversas etapas, en las cuales una célula normal sufre cambios genéticos o mutaciones que afectan a conjuntos de genes denominados como protooncogenes y genes supresores de tumores. Estos genes están relacionados con los controles de: proliferación, diferenciación y posición, que ocurren en las diversas células de nuestro organismo. Cuando ocurren mutaciones en estos genes dichos controles se afectan y las células proliferan sin control (hiperplasia), se alteran las características de diferenciación (anaplasia) y se modifica la conducta social de las células permitiendo su invasión a otros tejidos u órganos para desarrollar nuevos eventos proliferativos (metástasis).

Dos genes principales han sido identificados para susceptibilidad a cáncer de mama *BRCA1* y *BRCA2*. Las mutaciones heredadas de estos dos genes, confieren un mayor riesgo de desarrollar cáncer de mama. Tanto el gen *BRCA1* como *BRCA2* están implicados en el mantenimiento de la estabilidad del genoma, específicamente la vía de recombinación homóloga para la reparación de ADN de doble cadena. Estos genes se consideran genes supresores de tumores ( NCBI ). Además de la alteración de otra molécula como el gen *p53* que está localizado en el cromosoma 17p13, este gen codifica para una fosfoproteína nuclear de 53kD, que en condiciones normales regula la respuesta celular ante un daño en el ADN. La proteína *p53* regula negativamente la progresión del ciclo celular debido al efecto inhibitorio que realiza al inducir la producción de la proteína p21 que incide sobre diferentes complejos de cdk/ciclina en presencia de un daño en el ADN, produciendo una detención en la transición G1/S y en la G2/M (Herrera *et al*; 2004).

El gen del retinoblastoma (*Rb*): se localiza en el cromosoma 13q14 y codifica una fosfoproteína nuclear de 105 kDa. El producto del gen supresor de tumores *Rb*, ejerce su efecto durante la primera parte de la fase G1 del ciclo celular. En este período o en las células quiescentes, esta proteína es unida al factor de la transcripción E2F. Este complejo tiene 2 funciones, en primer lugar, muchos de los genes cuyos productos son esenciales para la fase S de dicho ciclo dependen de

la actividad del factor E2F. Por tanto el *Rb*, mediante el secuestro de este factor de la transcripción garantiza que la fase S no pueda ser iniciada. En segundo lugar, el complejo E2F-RB reprime la transcripción de otros genes. En el punto de restricción de la fase G1 del ciclo celular o cerca del mismo el *Rb* es fosforilado por el complejo quinasa/ dependiente de ciclinas y esta fosforilación causa la liberación del factor E2F por el *Rb*, el cual entonces activa los genes cuyas funciones son requeridas para la fase S, también reprime otros genes cuya función estaba controlada por el mismo complejo.

Uno de los oncogenes mejor estudiados en los cánceres mamarios es el denominado *HER-2/neu*. Durante la oncogénesis de los tumores mamarios se generan cambios genéticos en los cuales el gen *HER-2/neu* aumenta su número de copias en el ADN celular. Este proceso de amplificación permite que el gen se active y se exprese produciendo gran cantidad de RNAm y proteína receptora de membrana. La secuencia usual de la transformación oncogénica a la malignidad en ciertos tumores parece iniciarse con la amplificación de *HER-2/neu*. Esto genera un aumento en el número de copias superior a las dos que existen en las células normales. Generalmente se suelen detectar 10 ó más copias de *HER-2/neu* por células en los tumores mamarios en que existe amplificación y sobreexpresión.

Esta sobreexpresión del gen y el aumento de su proteína se detecta en el 25-30% de los tumores mamarios, y en el 90 a 95% de estos casos esta desregulación se debe a la amplificación del gen *HER-2/neu* (Arraztoa, 2004; Ríos *et al*; 2001).

## 1.6 Virus

Otro factor a consideración son los virus ya que algunos tipos de cáncer están asociados a éstos. Los virus son parásitos intracelulares obligados carecen de las enzimas y organelos celulares necesarios para vivir y, en consecuencia, deben utilizar los organelos de sus hospederos. Los virus contienen ADN o ARN; utilizan los sistemas de síntesis de la célula para la duplicación de la partícula infectante, llamada virión (Jean, 1977; Jensen *et al*; 1996).

El virión está formado por una molécula de ácido nucleico rodeada de una capa de proteínas llamada cápside. Estas dos formaciones en conjunto se denominan nucleocápside, que en los virus llamados envueltos está rodeada de una proteína matriz y de una membrana lipídica o envoltura, que suelen adquirir de la membrana citoplasmática de la célula infectada (Cobo, 2003).

Algunos virus constan únicamente de nucleocápsides desnudas, en tanto que otros poseen una envoltura o peplos aparentemente formado por membrana celular, hablándose entonces de virus "envueltos". Algunas envolturas están cubiertas de "espigas", que son proyecciones superficiales de distintas longitudes, separadas por intervalos regulares. Las espigas obedecen a algún código propio del virus y están incorporadas en la membrana de la célula huésped antes de que el virus madure y se libere (Jean, 1977).

#### 1.6.1 Clasificación de los virus

Los virus se clasifican según criterios genéticos, físico-químicos y biológicos. Entre ellos, el tipo y estructura del ácido nucleico (ARN o ADN monocatenario o bicatenario), simetría de la nucleocápside, presencia de una envoltura, o su ausencia, tamaño y forma del virión y número de capsómeras en los virus icosaédricos y diámetro en la espiral de los virus helicoidales (Cobo, 2003; Jean, 1977).

Las familias virales se organizan de acuerdo con la composición genómica en siete grupos arbitrarios que se conocen como la clasificación de Baltimore (Ver tabla 1):

- Grupo I: Virus con genoma de tipo ADN de doble cadena (Poxviridae, Herpesviridae, Adenoviridae y Papovaviridae). De éstas, las familias Adenoviridae y Herpesviridae se replican en el núcleo celular. La familia Poxviridae se replica en el citoplasma.
- Grupo II: Virus con genoma de tipo ADN de cadena única (Parvoviridae). La replicación de esta familia viral se realiza en el núcleo. Se sintetiza la

cadena (-) de ADN que a su vez sirve como molde para la síntesis de cadenas ARNm y para la síntesis de genomas virales.

- Grupo III: Virus con genoma de tipo ARN de doble cadena (Reoviridae). El genoma de los miembros de esta familia viral es segmentado. Cada segmento se transcribe en forma independiente para producir ARNm monocistrónico.
- Grupo IV: Virus con genoma de tipo ARN de cadena sencilla y sentido positivo (+) (Caliciviridae, Picornaviridae, Togaviridae, Flaviviridae, Coronaviridae). En el caso de los Picornaviridae el ARN es policistrónico.
- Grupo V: Virus con genoma tipo ARN de cadena sencilla y sentido negativo (-) (Paramyxoviridae, Orthomyxoviridae, Bunyaviridae, Rhabdoviridae, Filoviridae, Arenaviridae). Estos virus requieren de una ARN polimerasa ARN dependiente. En caso de la familia Orthomyxoviridae se producen ARNm monocistrónicos que sirven de molde para la síntesis genómica. En los virus de cadena única se producen también ARN monocistrónicos.
- Grupo VI: Virus con genoma de tipo ARN de cadena sencilla, sentido (+) y ADN intermediario en su ciclo (Retroviridae). Son los únicos virus en los que el ARN no codifica sino que sirve de molde para la transcripción inversa.
- Grupo VII: Virus con genoma tipo ADN con ARN intermediario (Hepadnaviridae). Como los retrovirus, también hacen retrotranscripción, pero a diferencia de ellos se lleva a cabo durante el proceso de maduración viral.

Todos los virus, cualquiera que sea su genoma, confluyen por diferentes mecanismos de transcripción en la producción a nivel intracelular con la formación de ARNm para la traducción final a proteínas virales (Vargas, 2002; Raisman, 2007).

Tabla1.- **Clasificación de los virus.** Clasificación de las partículas virales dependiendo su tipo de genoma

Tipo de genoma	Virus	Virus tipo
ADN de doble cadena	Poxviridae Herpesviridae Adenoviridae Papovaviridae	Viruela HSV1 y 2, EBV, CMV Adenovirus HPV
ADN de cadena sencilla	Parvoviridae	Parvovirus B19
ARN de doble cadena	Reoviridae	Rotavirus
ARN de polaridad positiva	Caliciviridae Picornaviridae Togaviridae Flaviviridae Coronaviridae Retroviridae	Calicivirus, agente Norwalk Polio, HAV Rubéola YFV, Dengue, HCV Coronavirus VIH
ARN de polaridad negativa	Paramyxoviridae Orthomyxoviridae Bunyaviridae Rhabdoviridae Filoviridae Arenaviridae	Parainfluenza, RSV Influenza A, B y C Hantavirus Rabia Ebola Junin, Machupo
ADN de doble cadena incompleta	Hepadnaviridae	Hepatitis B

### 1.6.2 Replicación

La replicación de los virus varía dependiendo de la estructura del virus y del tipo de material genómico. En general, las etapas necesarias para la replicación viral son las siguientes:

### 1.6.3 Adsorción

El virus se une a la superficie de la célula. La tasa de adsorción está determinada por las concentraciones de viriones y células; el virus aporta las proteínas de unión (*viral attachment units*) y por otro lado las células aportan los receptores de membrana.

En esta adsorción intervienen unas proteínas situadas en la superficie del virión, llamadas proteínas de unión del virión, y otras proteínas de la superficie celular, llamadas proteínas receptoras.

En los virus envueltos, la proteína de adherencia viral es una de las espículas insertadas en la superficie externa de la envoltura viral. (Jean, 1977; Cobo, 2003, Passarge, 2004).

### 1.6.4 Penetración

Una vez adherido, el virión es transportado a través de la membrana citoplasmática de la célula. Esta penetración puede realizarse por varios mecanismos:

Penetración directa: la membrana solo permite la entrada del genoma viral (se produce en algunos virus no envueltos).

Endocitosis o viropexia: es el utilizado sobre todo por los virus no envueltos. Los viriones adsorbidos quedan rodeados por la membrana citoplasmática de la célula huésped, formándose un endosoma.

Fusión: se produce sobre todo en los virus envueltos. En algunos virus (paramixovirus), la envoltura viral se fusiona directamente con la membrana citoplásmica celular y la nucleocápside viral se libera hacia el citoplasma; en otros virus (ortomixovirus, togavirus), la envoltura viral se fusiona con la membrana endosómica para liberar la nucleocápside hacia el citoplasma.

### 1.6.5 Decapsidación

Es la degradación de toda o parte de la cápside viral para liberar el genoma viral. En la mayoría de los virus, la penetración y decapsidación se producen a la vez. Las señales que permiten este proceso están causadas por la unión del virión al

receptor o la exposición de la partícula viral a un ambiente de pH bajo el que se encuentra a nivel de los endosomas. (Jean, 1977; Passarge, 2004).

#### 1.6.6 Síntesis macromolecular

Este paso requiere la formación de un ARNm a partir de una molécula de ADN o la formación de una cadena de ARN complementario en caso de virus con genoma en forma de ARN.

En los virus que poseen ARN de polaridad positiva (+) es decir que el genoma se comporta como un ARNm, por lo tanto puede ser usado directamente para la síntesis de proteínas, sin requerir la síntesis de ácidos nucleicos complementarios. En los virus con ARN de polaridad negativa (-), el material genético posee la secuencia de nucleótidos necesaria para la síntesis del ARN complementario el cual funciona como mensajero. Este ARN (-) requiere de una ARN polimerasa ARN dependiente (transcriptasa) que es codificada por el virus.

Para la producción de ARN mensajero o para la replicación genómica los virus poseen unas enzimas que se denominan ARN polimerasas ARN dependientes. Estas enzimas cumplen con funciones de replicación cuando la función es la de copiar el ARN viral para formar nuevos genomas. Cuando las enzimas producen ARNm se designa que tienen una función de transcripción. La mayoría de los virus ADN se multiplican en el núcleo y dependen de ARN polimerasas celulares ADN dependientes.

Traducción: En algunos sistemas el ARNm es de tipo monocistrónico y permite la síntesis de un gran péptido que sufrirá los clivajes correspondientes por parte de proteasas celulares o de origen viral (proceso autocatalítico) para dar lugar a las diferentes proteínas.

Replicación del material genético: durante esta fase tiene lugar la síntesis de ARN o ADN viral que sigue el esquema de Watson y Crick de bases complementarias. En el caso de virus con genoma de tipo ADN estos pueden utilizar durante esta fase las ADN polimerasas de la célula presente en el núcleo celular. Los virus de la familia Poxviridae poseen su propia ADN polimerasa, razón por la cual se replican en el citoplasma de la célula hospedera. En el caso de virus cuyo genoma

se encuentra en forma de ARN se utilizan replicasas que tienen como función la formación de ARN a partir de cadenas complementarias o intermediarios replicativos que sirven de molde o templete. (Cobo, 2003, Passarge, 2004).

