



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI
UMAE HOSPITAL DE PEDIATRIA

TESIS

“ IDENTIFICACIÓN Y FRECUENCIA DEL VIRUS DEL TUMOR
MAMARIO MURINO EN TUMORES DE MAMA EN UNA
MUESTRA DE MUJERES MEXICANAS”

PARA OBTENER EL DIPLOMA DE ESPECIALISTA EN
GENÉTICA MÉDICA

Presenta:

DRA. MARIANA ALCIONE RIVES GÜENDULAIN

TUTOR: DR. DIEGO J. ARENAS ARANDA

ASESOR METODOLÓGICO: DR. JUAN MANUEL MEJÍA ARANGURE



MÉXICO, D.F.

AGOSTO 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

JURADO DEL EXAMEN

PRESIDENTE

DR. FABIO SALAMANCA GÓMEZ
JEFE DE LA COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN EN SALUD, IMSS

SECRETARIA

DRA. ANA CAROLINA SEPÚLVEDA VILDÓSOLA
JEFA DE LA DIRECCIÓN DE EDUCACIÓN EN INVESTIGACIÓN EN SALUD DE LA UMAE, HOSPITAL
DE PEDIATRIA, IMSS

SINODAL

DRA. HAYDEÉ ROSAS VARGAS
INVESTIGADORA DE LA UNIDAD DE INVESTIGACION MÉDICA EN GENÉTICA HUMANA DE LA
UMAE, HOSPITAL DE PEDIATRIA, IMSS

SINODAL

DR. JUAN CARLOS HUICOCHEA MONTIEL
MÉDICO ADSCRITO DEL SERVICIO DE GENÉTICA MÉDICA DE LA UMAE, HOSPITAL DE
PEDIATRIA, IMSS

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular de la Unidad de Investigación en Genética Humana del Centro Médico Nacional S.XXI del Hospital de Pediatría.

El trabajo se realizó con el apoyo financiero de los proyectos

“Infección, inflamación y cáncer; estudio para el desarrollo de pruebas de diagnóstico y la identificación de biomarcadores de riesgo, pronóstico y prevención”

NR 2008-785-001

“Correlación de la expresión del gen *BIK*, con la expresión de los genes *HMAM* y *Ck-19* en células circulantes en sangre periférica y tejido mamario neoplásico de mujeres mexicanas con cáncer de mama”

FIS/ IMSS/ PROT/721 (CONACYT)

COLABORADORES:

Dr. Fabio Salamanca Gómez
Dra. Dolores Vergara
Dra. Martha Ruiz Tachiquin
Dr. Normand García Hernández
Dr. Gelazio Zarco Espinosa
M. en C. Mónica Garrido
Biol. Etzrael Antonio Juárez
Biol. Alberto Cedro Tanda
Dr. Alejandro Córdova

I. INDICE

I. Resumen	5
II. Marco teórico	6
III. Antecedentes.....	16
IV. Justificación.....	22
V. Planteamiento del Problema.....	22
VI. Hipótesis.....	23
VII. Objetivos.....	23
VIII. Material y métodos.....	24
IX. Consideraciones Éticas.....	33
X. Resultados.....	34
XI. Discusión.....	47
XII. Conclusiones.....	50
XIII. Anexos	51
Anexo 1. Aprobación de la Comisión Nacional Científica.....	51
Anexo 2. Carta de Consentimiento Informado.....	52
XIV. Bibliografía	54

“IDENTIFICACIÓN Y FRECUENCIA DEL VIRUS DEL TUMOR MAMARIO MURINO EN TUMORES DE MAMA EN UNA MUESTRA DE MUJERES MEXICANAS”

Tesista: Rives Güendulain Mariana Alcione, Residente de Genética Médica, HP, CMN SXXI, IMSS.

Tutor: Dr. Diego J. Arenas Aranda UIM, Genética Humana, HP, CMN SXXI, IMSS.

Asesor Metodológico: Dr. Juan Manuel Mejía Arangure. Coordinación de Investigación, CMN SXXI. IMSS.