### 1.6.7 Maduración y liberación

Tras la replicación del genoma viral y la síntesis de las proteínas virales, los viriones intactos tienen que ensamblarse y ser liberados desde la célula huésped.

El proceso de maduración o ensamblaje consiste en la unión espontánea y ordenada del ácido nucleico y las proteínas para formar la nucleocápside dando lugar a un virión viable.

La liberación de los virus de la célula infectada puede ocurrir de diferente manera según tenga o no envoltura:

En virus no envueltos, éstos carecen de mecanismos específicos para liberarlos, y con la lisis celular se liberan partículas virales hacia el medio extracelular.

En virus envueltos, la salida es mediante gemación; el sitio de la membrana donde se producirá la gemación adquiere espículas y proteínas de la matriz primariamente, antes de formar la envoltura y liberarse al exterior (Ver figura 3) (Jean, 1977; Cobo, 2003, Passarge, 2004).

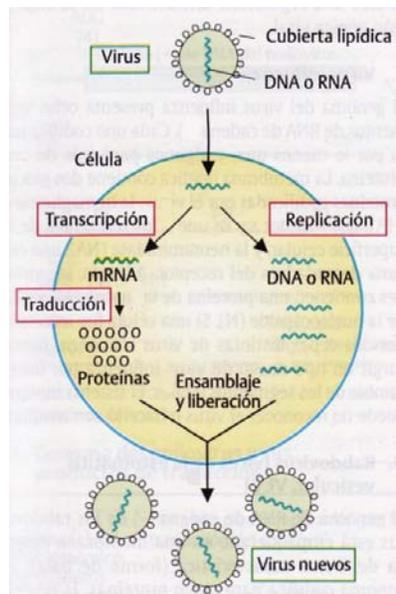


Figura 3.- **Ciclo reproductivo de los virus.** Diversas fases del ciclo de vida de los virus y retrovirus (Passarge, 2004).

## 1.7 Virus y cáncer

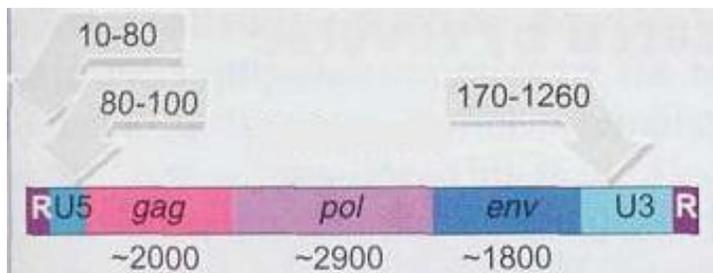
Entre los agentes causantes de la alteración de los genes preexistentes a oncogenes se encuentran los virus, tanto de ADN como de ARN. Un grupo de virus ARN, los retrovirus, y muchos tipos de virus DNA pueden favorecer la transformación; a estos virus se les denomina virus oncogénicos.

Se calcula que 15% de todos los cánceres humanos tienen un origen viral. Dentro de los virus que provocan cáncer uno de los mas importantes es el papilomavirus (VPH), agente causal del cáncer cervicouterino, responsable en más del 80% de los casos del cáncer cervicouterino y anogenital, siendo así la segunda causa de muerte en mujeres mexicanas y la quinta causa por cáncer en toda la población mexicana (Damin *et al*; 2004)( base de datos SSA, 2006). Los virus de la hepatitis B y C se relacionan con el carcinoma hepatocelular, (Stuver *et al*; 1997); el virus del herpes tipo 8 que se encuentra en los tejidos de las cuatro formas de sarcoma de Kaposi, (Iscoyich *et al*; 2000); el virus de Epstein-Barr (EBV) que preferencialmente infecta a los linfocitos B se le ha relacionado con diferentes carcinomas nasofaríngeos y con el linfoma de Burkitt, (Young *et al*; 2004) y el virus linfotrópico de las células T tipo 1 (HTLV-1) que por lo menos causa dos tipos de enfermedad: los linfomas o leucemias y una variedad de síndromes inflamatorios crónicos (Bangham, 2004).

## 1.8 Retrovirus

Los retrovirus tienen genomas de ARN de cadena sencilla que se replican a través de un intermediario de ADN de cadena doble. El ciclo vital del virus comprende una fase obligatoria en la que el ADN de cadena doble se inserta en el genoma del hospedero y genera repeticiones directas cortas del ADN diana (Lewin, 2004).

El genoma de todos los retrovirus está integrado por tres genes principales y cada gen genera diferentes proteínas (Figura 4).



Cada gen genera diferentes productos proteicos	
<i>Gag</i>	MA= Matriz (localizada entre la nucleocápside y la envuelta viral) CA= Cápside (componente estructural principal) NC= Nucleocápside (empaqueta el ARN)
<i>Pol</i>	PR= Proteasa (rompe Gag-Pol y Env) RT= Transcriptasa inversa (sintetiza el ADN) INT= Integrasa (integra el ADN del provirus en el genoma)
<i>Env</i>	SU= Proteína de la superficie (espinas sobre el virión que interactúan con el huésped) TM= Transmembrana (media la fusión virus-huésped)

Figura 4.- **Genes de los retrovirus.** Se muestran los tres genes principales y los productos proteicos que codifican (Lewin, 2004).

La síntesis de ADN de un retrovirus se da gracias a la transcriptasa inversa del ARN a ADN. Para esto se necesita que un cebador de ARNt de la célula huésped se hibride al extremo 5' del genoma de ARN, después se sintetiza la primera cadena y se remueve el cebador de ARNt, comenzando la síntesis de la segunda cadena (cadena+) en la región RU5. La cadena de ADN (cadena -) formada con anterioridad sirve como *primer*. A medida en que continúa la síntesis, el ARN remanente se degrada (la transcriptasa inversa posee actividad de RNAasa) y la cadena de ADN (+) se sintetiza por completo (Lewin, 2004).

La copia de ADN de cadena doble del virus, contiene repeticiones terminales largas (*long terminal repeats*) en ambos extremos. Éstos le permiten al intermediario de ADN viral integrarse al ADN de la célula huésped y ellos contienen las secuencias reguladoras necesarias para transcribir al provirus.

La integración se produce en lugares aleatorios. Esto puede alterar genes celulares (mutación por inserción).

Los genes virales de un ADN proviral son transcritos por la ARN polimerasa. El ARNm resultante sirve tanto para la traducción como para la producción de genomas de ARN nuevos que se empaquetan dentro del virión. Algunos genomas retrovirales pueden contener un oncogén viral adicional. Si éstos entran en la célula con los virus pueden cambiar (transformar) la célula huésped de modo que su ciclo celular se altere y la célula se convierta en el origen de un tumor.

Para la integración del retrovirus en el ADN de la célula del huésped, el ADN de cadena doble, producido a partir del ARN genómico del virus, va a formar una estructura anular, uniendo las LTR (*long terminal repeats*) o repeticiones terminales largas. Esto es posible debido a que los LTR contienen secuencias nucleotídicas complementarias; estas secuencias de reconocimiento en los LTR y en el DNA celular permiten que se abra el ADN viral circular y una vez abierto en un sitio específico este ADN viral se integra al ADN celular del huésped. Los genes virales luego pueden transcribirse a partir del provirus integrado (Figura 5) (Passarge, 2004).

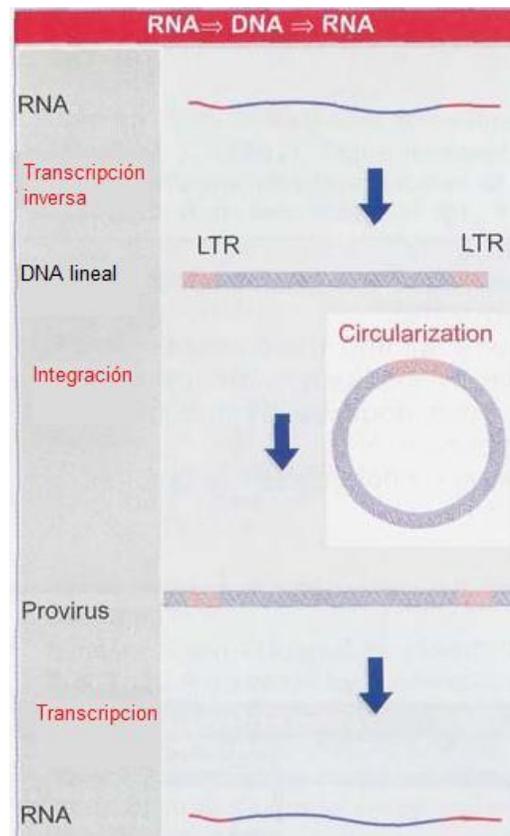


Figura 5.- Ciclo de vida retroviral (Lewin, 2004).

En el genoma también existen retrovirus endógenos, los cuales son virus que se encuentran en el genoma del hospedero, se transmiten de manera vertical y no tienen la capacidad de producir partículas virales. En los ratones, representaría hasta un 0.5% del DNA total. En la actualidad se han distinguido y clasificado los que se encuentran en los humanos HERV (*Human endogenous retroviruses*). La clase I de HERV se relaciona con los retrovirus tipo C de los mamíferos, como el virus de la leucemia felina (FeLV), el virus de la leucemia en los gibones (GaLV) y el virus linfotrófico de células T humanas (HTLV). La clase II de HERV es más similar a los retrovirus tipo B y D de los mamíferos, como los virus de la leucosis en aves, el virus del tumor mamario de ratón (MMTV), el retrovirus de simio tipo 1 (SRV-1) y el virus del sarcoma de Rous en aves (Wilkinson *et al*; 1994; Boeke *et al*; 1997).

El genoma humano contiene al menos 50 copias de los retrovirus endógenos humanos K (HERV-K), que están relacionados con el virus del tumor mamario de ratón (MMTV). Se han encontrado transcritos de secuencias del gen *ENV* de HERV-K en tejidos de cáncer mamario y otros tipos de cáncer (Barbulescu *et al*; 1999).

En los últimos tiempos se ha hecho referencia a algunos retrovirus endógenos y exógenos que infectan a los mamíferos y que están implicados en el origen del cáncer de mama en humanos. En la búsqueda de una causa viral del cáncer mamario se han analizado algunos virus como posibles responsables, éstos son: VPH, EBV y MMTV (virus de tumor mamario murino). Es posible que éstos actúen como cofactores con la dieta, los estrógenos y otras hormonas en el inicio y promoción de algunos tipos de cáncer de mama en mujeres genéticamente susceptibles (Bonnet *et al*; 1999; Liu *et al*; 2001; De Villiers *et al*; 2005).

### 1.9 Virus de Tumor Mamario Murino (MMTV)

El virus del tumor mamario murino (MMTV) es el causante del cáncer de mama y de la leucemia en algunas cepas de ratones. Es un retrovirus de tipo B descubierto por Bittner hace más de medio siglo (1936) que se transmite por la

leche de una ratona a sus crías. Por lo general, causa adenocarcinomas en el epitelio mamario después de un largo periodo de latencia (Jonkers *et al*; 1996; Matzuzaka *et al*; 1995). Su transmisión puede ser por vía endógena y exógena.

En la vía endógena los ratones heredan la secuencia viral a través de la vía germinal e infectan a todas las células del cuerpo. El MMTV es un virus que reacciona al estrógeno durante la lactación con la influencia de las hormonas esteroides y aumenta su expresión en las glándulas mamarias, lo que da como resultado que se secreten las partículas virales por medio de la leche y se transmita a la prole en forma exógena (Jonkers *et al*; 1996; Mant *et al*; 2004).

El virus entra al aparato digestivo de los lactantes e infecta a las células B que están en las placas de Peyer. La región 3' del genoma viral (LTR) codifica a un súper antígeno (Sags) que estimula la respuesta de las células T, lo que produce la proliferación de estas células y la susceptibilidad para ser infectadas por MMTV (Jonkers *et al*; 1996; Choi *et al*; 1991).

Al cabo de tres o cuatro semanas del nacimiento de las crías del ratón, la infección del virus se eleva y es más fácil que pueda infectar a las glándulas mamarias (Brandt *et al*; 1993) (Figura 6). El mecanismo de transformación viral de MMTV es por mutagénesis insercional y la inserción del ADN proviral en el ADN del hospedero activa protooncogenes o inactiva los genes supresores de tumor (Jonkers *et al*; 1996). En los últimos años se han acumulado importantes pruebas que indican las posibilidades de que este retrovirus (MMTV) o uno de sus homólogos (HMTV) desempeñan un papel importante en la manifestación del cáncer de mama en humanos. Existe la hipótesis de que este virus está implicado en el origen del cáncer mamario en humanos. Los estudios realizados demuestran: 1) partículas virales semejantes a MMTV en biopsias de cáncer mamario, líneas celulares y leche materna; 2) hallazgos serológicos en mujeres con cáncer de mama, y 3) secuencias de ADN o ARN semejantes a MMTV (Mant *et al*; 2004). Se cree que el MMTV puede transmitirse de forma zoonótica a las personas por medio del ratón doméstico *Mus domesticus*, pues se ha observado una relación entre la incidencia del cáncer de mama en humanos y la incidencia elevada del ratón (Stewart *et al*; 2000).

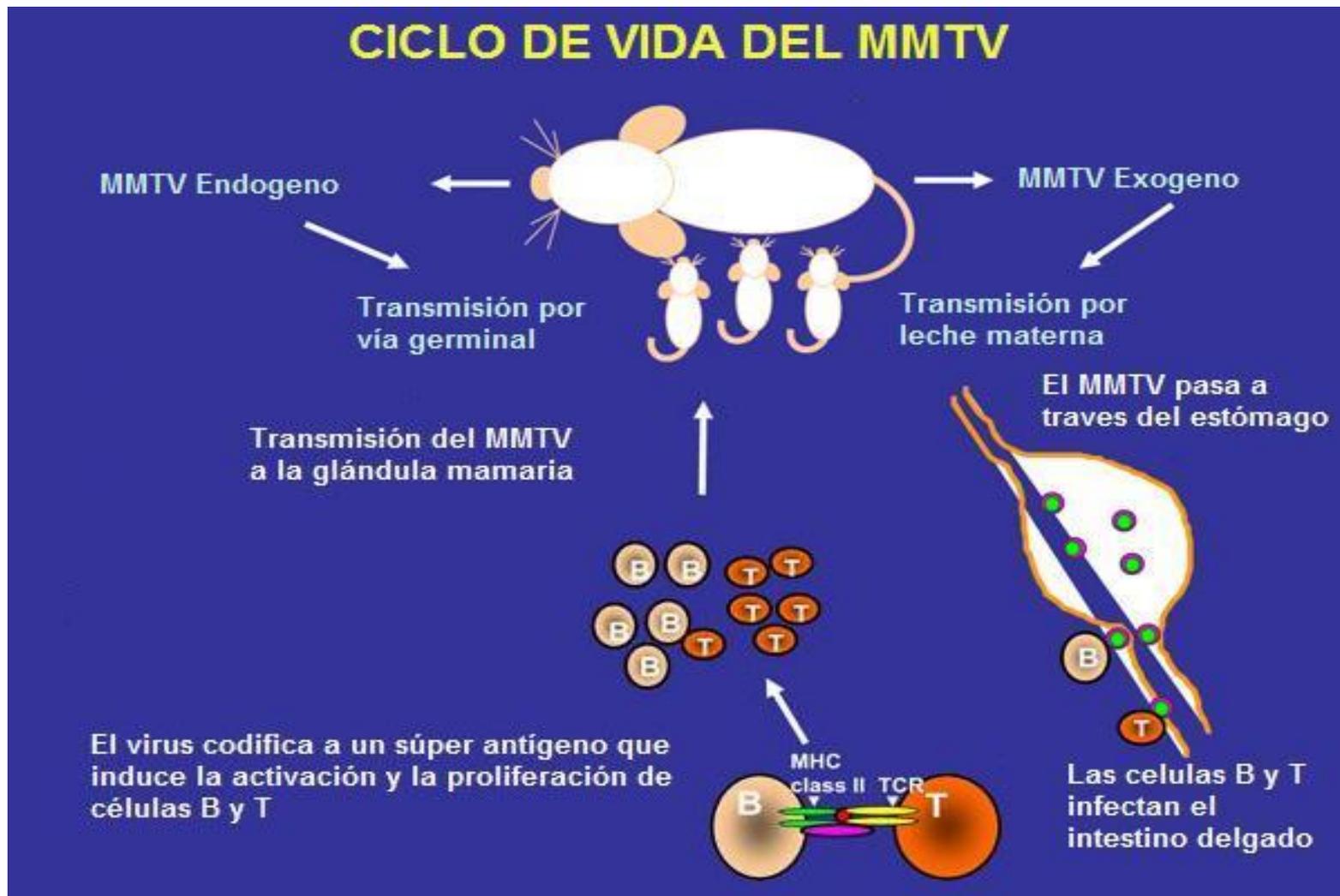


Figura 6.- Ciclo del virus de tumor mamario de ratón (Dudley, 2004)

En la Tabla 2 se muestra la localización de los lugares en donde se han realizado estudios de la relación de MMTV con el cáncer de mama en humanos y el porcentaje de aparición.

Tabla 2.- Porcentaje de aparición del MMTV en neoplasias mamarias en diferentes países

Estados Unidos	36%	Wang <i>et al</i> ; 1998
Argentina	31%	Melana <i>et al</i> ; 2002
Australia	42%	Ford <i>et al</i> ; 2003
Reino Unido	0 %	Mant, <i>et al</i> ; 2004
Italia	38%	Levine <i>et al</i> ; 2004
Túnez	74%	Levine <i>et al</i> ; 2004
Suecia	0%	Bindra <i>et al</i> ; 2007
Japón	0%	Fukuoka <i>et al</i> ; 2008

## 2 Antecedentes

A partir del trabajo publicado por Bittner (1936) en donde encontró que el virus de tumor mamario murino (MMTV) genera adenocarcinomas en el epitelio mamario de ratones, muchos estudios se han enfocado en la relación de este virus con el cáncer de mama en humanos; uno de los primeros trabajos realizados en humanos fue el trabajo de Yue Wang y colaboradores (1995), que encuentran la secuencia del gen *ENV* en un 30% de tejidos cancerosos y en sólo dos muestras de 107 de tejidos sanos, por lo que sugieren que estas secuencias tienen un origen exógeno.

Etkind y colaboradores (2000) analizaron un grupo de tumores mamaros y de tejido normal para detectar la presencia de secuencias de MMTV. Amplificaron dos secuencias una de 660pb y una mas de 250pb y detectaron estas secuencias en un 37% de los tumores de mama; estas secuencias presentaron un 99% de homología a las secuencias de cepas de MMTV extraídas de ratón, además de que no se detectaron éstas en tejido mamario normal; sin embargo sí se detectaron por medio de PCR en un paciente con linfoma de células T que también presentaba cáncer de mama. Con sus resultados apoyan la posibilidad de una etiología retroviral exógena para un determinado porcentaje de tumores de mama y también sugieren que un retrovirus similar puede existir para algunos linfomas de células T humanas (Etkind *et al*; 2000).

Lawson y colaboradores (2005) compararon muestras de cáncer de mama humanas en donde se ha detectado el gen *ENV* con muestras de cáncer de mama en ratón y demostraron que tienen características histológicas (morfología) similares. Ellos concluyen que estas observaciones demuestran que existe una relación, pero no son definitivas para asegurar una asociación ya que los autores especulan que la morfología heterogénea del cáncer de mama humano puede deberse a la influencia de diferentes virus oncogénicos como lo puede ser MMTV, Virus de Epstein-Barr y el VPH (Lawson *et al*; 2005).

En 2007, Theodorou y colaboradores identificaron 33 sitios de inserción para MMTV, de los cuales 17 genes no estaban asociados con cáncer mamario y 13 no habían sido relacionados con cáncer en general. Aunque los miembros de las familias *Wnt* y *FGF* fueron encontradas frecuentemente, validaron otros genes como *Rspo3* como un oncogén debido a la sobreexpresión que causó en *p53* en una mama con deficiencia de células epiteliales; también mostraron mediante análisis bioinformáticos una gran proporción de proteínas, dominios y vías de señalización asociadas principalmente con factores de crecimiento (Theodorou *et al*, 2007).

Zapata y colaboradores (2007) encontraron una frecuencia del 4.2% en muestras mamarias relacionadas con MMTV en mujeres mexicanas. Sometieron 119 muestras de cáncer a una PCR anidada de las cuales para el primer par de oligonucleótidos todas las muestras amplificaron un fragmento debido a que los oligonucleótidos flanqueaban una parte del cromosoma 3; sin embargo sólo cinco de esas muestras dieron positivo cuando se les realizó el segundo PCR, mostrando éstas, una homología del 98-99% a la secuencia del MMTV (Zapata *et al*, 2007).

### 3 Justificación

El cáncer es una de las enfermedades más complejas y difíciles de entender debido a todos los mecanismos que se ven involucrados. Varios investigadores han desarrollado métodos y formas diferentes de abordar esta enfermedad con la finalidad de explicar su origen y permitir la detección en fases tempranas de la enfermedad.

El cáncer de mama es considerado una de las enfermedades de mayor importancia en nuestro país ya que ocupa el primer lugar como causa de muerte en mujeres mayores de 35 años. El estudio de esta neoplasia se ha dificultado debido a la gran heterogeneidad presente. Aunque se conocen factores relacionados con el cáncer de mama existe la posibilidad de que tenga un origen viral teniendo como referencia que las infecciones virales contribuyen al 15-20% de todos los cánceres humanos como lo son el cáncer cervicouterino y hepatocarcinomas entre otros.

Además está reportado que el Virus de Tumor Mamario Murino (MMTV) causa adenocarcinomas en el epitelio mamario después de un periodo de latencia en ratones y éste se puede transmitir de forma exógena y endógena.

Con base a lo anterior consideramos que el estudio de estas secuencias en neoplasias mamarias es de suma importancia, ya que cualquier aportación que nos lleve a comprender esta enfermedad, nos podrá servir como un marcador temprano para el diagnóstico de cáncer de mama en humanos y su posterior tratamiento; por ello consideramos de suma importancia establecer una asociación entre MMTV y dicha neoplasia.

#### 4 Objetivos

##### Objetivo General:

- Detectar el gen *ENV* del MMTV en neoplasias mamarias de una muestra de mujeres mexicanas.

##### Objetivos Particulares:

- Determinar la presencia de secuencias virales en los diferentes estadios de tumorales.
- Amplificar el exón 28 del gen *von Willebrand* como control interno.
- Amplificar el gen *ENV* del MMTV en una muestra de ratón afectada.

## 5 Material y Métodos

### 5.1 Obtención de las muestras de adenocarcinomas

Las muestras de adenocarcinomas mamarios fueron obtenidas de mujeres atendidas en tres diferentes hospitales: Hospital Juárez, Hospital Troncoso y Hospital de Oncología del CMN S-XXI, bajo los siguientes criterios:

- Pacientes sin tratamiento previo.
- Con datos clínicos tales como: Nombre, edad, sexo, diagnóstico del tumor, fecha de obtención de las muestras, etc.

De acuerdo a lo establecido en el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación, este estudio se clasificó como una investigación de riesgo mínimo. Se utilizó la carta de consentimiento informado del proyecto titulado Estudio de mutagénesis insercional de los genes *env* y *gag* del retrovirus HMTV/MMTV en cáncer de mama de mujeres mexicanas (Anexo II).

Se obtuvieron 40 muestras, de las cuales se consiguieron tres parejas de tejido neoplásico con su tejido adyacente. Los tejidos fueron transportados al laboratorio en un contenedor de nitrógeno líquido. Las muestras se mantuvieron almacenadas a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

### 5.2 Extracción del ADN

Para la extracción del ADN se utilizó el método de extracción con fenol-cloroformo-isoamílico (Sambrook *et al*; 1989). Las muestras de aproximadamente 200 mg fueron cortadas en fragmentos y maceradas en un mortero con nitrógeno líquido, previamente enfriado y esterilizado.

A la muestra macerada se le agregó 1.2 ml del buffer de digestión que contenía:

Buffer de Digestión
100mM de NaCl
100mM de Tris –HCL, pH 8.0
25mM de EDTA
0.5% de SDS
0.1 mg de proteinasa K por cada 100 mg de tejido

Después las muestras se incubaron en tubos eppendorf de 1.5ml durante 18 h, a una temperatura de 50 ° C con agitación constante; se le adicionó la mezcla de fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1) volumen/volumen, se agitó y centrifugó 15min a 13 000 rpm (revoluciones por minuto), se recupero el sobrenadante y se adicionó otra vez el fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1) v/v centrifugándolo 15min a 13 000 rpm, posteriormente se recuperó el sobrenadante y se resuspendió en alcohol absoluto 2:1 y se centrifugó durante 3 minutos a 15,000 rpm, se descartó el sobrenadante y la pastilla se lavó 2 veces más con etanol al 70%; se centrifugó durante 3 minutos a 15,000 rpm, se descartó el etanol y se permitió la evaporación del etanol residual; la pastilla de ADN se resuspendió en 50 $\mu$ l de ddH<sub>2</sub>O y se almacenó a -30<sup>0</sup> C.