RESUMEN:

Introducción: el cáncer de mama es un problema de salud a nivel nacional e internacional, considerándose una entidad heterogénea en su presentación clínica, genética y bioquímica. En los últimos años se ha renovado el interés en la investigación sobre la posible etiología viral del cáncer de mama humano. En publicaciones previas se ha demostrado la presencia de secuencias homólogas al gen *env* del virus del Tumor Mamario Murino (MMTV) en alrededor del 38% de cánceres de mama de mujeres procedentes de Estados Unidos e Italia; estas secuencias están generalmente ausentes en otros tumores y en tejido mamario no afectado.

Objetivo: En el presente trabajo se analizó un fragmento del genoma del virus del tumor mamario murino (gen *env*) mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa para determinar la presencia del MMTV/ HMTV (MMTV-like) en biopsias del banco de tejidos de la Unidad de Genética Humana del Hospital de Pediatría de CMN SXXI (Tumores de mama y tejido mamario adyacente no afectado de pacientes con cáncer de mama del Centro Médico Nacional S.XXI, del Hospital de la Mujer y del Hospital Juárez de México) y establecer una relación genotipo-fenotipo.

Pacientes y método: se determinó la presencia o ausencia del MMTV mediante PCR anidada de 26 muestras de tejido mamario neoplásico y sus tejidos adyacentes no afectados respectivos, en mujeres mexicanas con cáncer de mama en diferentes estadios clínicos.

Resultados: Se obtuvieron 26 muestras pareadas de pacientes con cáncer de mama, la mediana de edad de las pacientes fue 50 años, la mayoría proveniente del DF. El tipo histológico más frecuente fue el carcinoma ductal en 76.9%, en cuanto al estadio clínico el más frecuentemente observado fue el IIIA (26.9%), seguido del IIB (23.1%). El 84.6% de las pacientes presentó lactancia positiva, el 19.2 % de las pacientes contaba con antecedentes de cáncer de mama familiar. Por otro lado el 30.8% de las pacientes refería tabaquismo y el 15.4% consumo de alcohol. El 38.5% de las pacientes contaba con receptores de estrógenos positivos, y 30.8% con receptores de progesterona positivos, la sobreexpresión de HER2/*neu* se encontró en 7.7% de las pacientes. Como parte de los resultados encontramos 92% de positividad en el tejido tumoral y 96% en el tejido mamario adyacente no afectado en la PCR anidada para la secuencia viral *env* de MMTV, encontramos además que en el tejido mamario tumoral el estadio clínico en que se presenta con mayor frecuencia es el IIB y IIIA, seguidos del IIA. Mientras que la secuencia viral en el tejido mamario no afectado adyacente se encontró con mayor frecuencia en el estadio clínico IIIA.

Conclusiones: La frecuencia de positividad de la presencia del gen *env* de MMTV mediante PCR anidada en muestras de tejido tumoral es mayor a la reportada mundialmente; así mismo en el tejido adyacente se encontró una alta positividad, la cual no se había reportado previamente. Sin embargo, el tamaño de la muestra no es lo suficientemente grande como para obtener datos significativamente estadísticos sobre la frecuencia de la presencia de la secuencia viral y tampoco en cuanto a otras variables analizadas en este proyecto; por lo que será necesario corroborar por otros métodos de biología molecular como PCR múltiple, RT-PCR y secuenciación la presencia de la secuencia viral y poder tomar las medidas necesarias en caso de verificarse nuestros resultados para disminuir la prevalencia de la infección.

II. MARCO TEÓRICO

El cáncer de mama es una enfermedad maligna del epitelio glandular mamario (conductos, lobulillos) y en menor medida del estroma, en donde existe pérdida de la proliferación celular normal con capacidad de invasión y metástasis (National Cancer Institute, 2007). El 90% de los casos se considera esporádico y 10% es hereditario (Lynch, 2008).