### 5.3 Cuantificación espectrofotométrica del ADN e integridad del ADN

La cuantificación del ADN fue realizada mediante espectrofotometría con la ayuda de un espectrofotómetro (NanoDrop Technologies, ND-1000).

En el espectrofotómetro se seleccionó la opción ácidos desoxirribonucleicos en el menú de inicio, se calibró el blanco con 1  $\mu$ L de agua destilada y se seleccionó el factor para ADN; se colocó 1  $\mu$ L de la muestra, se llenaron los campos de datos y se contabilizó el ADN; los datos obtenidos del NanoDrop son la cantidad de ADN en ng/ $\mu$ L y el cociente de 260/280 como parámetro de la pureza de la muestra.

La integridad del ADN se verificó mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio. El gel de agarosa se colocó en una cámara de

electroforesis y se sumergió en una solución amortiguadora con pH neutro (TBE 1X) a la que se aplicaron 90 volts durante 1 hora y el ADN (colocado en los pozos en el gel) comenzó a migrar en dirección al ánodo, debido a que posee una carga negativa facilitada por los grupos fosfatos de las cadenas. Posteriormente se obtuvo la imagen en un trasluminador de luz ultravioleta (Geldoc de BIORAD).

#### 5.4 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para el gen *ENV*

Los oligonucleótidos así como las condiciones de la reacción se tomaron de acuerdo a Yue Wang (1995).

Se buscaron las secuencias reportadas en el GenBank para el gen *ENV* con el número de acceso M15122, se utilizó el software Oligo 4.1 para el diseño de las secuencias; se calculó la  $T_m$  (*Melting temperature*) de cada par de oligonucleótidos.

Para la amplificación del control positivo del gen *ENV* se ocuparon los oligonucleótidos reportados por Wang (1995). Primero se ocuparon los iniciadores reportados como p1 y p4 esperando un fragmento de 686pb posteriormente se purificó el producto y se realizó una PCR con el segundo par de oligonucleótidos (p2 y p3) esperando un fragmento de 250pb.

La reacción de PCR se llevó a un volumen final de 25  $\mu$ L a cada tubo se le agregaron los siguientes reactivos:

REACTIVO	CONCENTRACIÓN FINAL	VOLUMEN
Buffer	1X	2.5 $\mu$ l
DNTPs	10 mM	1.5 $\mu$ l
Oligonucleotido 1	10 pmol	1 $\mu$ l
Oligonucleotido 2	10 pmol	1 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub>	1.5 mM	0.75 $\mu$ l
Taq polimerasa	1.5 u	0.3 $\mu$ l
DNA	100 ng	1 $\mu$ l
Agua		16.95 $\mu$ l

Posteriormente se colocaron en un termociclador Gene Amp® PCR System 9700 y se llevó a cabo la PCR bajo las siguientes condiciones:

<b>94°</b>	<b>5'</b>	<b>36 CICLOS</b>
<b>94°</b>	<b>30''</b>	
<b>60°</b>	<b>25''</b>	
<b>68°</b>	<b>45'</b>	
<b>72°</b>	<b>7'</b>	

Una vez terminada la reacción de PCR el producto se verificó en geles de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio incluyendo un marcador de peso molecular en escalera de 1 Kb; se realizó la separación a 90volts durante 45 minutos, y se tomaron fotografías en un trasluminador uv Geldoc de BIORAD utilizando el software Quantity One.

Para la segunda reacción se utilizó 1  $\mu\text{L}$  del producto de la primera reacción teniendo un volumen final de 25  $\mu\text{L}$  a cada tubo se le agregaron:

REACTIVOS	CONCENTRACIÓN FINAL	VOLUMEN
Buffer	1X	2.5 $\mu\text{l}$
DNTPs	10 mM	1.5 $\mu\text{l}$
Oligonucleotido 1	10 pmol	1 $\mu\text{l}$
Oligonucleotido 2	10 pmol	1 $\mu\text{l}$
MgCl <sub>2</sub>	1.5 mM	0.75 $\mu\text{l}$
Taq polimerasa	1.5 u	0.3 $\mu\text{l}$
DNA	100 ng	1 $\mu\text{l}$
Agua		16.95 $\mu\text{l}$

y se colocaron en un termociclador Gene Amp® PCR System 9700. En la segunda reacción las condiciones fueron las mismas.

Una vez terminada la reacción se verificó el producto en geles de agarosa al 2% para un volumen de 40ml, este se tiñó con bromuro de etidio, la solución se colocó

y se dejó polimerizar, se agregó TBE 1X (amortiguador), hasta cubrir el gel y posteriormente se cargaron 4 $\mu$ L de muestra mezclada con 1 $\mu$ L de azul de bromofenol junto con azul xileno, con un marcador de peso molecular de una Kb, un control positivo (muestra afectada de ratón) y un control negativo (sin molde) enseguida se separaron los ácidos nucleicos mediante 90 volts durante 1 hora y posteriormente se tomaron las respectivas fotografías a través de luz ultravioleta en un transluminador Geldoc de BIORAD utilizando el software Quantity One. Por último se verificó la presencia del amplificado del gen *ENV* del MMTV, por medio del porcentaje de aparición con respecto al total de tejidos.

## 6 Resultados

### 6.1. Obtención de muestras

Se obtuvieron 40 muestras tumorales mamarias de mujeres mexicanas sin tratamiento previo, atendidas en tres diferentes hospitales Hospital Juárez, Hospital Troncoso y Hospital de Oncología del CMN S-XXI. De los expedientes de cada paciente se obtuvieron sus datos clínicos tales como: edad, diagnóstico, clasificación del tumor; por razones éticas se omite el nombre del paciente (Tabla 3). A cada muestra se le asignó un número para clasificarlos:

Tabla 3.- Muestras obtenidas de tumores mamarios y de tejido adyacente. Se observa la edad del paciente y el diagnóstico. \*extensión del tumor (**T**), diseminación a los ganglios linfáticos (**N**) y metástasis (**M**)

	<b>Edad (años)</b>	<b>Datos relacionados con la muestra*</b>
1	38 AÑOS	T3 N1Mx
2	51 AÑOS	Adyacente
3	SIN DATOS	T2N1M0
4	49 AÑOS	T2N2Mx
5	42 AÑOS	T3N1M1
6	55 AÑOS	Ca de conductos canalicular infiltrante GH3 (MDerCM Vs. Phylloides)
7	55 AÑOS	Adyacente
8	63 AÑOS	T2N0M0
9	65 AÑOS	Ca Conductos infiltrantes SRB 4
10	41 años	Adyacente
11	41 AÑOS	Adyacente
12	40 AÑOS	Fibroadenoma mamario
13	31 AÑOS	T3N1Mx

14	17 AÑOS	Fibroadenoma mamario (CA Vs. Absceso)
15	41 años	carcinoma ductal infiltrante poco diferenciado grado 3, por confirmar
16	41 años	Adyacente
17	64 AÑOS	Adyacente
18	64 AÑOS	T2N0M0
19	SIN DATOS	T2N1M0
20	SIN DATOS	T2N1M0
21	51 AÑOS	T4b N2M0
22	41 AÑOS	Ca diferenciado(M lzq tumor no clasificable)
23	45 AÑOS	T4B N2 M1
24	52 AÑOS	Cancer de mama
25	62 AÑOS	Fibroadenoma mamario (MDer Fibroadenoma)
26	34 AÑOS	T3N1Mx
27	48 AÑOS	T3N0Mx
28	48 AÑOS	T3N0Mx
29	48 AÑOS	Adyacente
30	48 AÑOS	Adyacente
31	56 AÑOS	Adyacente
32	64 AÑOS	Adyacente
33	64 AÑOS	T3N1Mx
34	55 AÑOS	Ca ductal <i>in situ</i> SBR 7
35	17 AÑOS	Fibroadenoma mamario (CA Vs. Absceso)
36	42 AÑOS	T3N0Mx
37	26 AÑOS	T4B N2 Mx
38	37 AÑOS	Fibrosis quística
39	26 AÑOS	T2 N1 Mx
40	60 AÑOS	CM-Negativo Absceso

## 6.2. Extracción y cuantificación de ADN

La obtención del ADN se realizó de acuerdo al método de fenol:cloroformo:isoamílico, después se procedió a la cuantificación por espectrometría y los resultados se muestran en la Tabla 4:

Tabla 4.- Cuantificación de DNA. Concentraciones obtenidas en ng/ul y los cocientes de pureza 260/280.

<b>Clave</b>	<b>ng/ul</b>	<b>260/280</b>	<b>Clave</b>	<b>ng/ul</b>	<b>260/280</b>
1	554.64	1.81	21	5990.08	1.7
2	131	2.07	22	1016.3	1.84
3	1265.99	1.84	23	3197.39	1.81
4	1930.78	1.86	24	61.31	1.86
5	51.87	1.88	25	224.62	1.90
6	2065.15	1.84	26	762.46	1.75
7	530.19	1.85	27	2478.58	1.89
8	43.9	1.43	28	240.18	1.90
9	3361.99	1.41	29	5672.34	1.43
10	870.78	1.79	30	1023.15	1.82
11	1827.01	1.86	31	868.63	1.76
12	972.15	1.8	32	382.51	1.80
13	426.83	0.19	33	3674.73	1.82
14	2472.92	1.78	34	158.02	1.69
15	1954.21	1.76	35	1867.72	1.77
16	1786.47	1.66	36	204.16	1.87
17	3922.32	1.8	37	1785.39	1.56
18	1863.38	1.77	38	1982.71	1.77
19	885.26	1.84	39	4060.03	1.82
20	1286.35	1.84	40	1136.95	1.55

### 6.3. Localización de los oligonucleótidos para el gen *ENV* del MMTV

Con ayuda del software Oligo 4.1 se corroboró el diseño de los dos pares de oligonucleótidos reportados por Yue Wang (1995) de acuerdo a la secuencia reportada en el GenBank, número de acceso: M15122.

A continuación se presenta la secuencia codificante para el gen *ENV* y los sitios de unión para los dos pares de oligonucleótidos:

```
TTCCTTCTCCTTTTCTACCCACGGGCTGCTTCAAGTAGACAAGCAAGTATTTCTTTCT
GATACACCCACGGTGATAATAATAAACCTGGGGGAAAGGGTGATAAAAGGCGTATGTGGGA
ACTTTGGTTGACTACCTTGGGGAACCTCAGGGGATAAAAAAGAAGTTGCCCCCAAATATCC
TCACTGCCAGATCGCCTTTAAGAAGGACGCCTTCTGGGAGGGAGACGAGTCTGCTCCTCCA
CGGTGGTTGCCTTGCCTTCCCTGACCAGGGGGTGAGTTTTTCTCCAAAAGGGGCCCTTG
GGTTACTTTGGGATTTCTCCCTTCCCTCGCCTAGTGTAGATCAGTCAGATCAGATTAAG
CAAAAAGAATCTATTTGGAAATTATACTCCCCGTCAATAAAGAGGTTTCATCGATGGTAT
GAAGCAGGATGGGTAGAACCTACTTGGTTCTGGGAAAATTCTCCTAAGGATCCCAATGATA
GAGATTTCACTGCACTAGTCCCCATACAGAATTGTTTCGCTTAGTCGCAGCCTCAAGACA
TCTTATTCTCAAAGGCCAGGATTTCAAGAACATGAGATGATTCCACATCTGCCTGTGTT
ACTTACCCTTATGCCATATTATTAGGATTACCTCAGTTAATAGATATAGAGAAAAGAGGAT
CTACTTTTCATATTTCTGTTCTTCTTGTAGATTGACTAATTGTTTAGACTCTTCTGCCTA
CGACTATGCAGCGATCATAGTCAAGAGGCCGCATATGTGCTGCTACCTGTAGATATTGGT
GATGAACCATGGTTTGATGATTCTGCCATTCAAACCTTTAGGTATGCCACAGATTTAATTC
GAGCTAAGCGATTCGTCGCAGCCATTATCC
```

 Secuencia del primer par de oligonucleótidos

 Secuencia del segundo par de oligonucleótidos

Las secuencias de los oligonucleótidos fueron las siguientes:

<b>Secuencia</b>	<b>Rótulo</b>
CCTCACTGCCAGATC	P1
GAATCGCTTGGCTCG	P4
TACATCTGCCTGTGTTAC	P2
ATCTGTGGCATACT	P3

La Tm para los dos pares de oligonucleótidos fue de 50 °C como reporta Yue Wang (1995).

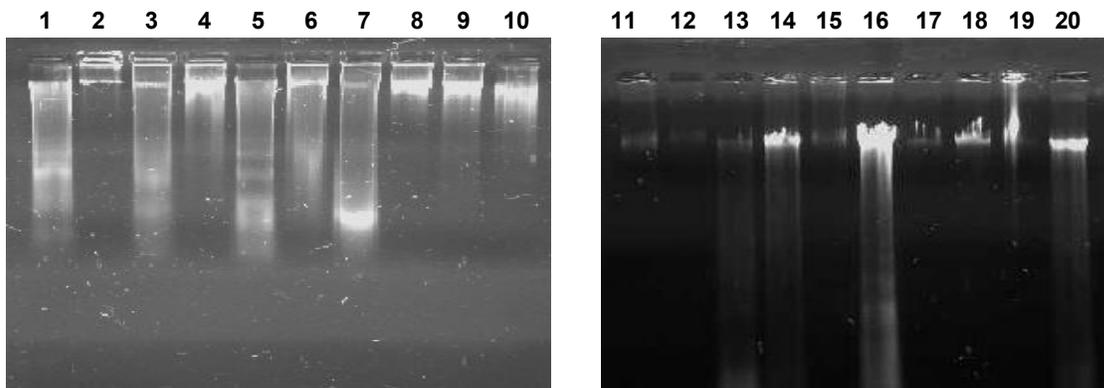
Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de la región C del exón 28 del gen *Von Willebrand*, que se ocuparon como control interno en la reacción, fueron proporcionados por la Dr. Rosenda Peñalosa del Centro Medico Nacional Siglo XXI y amplificaron un fragmento de 525pb a una Tm de 60 °C, cuyas secuencias son las siguientes:

- Sentido                      5' AGCCGACTTCAACAGGAGCA 3'
- Antisentido                5' CCAGGTGCAGGGGAGAGG 3'

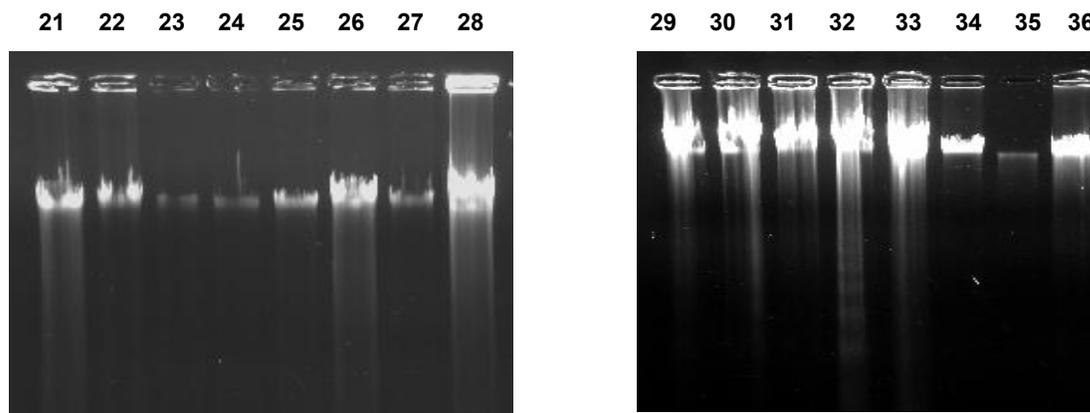
#### 6.4. Integridad del ADN

La integridad del ADN se determinó por electroforesis en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. Las figuras 7, 8, 9, 10 y 11 muestran las 40 extracciones de ADN; se puede observar que la mayoría de las muestras están un poco degradadas.

Se obtuvo las siguientes imágenes con ayuda del transluminador Geldoc de BIORAD y el software Quatity One.



Figuras 7 y 8.- **Integridad del ADN extraído.** Extracción de ADN por el método de fenol:cloroformo:isoamílico; colocado en geles de agarosa al 2 % teñido con BrEt. Carriles 1-20 muestras de tejido mamario.



Figuras 9 y 10.- **Integridad del ADN extraído.** Extracción de ADN por el método de fenol:cloroformo:isoamílico; colocado en geles de agarosa al 2 % teñido con BrEt. Carriles 21-36 muestras de tejido mamario.

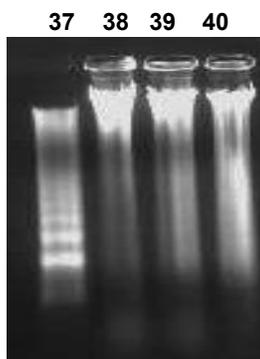


Figura 11.- **Integridad del ADN extraído.** Extracción de ADN por el método de fenol:cloroformo:isoamílico; colocado en geles de agarosa al 2 % teñido con BrEt. Carriles 21-36 muestras de tejido mamario.

### 6.5. Control Interno

Una vez extraído el ADN fue necesario amplificar el control interno para verificar la presencia de inhibidores o ausencia de ADN proveniente de los extractos celulares. El control tiene un tamaño de 525 pb. y contiene el exón 28 del gen *Von Wildebrand*, como se puede observar en las figuras 12, 13 y 14.

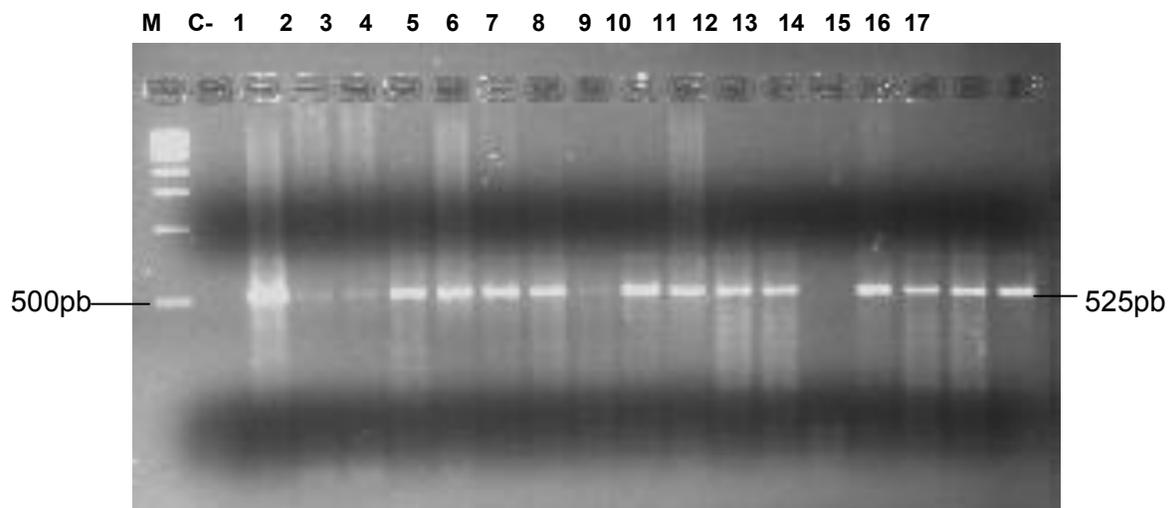


Figura 12.- **Amplificación del exón 28 del gen *Von Wildebrand* como control interno.** Gel de agarosa al 2 % teñido con BrEt, M: marcador de peso molecular 1Kb, C-: control negativo, carril 1-17 muestras de pacientes.

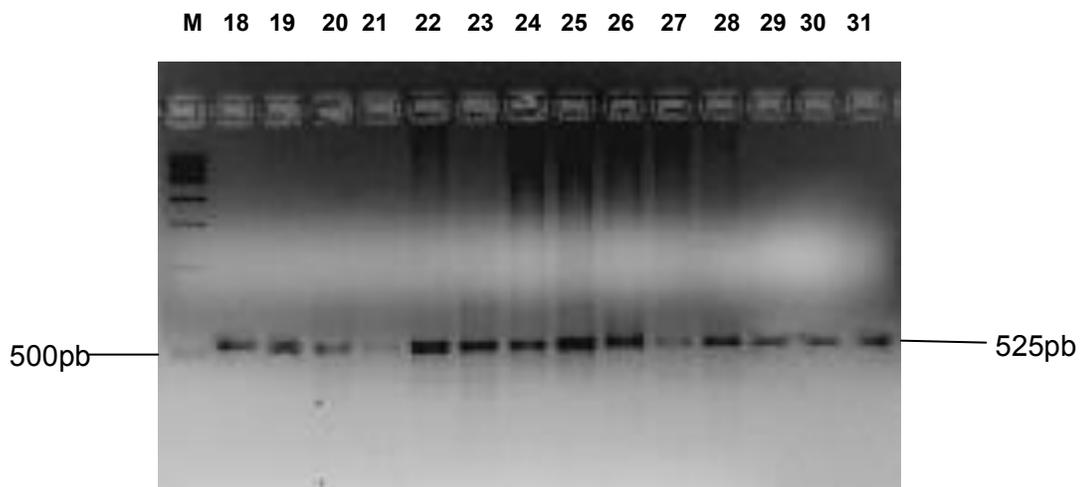


Figura 13.- **Amplificación del exón 28 del gen *Von Wildebrand* como control interno.** Gel de agarosa al 2 % teñido con BrEt, M: marcador de peso molecular 1Kb, carril 18-31 muestras de pacientes.

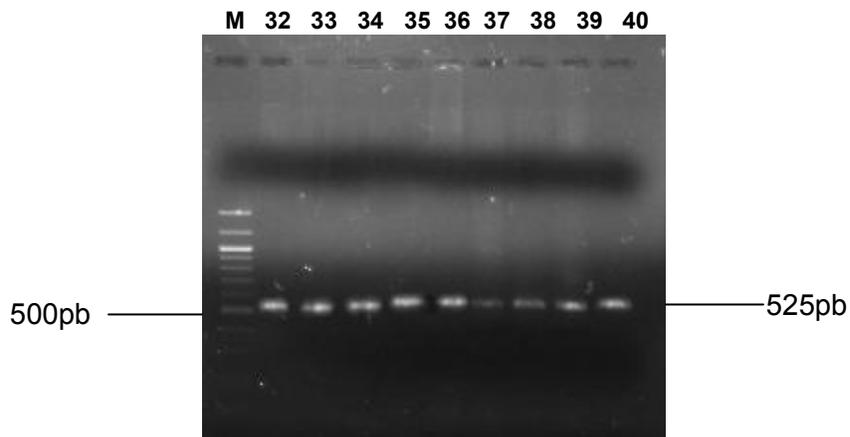
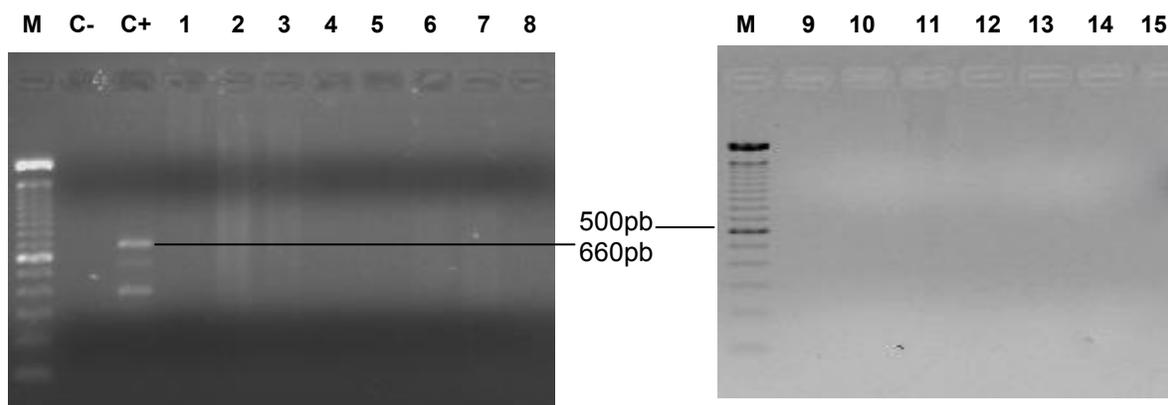


Figura 14.- **Amplificación del exón 28 del gen *Von Wildebrand* como control interno.** Gel de agarosa al 2 % teñido con BrEt, M: marcador de peso molecular 1Kb, carril 32-40 muestras de pacientes.

#### 6.6. Identificación del gen *ENV*

Una vez realizada la PCR del primer par de cebadores el producto se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio, para la identificación del fragmento del gen *ENV* de 660pb en las 40 muestras, utilizando un marcador de peso de 1Kb y un control positivo. Se utilizaron 4  $\mu$ L del volumen total de la reacción y un colorante de corrida a una concentración final de 1x.

Como se puede observar en las figuras 15, 16, 17 y 18 no hubo fragmentos como producto de la PCR en ninguna de las 40 muestras.



Figuras 15 y 16.- **Amplificación del fragmento de 660pb del gen *ENV* del MMTV.** Geles de agarosa al 2 % teñido con BrEt, M: marcador de peso molecular 1Kb, C-: control negativo, C+: control positivo (muestra afectada de ratón), carril 1-15 muestras de pacientes.