Epidemiología

El cáncer de mama constituye un problema de salud pública a nivel mundial, ya que es el más común entre las mujeres y corresponde al 21.2 % de todos los casos nuevos de cáncer (Boyle, 2008). La *American Cancer Society* predice que 1 de cada 8 mujeres padecerá cáncer de mama durante su vida (Smith, 2003). Existen diferencias geográficas en el número de nuevos casos descubiertos y se reconocen diferentes zonas de riesgo; las de alto riesgo de incidencia son Norteamérica y el Norte de Europa, en donde se diagnostican más de 150,000 casos cada año (31% de todos los casos a nivel mundial). Las regiones con riesgo moderado son Sudamérica y el Sur de Europa y con bajo riesgo son Asia y África. (Knaul, 2008).

En México se presentan casos desde la tercera década de la vida, con una frecuencia máxima entre los 40 y 54 años de edad; posterior a la sexta década hay un descenso paulatino. Se ha observado que las mujeres mexicanas desarrollan cáncer de mama en promedio, una década antes que las mujeres europeas o norteamericanas, lo cual puede ser en parte por la conformación de la pirámide poblacional mexicana, en donde predominan las mujeres jóvenes (Knaul, 2009); sin embargo, generalmente el diagnóstico se realiza en etapas más avanzadas. Las tasas de mortalidad por cáncer de mama en México han incrementado notoriamente de 4 en 1960 hasta 9/100,000 mujeres para la mitad de 1990; en el 2005 se incrementó la tasa 2.5 veces, superando al cáncer cervicouterino (Lozano, 2008). En algunos estados como Jalisco, se ha reportado una tasa de mortalidad de 15.82% por cada 100,000 mujeres y esta tendencia parece mantenerse en la mayoría del país, siendo a nivel nacional la tercera causa de muerte general y la primera por cáncer, (Aceves, 2003). En el 2008 se informaron 4835 muertes por cáncer de mama en México (INEGI, 2008).

Factores de Riesgo

En cuanto a los factores de riesgos conocidos, los estudios epidemiológicos han mostrado asociación entre diferentes exposiciones o características y una mayor frecuencia de la enfermedad; los que se han evidenciado se incluyen en 3 grupos: los componentes genéticos -familiares, endócrinos - reproductivos y los exógenos (Romero, 2008):

- 1) **Factores genéticos:** es evidente que existe un aumento considerable de riesgo cuando hay antecedentes familiares de cáncer de mama, especialmente si la neoplasia se presentó en edad premenopáusica o en forma bilateral en familiares de primer grado, con un incremento de riesgo de 1.5 a 3 veces mayor que el esperado para la población general. En caso de ser varios los familiares consanguíneos afectados, el riesgo puede elevarse hasta 5 a 9 veces más. (Brandan, 2006).

La transformación oncogénica de una célula normal, es un proceso de múltiples pasos que requiere la activación o inactivación usualmente por eventos mutagénicos de varios genes específicos, denominados protooncogenes y genes supresores de tumores que controlan la proliferación y diferenciación de varias vías celulares esenciales involucradas en el crecimiento y desarrollo; cuando ocurren mutaciones, amplificaciones, translocaciones o pérdida de metilación en dichos genes se puede presentar hiperplasia, anaplasia y metástasis (proliferación celular excesiva y descontrolada). Se han identificado dos genes principales de susceptibilidad a cáncer de mama, *BRCA1* (17q21) y *BRCA2* (13q12.3); los cuales están implicados en la reparación del DNA de doble cadena mediante la vía de recombinación homóloga así como en la regulación de la transcripción; por lo que se consideran genes supresores de tumores (NCBI). Las mutaciones heredadas de estos dos genes, presentes del 5 al 10% de los casos, confiere un mayor riesgo de desarrollar cáncer de mama de 65% y 45% respectivamente a los 70 años. Recientemente se ha encontrado que el gen *BARD1*, en combinación con mutaciones de *BRCA2* incrementa el riesgo hasta en 80%.

Por otro lado el gen *TP53* (17p13.1), el cual es un gen supresor de tumor frecuentemente mutado en el Síndrome de Li-Fraumeni; codifica para una fosfoproteína nuclear de 53 kDa, la cual en condiciones normales regula el ciclo celular y la apoptosis

(Royds JA 2006). Actúa como factor de transcripción nuclear e impide la progresión del ciclo celular en las células dañadas debido al efecto inhibitorio que realiza al inducir la producción de la proteína p21 que incide sobre diferentes complejos cdk/ciclina, con la subsecuente detención en la transición G1/S y en la G2/M del ciclo celular (Herrera R, 2004). El Síndrome de Li Fraumeni-like por mutación de *CHEK2* que codifica para una proteína de control de ciclo celular también muestra incremento del riesgo de cáncer de mama.

Existen además otros genes como *ATM* (mutado en Ataxia Telangiectasia, 11q22.3) cuya mutación incrementa el riesgo de cáncer de mama en los portadores heterocigotos hasta 3.6 veces, ya que se encuentran alteradas las vías de reparación de DNA causadas por radiación. (Bernstein et al. 2010).

El gen de Retinoblastoma (*Rb*: 13q14) codifica una fosfoproteína nuclear de 105 kD, la cual ejerce su efecto durante la fase G1 del ciclo celular unida al factor de transcripción E2F. Éste complejo tiene 2 funciones, impedir la transición a la fase de Síntesis (S) y reprimir la transcripción de otros genes. En el punto de restricción de la fase G1 del ciclo celular o cerca del mismo, la proteína Rb es fosforilada por el complejo cinasa dependiente de ciclina (CDK) y esta fosforilación causa la liberación del factor E2F por Rb, la cual activa genes requeridos para la fase S y reprime otros genes cuya función estaba controlada por el mismo complejo. Se ha propuesto como marcador pronóstico (Zhang, 2000).

HER-2/neu (*erbB-2*) (17q21) es un protooncogén que codifica una glucoproteína de transmembrana con actividad tirosina-cinasa el cual funciona como un receptor semejante al de los factores de crecimiento (perteneciente a la familia EGFR). La amplificación del número de copias del gen se presenta en 10 a 20% de los casos de cáncer de mama e incrementa la propiedad del receptor monomérico para formar dímeros. La sobreexpresión de este gen aumenta el potencial invasor de las células cancerosas, por lo que se relaciona con un pronóstico desfavorable, aunque se ha demostrado una respuesta adecuada a Trastuzumab y Lapatinib (Moelans, 2009).

- 2) **Factores endocrinos y reproductivos:** diversos estudios han publicado que el aumento de estrógenos endógenos y exógenos se asocian a un mayor riesgo, ya que el estrógeno estimula mitosis en las células epiteliales de la mama y este efecto mitogénico puede verse aumentado por la progesterona. Por lo que la menarca temprana 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. En el caso de la menarca temprana se ha descrito que por cada dos años de atraso de ésta, disminuye el riesgo de cáncer un 10% y por el contrario el riesgo es dos veces mayor cuando la menopausia ocurre después de los 55 años, mientras que la menopausia artificial por ooforectomía antes de los 40 años, ha mostrado disminuir significativamente el riesgo. El consumo de anticonceptivos orales y la terapia estrogénica de reemplazo por períodos prolongados (mayores a 5 años) incrementan el riesgo anualmente en 2% cuando se utiliza el estrógeno solo y en 4% por año cuando se emplea estrógeno combinado con progesterona.

En cuanto a los factores reproductivos, retrasar el embarazo hasta después de los 30 años, la nuliparidad o disminuir la paridad elevan el riesgo de cáncer de mama. Por el contrario, la lactancia y la multiparidad han sido demostradas como factores protectores.