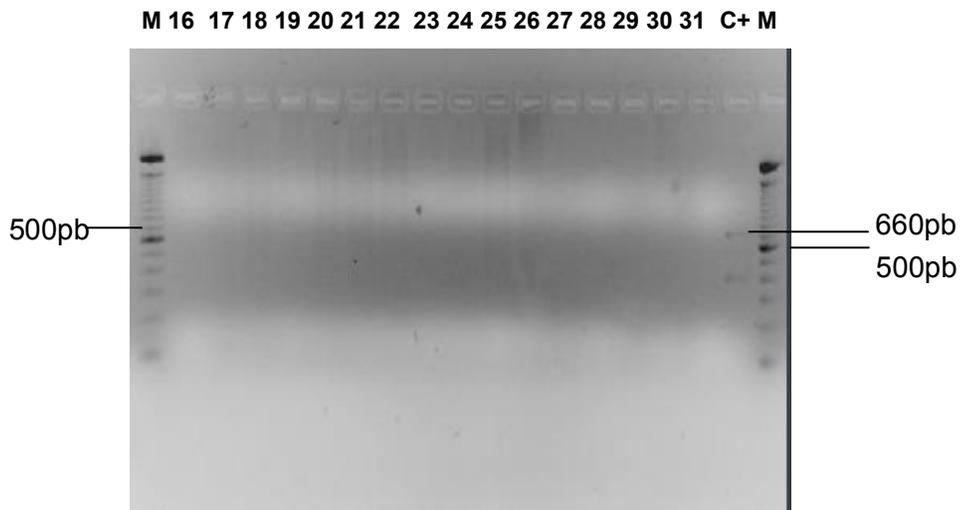


Figura 17.- **Amplificación del fragmento de 660pb del gen *ENV* del MMTV.** Gel de agarosa al 2 % teñido con BrEt, M: marcador de peso molecular 1Kb, C+: control positivo (muestra afectada de ratón), carril 16-31 muestras de pacientes.

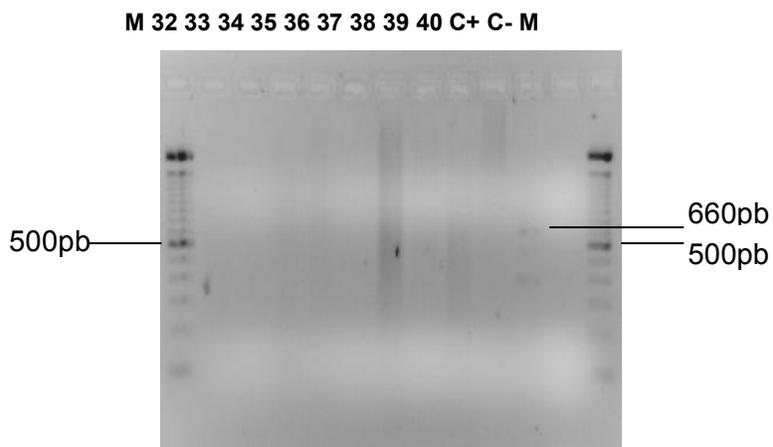


Figura 18.- **Amplificación del fragmento de 660pb del gen *ENV* del MMTV.** Gel de agarosa al 2 % teñido con BrEt, M: marcador de peso molecular 1Kb, C-: control negativo, C+: control positivo (muestra afectada de ratón), carril 32-40 muestras de pacientes.

Finalmente se realizó una PCR anidada con la finalidad de corroborar la presencia o ausencia de las secuencias del gen *ENV* en las 40 muestras; se tomó 1µl del producto final de la primera PCR y se reamplificó ahora esperando un fragmento de 250pb. Para observar los fragmentos, se realizó un gel de agarosa al 2% teñido

con bromuro de etidio, posteriormente se utilizaron 4  $\mu$ l del volumen de reacción de la PCR y colorante de corrida a una concentración final de 1X.

Como se puede observar en las figuras 19, 20, 21, 22 y 23, de las 40 muestras mamarias sometidas a PCR 21 dieron positivas al fragmento de 250pb.

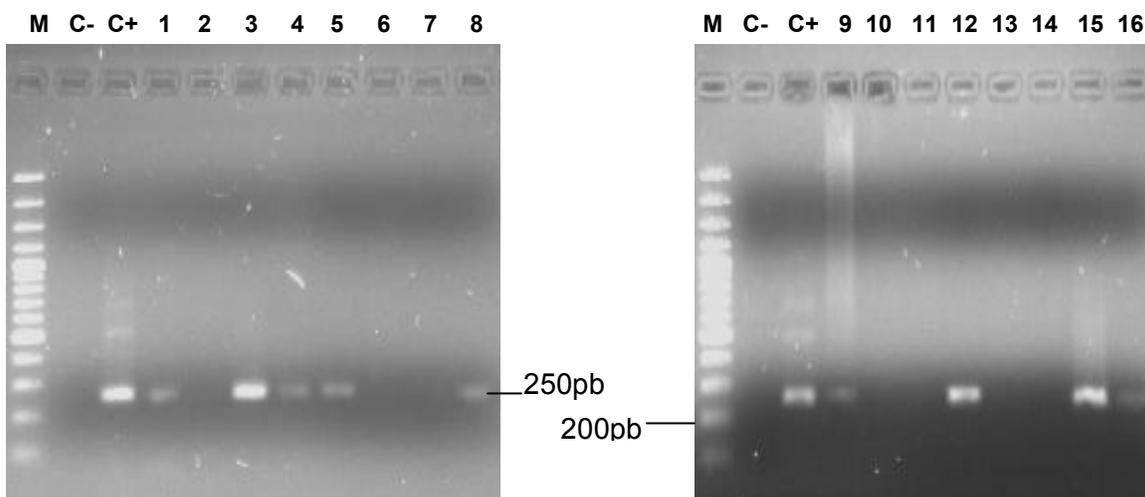


Figura 19 y 20.- **Amplificación del fragmento de 250pb del gen *ENV* del MMTV.** Geles de agarosa al 2 % teñido con BrEt, M: marcador de peso molecular 1Kb, C-: control negativo, C+: control positivo (muestra afectada de ratón), carril 1-16 muestras de pacientes.

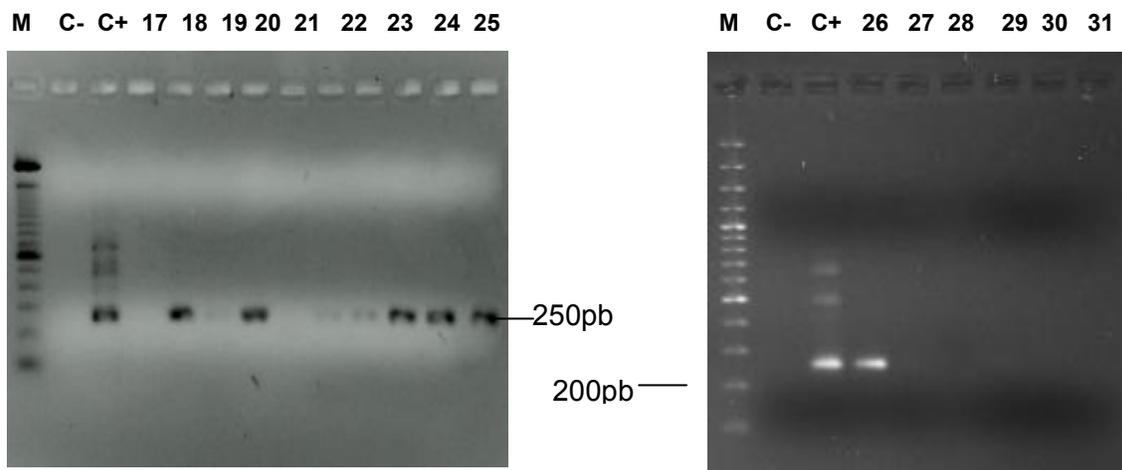


Figura 21 y 22.- **Amplificación del fragmento de 250pb del gen *ENV* del MMTV.** Geles de agarosa al 2 % teñido con BrEt, M: marcador de peso molecular 1Kb, C-: control negativo, C+: control positivo (muestra afectada de ratón), carril 17-31 muestras de pacientes.

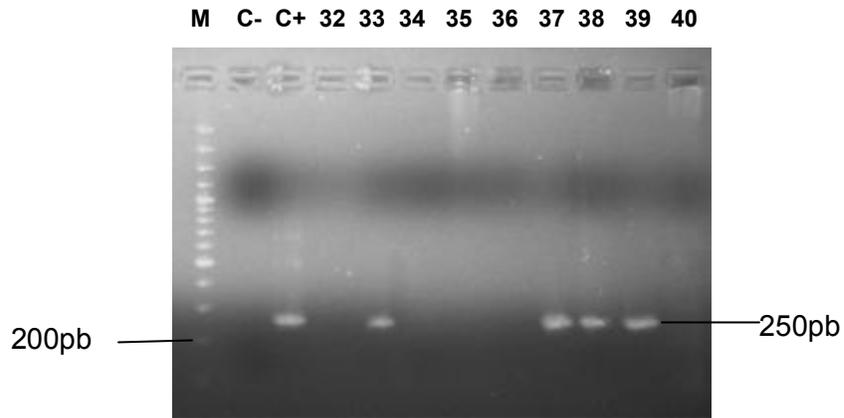


Figura 23.- **Amplificación del fragmento de 250pb del gen *ENV* del MMTV.** Gel de agarosa al 2 % teñido con BrEt, M: marcador de peso molecular 1Kb, C-: control negativo, C+: control positivo (muestra afectada de ratón), carril 32-40 muestras de pacientes.

En la Tabla 5 se presentan las 40 muestras de tejido mamario, como se aprecia 21 dieron positivo para la amplificación del gen *ENV*, de los cuales sólo en cinco se obtuvo tejido adyacente (muestras señaladas con rojo), de los cuales tres dieron positivos al virus y en uno de los casos tanto en tejido adyacente como en la muestra de tumor se amplificó la secuencia del virus.

Tabla 5.- Relación de las muestras obtenidas. Se observa que 21 de las muestras son positivas.

	Edad (años)	Clasificación TNM	
1	38 AÑOS	T3 N1Mx	POSITIVO
2	51 AÑOS	Adyacente	NEGATIVO
3	SIN DATOS	T2N1M0	POSITIVO
4	49 AÑOS	T2N2Mx	POSITIVO
5	42 AÑOS	T3N1M1	POSITIVO
6	55 AÑOS	Ca de conductos canalicular infiltrante GH3 (MDeCM Vs. Phylloides)	NEGATIVO
7	55 AÑOS	Adyacente	NEGATIVO
8	63 AÑOS	T2N0M0	POSITIVO
9	65 AÑOS	Ca Conductos infiltrantes SRB 4	POSITIVO
10	41 años	Adyacente	NEGATIVO
11	41 AÑOS	Adyacente	NEGATIVO
12	40 AÑOS	Fibroadenoma mamario	POSITIVO
13	31 AÑOS	T3N1Mx	NEGATIVO
14	17 AÑOS	Fibroadenoma mamario (CA Vs. Absceso)	NEGATIVO
15	41 años	carcinoma ductal infiltrante poco diferenciado grado 3, por confirmar	POSITIVO
16	41 años	Adyacente	POSITIVO
17	64 AÑOS	Adyacente	NEGATIVO
18	64 AÑOS	T2N0M0	POSITIVO
19	SIN DATOS	T2N1M0	POSITIVO
20	SIN DATOS	T2N1M0	POSITIVO
21	51 AÑOS	T4b N2M0	NEGATIVO
22	41 AÑOS	Ca diferenciado(M lqz tumor no clasificable)	POSITIVO
23	45 AÑOS	T4B N2 M1	POSITIVO
24	52 AÑOS	Cancer de mama	POSITIVO
25	62 AÑOS	Fibroadenoma mamario (MDe Fibroadenoma)	POSITIVO
26	34 AÑOS	T3N1Mx	POSITIVO
27	48 AÑOS	T3N0Mx	NEGATIVO
28	48 AÑOS	T3N0Mx	NEGATIVO
29	48 AÑOS	Adyacente	NEGATIVO
30	48 AÑOS	Adyacente	NEGATIVO
31	56 AÑOS	Adyacente	NEGATIVO
32	64 AÑOS	Adyacente	NEGATIVO
33	64 AÑOS	T3N1Mx	POSITIVO
34	55 AÑOS	Ca ductal in situ SBR 7,	NEGATIVO
35	17 AÑOS	Fibroadenoma mamario (CA Vs. Absceso)	NEGATIVO
36	42 AÑOS	T3N0Mx	NEGATIVO
37	26 AÑOS	T4B N2 Mx	POSITIVO
38	37 AÑOS	Fibrosis quística	POSITIVO
39	26 AÑOS	T2 N1 Mx	POSITIVO
40	60 AÑOS	CM-Negativo Absceso	NEGATIVO

## 7 Discusión

El cáncer se considera una entidad heterogénea tanto clínica como histológicamente, dificultándose con ello la predicción certera de los factores pronósticos y por tanto de su tratamiento. Nuevos fármacos y estrategias terapéuticas podrían ser mas exitosos si se entiende la heterogeneidad del cáncer de mama, para lo cual se han realizado avances en los métodos moleculares para comprender mejor los mecanismos implicados en esta enfermedad (Bertucci y Birnbaum, 2008); una de estas técnicas es la reacción de cadena de la polimerasa (PCR) que ha contribuido a poder amplificar secuencias virales en los tumores.