- 3) **Factores exógenos:** dentro de estos podemos incluir a los factores ambientales; está bien demostrada la diferencia de riesgo de cáncer de mama entre las poblaciones rurales y urbanas, así como entre poblaciones que habitan zonas altamente industrializadas. Los factores ambientales que han sido involucrados abarcan desde la actividad física, el uso de tintes para el cabello, la dieta, ingesta de café y alcohol por incremento de los niveles de estradiol en la fase periovulatoria; el consumo del tabaco por la presencia de benzopireno, nitrosaminas y aminos aromáticas (Zamora, 2001). También se han relacionado el estrés, la depresión, el uso de medicamentos como reserpina o diazepam, espironolactona, radiaciones electromagnéticas o ionizantes (natural o artificial), contaminantes ambientales como pesticidas organoclorados que tienen capacidad de interactuar con los fitoestrógenos y otros xenoestrógenos. En cuanto los factores dietéticos se ha correlacionado el mayor consumo de las grasas animales y azúcares refinados de la dieta occidental (MacLennan, 2010).

Estructura corporal: Los hábitos de las mujeres habitantes de grandes urbes incrementan la obesidad postmenopáusica y el índice de masa corporal, que se asocia a niveles más altos de estrógenos y sulfato de estrona; por lo que se ha sugerido que la altura, el volumen mamario, estructura corporal y obesidad son factores de riesgo, mujeres cuya talla es mayor tienen más riesgo que las de talla más baja. Otros estudios han mostrado que la distribución de grasa abdominal es un factor de riesgo, específicamente en las mujeres premenopáusicas en quienes se produce aumento de estradiol, hecho aparentemente relacionado con hiperinsulinemia, que a su vez aumenta el factor de crecimiento de insulina tipo I, el cual interactúa con los estrógenos para estimular el desarrollo de las células cancerígenas.

Procesos proliferativos: Las mujeres que tienen antecedentes de hiperplasia epitelial atípica, patología benigna proliferativa, tienen 4-5 veces más riesgo de desarrollar cáncer mamario que las mujeres que no muestran cambios proliferativos.

Virus oncogénicos: son otro factor de consideración. En la búsqueda de una causa viral del cáncer mamario se han analizado algunos virus como posibles responsables, estos son: VPH, EBV y MMTV, es posible que 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 (De Villiers, 2005).

Sintomatología

En etapas tempranas típicamente no se producen síntomas; generalmente la primera manifestación es la presencia de un nódulo de consistencia dura, superficie irregular, fijo o móvil, de diferentes formas y tamaños, el cual provoca asimetría de las mamas, retracciones en la areola, el pezón o en la piel; por lo regular indoloro; genera descarga hemática, unilateral y espontánea en menos del 10%. Lo más frecuente es que la tumoración se localice en el cuadrante superior externo (40%), cuadrante inferoexterno (15%), cuadrante superointerno (5%) y en el área de areola y pezón 20%. Cuando el cáncer ha avanzado el nódulo se fija a la pared torácica o a la piel, provocando nódulos satélites, úlceras cutáneas y exageración de las marcas de piel habituales por linfedema (piel de naranja). Puede existir invasión local de inicio a los ganglios linfáticos regionales, al torrente sanguíneo o ambos. Las adenopatías axilares, supraclaviculares o infraclaviculares indican metástasis, la cual se puede presentar en algunas

pacientes años o décadas después del diagnóstico y tratamiento; afectan la columna vertebral, costillas y pelvis en 50% generando fracturas patológicas; el 25% presenta dificultad respiratoria por afecciones pleuro-pulmonares, 10% cursa con alteraciones abdominales, principalmente hepáticas y ováricas. Así mismo, puede existir metástasis cerebral, afectando principalmente la órbita y a nivel cutáneo en la región quirúrgica y en piel cabelluda.