Se ha reportado que el cáncer de mama es la neoplasia maligna mas frecuente en las mujeres y en los últimos años se ha buscado una posible asociación a secuencias retrovirales. Este trabajo es uno de los primeros realizados en México en donde se buscan secuencias retrovirales en tumores mamarios de mujeres mexicanas, siendo importante la búsqueda intencionada de los retrovirus como un posible factor de riesgo, además de que estas secuencias ya se han encontrado en diferentes poblaciones del mundo [Mant, 2004].

De las muestras analizadas en el presente estudio, todas fueron verificadas por el Departamento de Patología del CMNSXXI y de ahí fueron recopilados sus datos, se ocuparon 40 muestras de diferentes pacientes sin tratamiento al momento de la toma de la muestra, esto para evitar que proporcionaran falsos negativos.

En lo que se refiere a la extracción del ADN, los valores obtenidos en 22 de las 40 muestras en la medición espectrofotométrica del cociente 260/280 (parámetro relativo de pureza en ácidos nucleicos) están dentro del rango 1.8 hasta 2.0, lo que está de acuerdo con los parámetros reportados en el manual de laboratorio de "Molecular Cloning" de J. Sambrook, esto nos indica que hay poca o nula contaminación por la presencia de otras moléculas orgánicas; sin embargo 17 de

las muestras estuvieron por debajo del rango de 1.8, estos valores menores indican contaminación con proteínas y sólo una por arriba del 2.0, teniendo una probable contaminación con fenol.

La validación de las extracciones de DNA se realizaron mediante la amplificación de un gen control (gen *Von Willebrand*) que fue detectado en las 40 muestras, además de un control negativo (sin DNA), este gen sirve como control interno de la reacción de amplificación, ya que nos permite verificar la presencia de inhibidores o ausencia de DNA proveniente de extractos celulares (Aguayo *et al*; 2002). A pesar de los valores anteriores de pureza, esta validación nos permitió afirmar que el método utilizado para la extracción del ADN fue adecuado y correctamente realizado.

Una vez obtenido el control interno que nos indicó que nuestras muestras podían ser amplificadas, se evaluó mediante una PCR anidada la presencia del gen *ENV* del MMTV. Cabe mencionar que en las muestras analizadas con el primer par de cebadores, no se encontró ningún amplificado, sólo en el control positivo que es de una cepa infectada de ratón, esto ocurrió ya que las condiciones reportadas para la primera PCR han sido alteradas y permitió que se produjeran falsos resultados en la primera amplificación (Zapata *et al*; 2007; Mant, 2004); también estos resultados pudieran mostrar la falta de secuencias virales o a la poca cantidad de ellas en los tejidos.

Aun cuando en la primera PCR no encontramos la presencia de ningún amplificado, esto no afectó a la realización de la segunda PCR y a la identificación de los amplificados de interés. En las figuras 19, 20, 21, 22 y 23 se observan las 40 muestras analizadas, 21 de ellas presentaron las bandas esperadas con un peso molecular de 250pb y de éstas, solo dos dieron positivo tanto para tejido neoplásico como para su tejido adyacente, lo cual nos sugiere que las secuencias retrovirales semejantes al MMTV están presentes en un porcentaje bajo en el genoma humano sano. Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que la

frecuencia de aparición de secuencias retrovirales homólogas al gen *ENV* del MMTV en pacientes mexicanas alcanzan un 52%, estos datos obtenidos son comparables con los cifras que reportan diversos países, como en Australia que se encontró una incidencia del 42% (Ford *et al*; 2003); también se ha reportado la aparición de estas secuencias en EE.UU. con un 38% (Wang *et al*; 1995) y en Argentina con el 31.8% (Melena *et al*; 2002). Estos resultados presentan un alto porcentaje si se compara con el estudio realizado en Vietnam donde se reporta que sólo el 1% de las neoplasias mamarias han demostrado ser positivas por medio de PCR a este virus (Mant *et al*, 2004). Por el contrario, una ausencia de MMTV ha sido reportado en 17 carcinomas ductales (Zangen *et al*; 2002) y en 50 tejidos mamarios en pacientes austríacos con cáncer (Witt *et al*; 2003); entre otros. En México se ha encontrado un porcentaje del 4.2% para el noreste de la población mestiza (78,5% españoles, 21,5% mexicanos nativos) (Cerdeña *et al*; 1991; Zapata *et al*; 2007). La fuente y el modo de transmisión del MMTV no ha sido identificado, pero muchas hipótesis sugieren que es un retrovirus exógeno transmitido del ratón a los humanos; una razón que sustenta esta hipótesis son las diferencias en el porcentaje de detección de secuencias homólogas del gen *ENV* del MMTV, las cuales puede ser relacionados a la distribución geográfica de las diferentes especies de ratones, ya que se reporta la presencia del MMTV exógeno en el género de ratón *Mus domesticus* mejor conocido como ratón común, el cual tiene una amplia distribución (Europa Occidental, América, Australia y Nueva Zelanda), ellos observan que la incidencia del cáncer de mama es más alta en áreas donde el ratón tiene una mayor presencia (Stewart *et al*; 2000), además de que se han utilizando líneas celulares humanas para comprobar que el MMTV tiene la capacidad de infectarlas (Indik *et al*; 2005), aunque esto no demuestra contundentemente que exista una correlación positiva entre la existencia del MMTV y la generación de la enfermedad.

Para los tejidos de mama no neoplásicos en los que se detectaron las secuencias retrovirales, éstas podrían representar un factor de riesgo para el desarrollo de la neoplasia; ya que algunos estudios han hecho un seguimiento a estos pacientes y

se ha encontrado que desarrollaron tumores mamarios posteriores a la extracción del tejido (Ford *et al*; 2003).

Esto refuerza aun más las implicaciones de este tipo de trabajos, ya que se han acumulado importantes pruebas que indican las posibilidades de que este retrovirus (MMTV) o uno de sus homólogos (HMTV) desempeñen un papel importante en la manifestación del cáncer de mama en humanos. Actualmente se han encontrado 33 sitios comunes de inserción, 17 de estos genes no se les tenía un conocimiento a su asociación con el cáncer mamario y 13 genes con el cáncer en general. Estas investigaciones sobre el MMTV muestran a nuevos genes candidatos en el cáncer de mama en humanos (Theodorou *et al*; 2007).

## 8 Conclusiones

Se observó la presencia del exón 28 del gen *Von Willebrand* en las muestras analizadas

El amplificado de 250pb del gen *ENV* se encontró presente en el 52% de las neoplasias mamarias, estos resultados indican que las secuencias del MMTV se encuentran en la población mexicana analizada.

Los resultados obtenidos muestran que los amplificadores del gen *ENV* se encuentran en baja proporción en el tejido adyacente sano.

No se pudo encontrar una relación entre las secuencias virales y el estadio del cáncer ya que las secuencias aparecieron en todos los estadios.

Se recomienda hacer un estudio posterior analizando mas muestras tumorales y de tejido adyacente, ya que de acuerdo con los resultados de este trabajo es probable que el virus tenga algún papel en el desarrollo de la neoplasia.

9 Anexo I



INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL  
DIRECCIÓN DE PRESTACIONES MÉDICAS  
UNIDAD DE EDUCACIÓN, INVESTIGACIÓN Y POLÍTICAS DE SALUD  
COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN EN SALUD  
"2008, Año de la Educación Física y el Deporte"

**COMISIÓN NACIONAL DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA**

Ref. 09-B5-61-2800/200800 1898

Noviembre 10, 2008

**DOCTOR NORMAND GARCÍA HERNÁNDEZ**

Unidad de Investigación Médica en Genética Humana  
UMAE Hospital de Pediatría  
Centro Médico Nacional Siglo XXI  
México, D. F.

Informo a usted que el protocolo titulado: "**Estudio de mutagénesis insercional del retrovirus MMTV/HMTV y el efecto de los genes env y gag en cáncer de mama de mujeres mexicanas**", fue sometido a la consideración de esta Comisión Nacional de Investigación Científica.

Los procedimientos propuestos en el protocolo cumplen con los requerimientos de las normas éticas vigentes y la carta de consentimiento informado es suficientemente explícita, por lo cual tengo el agrado de hacerle saber que con base en las opiniones de los vocales de esta Comisión, se ha emitido dictamen de **AUTORIZADO**, con número de registro: **2008-785-067**.

Atentamente

**DOCTOR CÉSAR A. CRUZ SANTIAGO**

Presidente  
Comisión Nacional de Investigación Científica

Con copia:

- Dr. Hermilo de la Cruz Yáñez, Director de la UMAE Hospital de Pediatría, C.M.N. Siglo XXI.
- Dra. Carolina Sepúlveda Vildosola, Encargada de la Dirección de Educación e Investigación en Salud, UMAE Pediatría, C.M.N. Siglo XXI.

JOT/leh  
2008-2008-108

**IMSS**

SEGURIDAD Y SOLIDARIDAD SOCIAL

4° piso Bloque "B" de la Unidad de Congresos Av. Cuauhtémoc 330 Col. Doctores México 06720

10 Anexo II



INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA EL PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN:

**“Estudio de mutagénesis insercional de los genes *env* y *gag* del retrovirus HMTV/MMTV en cáncer de mama de mujeres mexicanas”**

**1. Información sobre el estudio.**

Se me ha invitado a participar en un estudio de investigación, éste involucra a personas afectadas con Cáncer de mama en diferentes etapas de su enfermedad. Actualmente se ha propuesto que algunos tipos de virus pueden infectar células mamarias humanas y participar en el desarrollo de tumores, por lo que en este estudio pretendemos analizar células de sangre periférica; y una muestra de tejido mamario tumoral y de tejido no afectado obtenidas durante la cirugía que me efectuarán como parte de mi tratamiento.

Por este conducto se solicita mi consentimiento para realizar la identificación y determinación del número de copias de dos genes del retrovirus HMTV/MMTV, y ubicar las secuencias LTRs del retrovirus, así como para crear un banco de tejidos, en el que se almacenarán hasta por 5 años para efectuar estudios genéticos o genómicos más profundos posteriores relacionados al protocolo.

**2. Procedimiento.**

Se tomarán 6 mL de sangre periférica antes del procedimiento quirúrgico. Y se tomará un fragmento de tejido neoplásico y no afectado del tejido resultante de la resección quirúrgica realizada; siempre y cuando cumplan con las características necesarias para participar en el estudio.

**a. Riesgos:**

Son exclusivos de la punción venosa y se refiere a la necesidad de punción en más de una ocasión en casos excepcionales. También puede desarrollarse hematoma, mismo que se resuelve espontáneamente. En cuanto a la muestra será tomada posteriormente de la pieza resultante a la resección quirúrgica, no tiene mayor implicación de riesgo que la informada por su médico oncólogo respecto a su tratamiento.

**b. Beneficios.**

Aunque directamente los resultados de este estudio no benefician mi diagnóstico y tratamiento, podrán aportar información útil a futuro para mejorar el entendimiento de esta enfermedad.

**3. Confidencialidad.**

La información que se obtenga de este estudio, incluyendo registros clínicos y/o de hospital será tratada como privilegiada y confidencial y no será divulgada o revelada a ninguna persona sin mi consentimiento por escrito.

**IMSS**

SEGURIDAD Y SOLIDARIDAD SOCIAL



**INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL**

---

**4. Participación / suspensión.**

Mi participación en este estudio es voluntaria. Estoy en libertad de decidir no participar en el mismo al no autorizar el análisis molecular de la muestra de tejido tumoral obtenido en la biopsia. El rehusarme a participar en este proyecto de investigación no afectará mi atención médica.

**5. Contacto Comité de ética**

En caso de requerir más información o duda respecto a su participación y derechos, se puede contactar al Comité de ética del IMSS al teléfono 56276900 extensión 21216 o al correo electrónico [conise@cis.gob.mx](mailto:conise@cis.gob.mx).

**6. Consentimiento.**

El Dr. Normand García Hernández, investigador responsable del proyecto y el Dr. Diego Julio Arenas Aranda, investigador responsable del proyecto, los cuales reconocen el compromiso que implica solicitar y aplicar la carta de consentimiento informado, se han encargado de explicarme los pormenores del mismo. He tenido la oportunidad de hacer preguntas. Si tengo alguna duda deberé comunicarme con ellos al teléfono 56 27 69 41 o acudir personalmente a la Unidad de Investigación Médica en Genética Humana en el Hospital de Pediatría del CMN SXXI del IMSS.

Al firmar este documento, yo accedo voluntariamente a participar en este estudio.

Lugar: \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_

Nombre del paciente: \_\_\_\_\_

Firma del paciente: \_\_\_\_\_

Nombre del testigo: \_\_\_\_\_

Firma del testigo: \_\_\_\_\_

Nombre del testigo: \_\_\_\_\_

Firma del testigo: \_\_\_\_\_

Laboratorio de Genética Molecular, Unidad de Investigación Médica en Genética Humana, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, Av. Cuauhtémoc 330, Col. Doctores, 06725 México, D.F., México. Phone: (+52) (55) 5627-6941; Fax: (+52) (55) 5588-5174; E-mail: [arenasdi@servidor.unam.mx](mailto:arenasdi@servidor.unam.mx), [arenasdi@gmail.com](mailto:arenasdi@gmail.com)

## 11 Bibliografía

1. Aceves E. Boletín trimestral del Johnson & Johnson Medical México, 2003;3:7
2. Aguayo F., Meneses M., Corvalán A., Muñoz M., Koriyama C, Eizuru Y., Akiba S., Identificación de Virus Papiloma Humano 16 (*vph-16*) en carcinoma queratinizante de pulmón. Rev. chil. enferm. respir. 2002, vol. 18, no. 2, pp. 83-89. ISSN 0717-7348.
3. Arraztoa E. Juan. La mama diagnostico y tratamiento. Segunda edición. Editorial Mediterráneo. Santiago de Chile. 2004. 744pp.
4. Avilés Vázquez Sócrates. Expresión del receptor del factor de crecimiento fibroblástico-1 en tumores mamarios de mujeres mexicanas. Tesis de Maestría en ciencias Biológicas. Posgrado en Ciencias Biológicas. UNAM. México. 2010. 76pp.
5. Bangham C. HTLV-I infections. J Clin Pathol 2000;53:581-6.
6. Barbulescu M, Turner G, Seaman MI, Deinard A. Many human endogenous retrovirus K (HERV-K) proviruses are unique to humans. Curr Biol 1999;9:861-8.
7. Bertucci F, Birnbaum D: Reasons for breast cancer heterogeneity. J Biol 2008, 7:6
8. Bindra A, Muradrasoli S, Kisekka R, Nordgren H, Wärnberg F, Blomberg J. Search for DNA of exogenous mouse mammary tumor virus-related virus in human breast cancer samples. J Gen Virol. 2007:1806-9
9. Boeke J, Stoye J. Retrotransposons, endogenous retroviruses and the evolution of retroelements. JM Coffin, DC Hughes, HE Varmus, editors. Retroviruses. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997;pp:343-436.
10. Bonnet M, Guinebretiere J, Kremmer E, Grunewald V. Detection of Epstein-Barr virus in invasive breast cancer. J Natl Cancer Inst 1999;91:1376-81.

11. Brandt C, Butel J, Wheeler D. Phylogenetic and structural analysis of MMTV LTR orf sequences of exogenous and endogenous origins. *Virology* 1993;193:171-85.
12. Choi Y, Kappler J, Marrack P. A superantigen encoded in the open reading frame of the 3' long terminal repeat of mouse mammary tumor virus. *Nature* 1991;350:203-7.
13. Cerda R, Kshatriya G, Barton S, Leal C, Garza R, Schull W, Chakraborty R. Genetic structure of the populations migrating from San Luis Potosi and Zacatecas to Nuevo León in Mexico. *Hum Biol* 1991; 63: 309.
14. Cobo Martínez Fernando. Enfermedades infecciosas virales. Editorial Formación Alcalá. 2003. 456pp.
15. Cortinas C. Cáncer: Herencia y ambiente. 3ª edición. Editorial la ciencia para todos. 2003. Páginas 17 – 90.
16. Damin A, Karam R, Zettler C, Caleffi M, Alexandre C.. Evidence for an association of human papillomavirus and breast carcinomas. *Breast Cancer Res Treat* 2004;84(2):131-7.
17. De Villiers E, Sandstrom R, Zur-Hausen H, Buck C. Presence of papillomavirus sequences in condylomatous lesions of the mamillae and in invasive carcinoma of the breast. *Breast Cancer Res*. 2005. Volumen 7:1-11.
18. Dudley P. <http://www.biosci.utexas.edu/mgm/faculty/profiles/dudley.htm>
19. Dupont W, Page D. Risk factors of breast cancer in women with proliferative breast disease. *N Engl J Med* 1985;312:146-51.
20. Etkind P, Du J, Khan A, Pillitteri J, Wiernik P. Mouse mammary tumor virus like ENV gene sequences in human breast tumors and in a lymphoma of breast cancer patient. *Clin Cancer Res*. 2000;6:1273-1278.
21. Ford C, Tran D, Deng Y, Ta T. Mouse mammary tumor virus-like gene sequences in breast tumors of Australian and Vietnamese women. *Clin Cancer Res*. 2003. Volumen 9. Páginas 1118-1120.

22. Fukuoka H, Moriuchi M, Yano H, Nagayasu T, Moriuchi H. No Association of Mouse Mammary Tumor Virus-Related Retrovirus With Japanese Cases of Breast Cancer. *Journal of Medical Virology*. 2008. 80:1447–1451
23. Herrera P, Vásquez P, Ramírez C, Muñetón P. Papel del gen TP53 en la oncogénesis, *Salud UIS* 2004; 36: 88-99.
24. <http://www.ibt.unam.mx/sintesis/cuantificacion.html#intro>
25. Indik S, Gunzburg W, Salmons B, Rouault F. Mouse Mammary Tumor Virus Infects Human Cells. *Cancer Res* 2005; 65: (15).
26. Iscovich J, Boffetta P, Franceschi S, Azizi E, Sarid R. Classic kaposi sarcoma: epidemiology and risk factors. *Cancer*, 2000;88:500-17.
27. Jean D. Acton. *Virologia*. Nueva Editorial Interamericana. Mexico DF. 1977. 335pp.
28. Jensen M, Wright D, Robinson R. *Microbiology for the Health Sciences*. Prentice Hall. 1996. Upper Saddle River, NJ.
29. Jonkers J, Berns A. Retroviral insertional mutagenesis as strategy to identify cancer genes. *Biochim Biophys Acta*. 1996;1287: 29-57.
30. Kirby L. Bland. *La mama, manejo multidisciplinario de las enfermedades benignas y malignas*. Segunda edición. Editorial Médica panamericana. Argentina. 2000. 781pp.
31. Knaul F., Lozano R., Gómez H., Arreola O. *El cáncer de mama en México: cifras para la toma de decisiones*. Observatorio de la salud. Documento de trabajo. 2008. Competitividad y salud, fundación mexicana para la salud.
32. Lawson J, Tran D, Carpenter E, Ford C, Rawlinson W, Whitaker N, Delprado W. Presence of mouse mammary tumour-like virus gene sequences may be associated with morphology of specific human breast cancer. *J Clin Pathol*. 2006 Dec;59(12):1287-92.
33. Levine P, Pogo B, Klouj A, Coronel S, Woodson K, Melana S, Murali N, Holland J. (Increasing evidence for a human breast carcinoma virus with geographic differences. *Cancer*. Aug 2004;15;101(4):721-6.
34. Lewin Benjamin. *Genes VIII*. Editorial Pearson Prentice Hall. Estados Unidos de America. 2004. 1002pp

35. Liu B, Wang Y, Melana S, Pelisson I. Identification of a proviral structure in human breast cancer. *Cancer Res* 2001;61:1754-9.
36. Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser C, Matthew P, Darnell J. *Biología Celular y Molecular*. 5° Edición. Editorial Panamericana. 2005. pp 1050.
37. Lozano R, Knaul F, Gómez H, Arreola H, Méndez O. Tendencias en la mortalidad por cáncer de mama en México, 1979-2006. Observatorio de la Salud. Documento de trabajo. Competitividad y Salud, Fundación Mexicana para la Salud, 2008.
38. Mant C, Gillett C, D'Arrigo C, Casona J. Human murine mammary tumour virus-like agents are genetically distinct from endogenous retroviruses and are not detectable in breast cancer cell lines or biopsies. *Virology* 318. 2004. pp 393– 404
39. Mant C, Hodgson S, Hobday R, D'Arrigo C, Cason J. A viral etiology for breast cancer: time to re-examin the postulate. *Intervirology*. 2004;47: 2-13
40. Melana S, Picconi M, Rossi C. Detección del virus del tumor mamario Murino (MMTV) y sus secuencias similares al gen Env en el cáncer de mama de pacientes Argentinas. *Medicina Buenos Aires*. 2002. 62:323-327.
41. Matsuzawa A, Nakano H, Yoshimoto T, Sayama K. Biology of mouse mammary tumor virus (MMTV). *Cancer Letters* 90 1995:3- 11
42. NCCO National Breast Cancer Organization. 2004. <http://www.y-me.org/espanol/informacion/default.php>
43. NCBI National Center for Biotechnology Information <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
44. NCI National Cancer Institute. <http://www.cancer.gov/espanol/pdq/tratamiento/seno/Patient/page2>
45. Passarge E. *Genética: texto y atlas*. 2ª edición. Panamericana. Buenos Aires. 2004. Páginas 92-103.
46. Pike M, Henderson B, Casagrande J. Oral contraceptive use and early abortion risk as factors for breast cancer in young women. *Br J Cancer* 1981;43:72-76.

47. Raisman J, González A. Hipertextos del área de biología. 2007.  
<http://www.biologia.edu.ar/viruslocal/estructurayclasificacion.htm>
48. Ríos A, Hernández M. Los genes supresores de tumores y el cáncer. Rev Cubana Oncol 2001;17(1):65-71
49. Ruiz E. Manual de patología mamaria. 1ª ed. Barcelona: Editorial JIMS SA; 1993.
50. Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. Molecular Cloning: A laboratory manual. 2<sup>nd</sup> ed. New York. 1989: Cold Spring Harbor. 3v
51. Stewart T, Sage R, Stewart A, Cameron D. Breast cancer incidence highest in the range of one species of house mouse, *Mus domesticus*. Br J Cáncer 2000;82:445-51
52. Stuver S, Boschi C, Trichopoulos D. Infection with hepatitis B and C viruses, social class and cancer. IARC Sci Publ 1997;138:319-24.
53. Theodorou V, Kimm M, Boer M, Wessels L, Theelen W. MMTV insertional mutagenesis identifies genes, gene families and pathways involved in mammary cancer. Nature genetics. 2007;39:759-769.
54. Vargas M. Virología Médica. Universidad Nacional de Colombia. 2002. 464pp.
55. Wang Y, Holland J, Bleiweiss I, Melana S, Liu X, Pelisson I, Cantarella A, Stellrech K, Mani S, Pogo B., Detection of mammary tumor virus –like sequences in human breast cancer. Int J Cancer 1984;33: 305 – 308.
56. Wang Y, James F, Melana S, Liu X, Pelisson L. Detection of mammary tumor virus ENV gene like sequences in Human breast cancer. Cáncer Research. Volumen 55. 1995. Páginas 5173-5179
57. Wilkinson D, Mager D, Leong J. Endogenous human retroviruses. Levy JA, editor. The Retroviridae. New York: Plenum, 1994:465-535.
58. Witt A., Hartmann B., Marton E., Zeillinger R., Schreiber M., Kubista E. The mouse mammary tumour-like env gene sequence is not detectable in the breast cancer tissue of Austrian patients. Oncol. Rep. 10, 2003:1025– 1029.
59. Young L, Rickinson A. Epstein-Barr virus: 40 years on. Nat Rev Cáncer 2004;4:757-68.

60. Zapata P, Saavedra S, Zamora D, Vargas C, Barrera R, Salinas J, Rodríguez C, Tamez R, Trejo L. Mouse mammary tumor virus-like gene sequences in breast cancer samples of Mexican women. *Intervirology*. 2007;50(6):402-7.
61. Zamora P, Espinosa E, González M. Cáncer de mama. Clasificación y concepto. *Medicine* 2001; 8(57): 3041-3049.
62. Zangen, R, Harden, S, Cohen, D, Parrella, P, Sidransky, D. Mouse mammary tumour-like env gene as a molecular marker for breast cancer. *Int. J. Cancer* , 2002:102, 304– 307