Clasificación del Cáncer de Mama

- **Clasificación histopatológica:** Histológicamente el tumor se clasifica según sus características, si se presenta en células epiteliales: carcinoma de tipo ductal (70 a 85%) y en lobulillar (5 a 15%). Siguiendo la clasificación histológica de la OMS para los tumores mamarios malignos, se pueden dividir como se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 1. Clasificación histológica de la OMS para los tumores mamarios

TIPO HISTOLÓGICO	CARACTERÍSTICAS
Carcinoma ductal <i>in situ</i> .	Se origina de células de las paredes de los conductos mamarios. Está localizado y no ha producido metástasis.
Carcinoma ductal infiltrante (invasivo)	Se inicia en el conducto mamario pero logra atravesarlo, pasa al tejido adiposo de la mama luego puede metastatizar.
Adenocarcinoma lobular (lobulillar) <i>in situ</i>	Se produce en las glándulas mamarias (lóbulos). Está localizado y no ha producido metástasis.
Adenocarcinoma lobular (lobulillar) infiltrante	Comienza en los lobulillos pero es invasivo y metastatiza. Representa del 10 a 15% de los tumores de mama. Se divide en: Mucosecretor, adenoquistico, papilar, tubular y metaplásico.
Carcinoma inflamatorio	poco común, representa el 1% del total de tumores cancerosos de mama, es agresivo y de rápido crecimiento

- **Clasificación TNM para el Cáncer de mama**

La clasificación TNM según *American Joint Committee on Cancer, Staging System for Breast Cancer*, se basa en el tamaño del tumor, la presencia de nódulos o ganglios linfáticos afectados y la presencia o ausencia de metástasis como se muestra en la tabla 2.

Tabla 2. Clasificación TNM del Cáncer de mama

CLASIFICACION TNM CÁNCER MAMARIO	
T = Tumor	Tx : Tumor desconocido To : Sin evidencias de tumor primario Tis : Carcinoma <i>in situ</i> (CDIS - CLIS - tumor Paget no asociado) T1 : Tumor de 2 cm o menos en su diámetro mayor T1 mic : Microinvasión menor de 0,1cm en su diámetro mayor T1a : Tumor de 0,5 cm o menos T1b : Tumor mayor de 0,5 cm y hasta 1 cm T1c : Tumor mayor de 1 cm y hasta 2 cm T2 : Tumor mayor de 2 cm y hasta 5 cm T3 : Tumor mayor de 5 cm T4 : Tumor de cualquier tamaño con extensión a pared torácica o a piel T4a : Extensión a pared torácica T4b : Piel con edema, ulceración o nódulos satélites en la mama T4c : Suma de a + b T4d : Cáncer inflamatorio
N = Linfonodos regionales	Nx : No pueden ser evaluados por falta de datos N0 : Ausencia de adenopatías palpables N1 : Metástasis axilares homolaterales móviles palpables N2 : Metástasis axilares homolaterales fijas o metástasis en mamaria interna homolaterales detectables por imágenes (salvo linfocintografía) o por examen clínico, en ausencia clínica de metástasis en axila. N2a: Metástasis axilares homolaterales fijas entre sí o a otras estructuras. N2b: Metástasis en cadena mamaria interna homolateral en ausencia clínica de metástasis axilares. N3 : Metástasis infraclaviculares homolaterales o en mamaria interna homolaterales detectadas por imágenes o clínica y presencia de metástasis axilares; o supraclaviculares homolaterales con o sin compromiso de linfonodos de axila o mamaria interna. N3a : Metástasis en linfonodos infraclaviculares homolaterales y en axilares N3b: Metástasis en linfonodos de mamaria interna homolaterales y en axilares N3c : Metástasis en linfonodos supraclaviculares
M = Metástasis a distancia	Mx : No hay datos M0 : Sin metástasis sistémicas demostrables M1 : Metástasis sistémicas presentes

Fuente: *American Joint Committee on Cancer, Staging System for Breast Cancer, USA*

- Es importante saber que esta nueva clasificación incorpora los Tmic y a la cadena mamaria interna dentro de N.

- **Estadificación en el cáncer de mama**

La estadificación del cáncer de mama según American Joint Committee on Cancer, se hace en base al tamaño de tumor, la presencia de ganglios o nodos linfáticos y la presencia de metástasis conjuntamente como se muestra en la tabla 3.

Tabla 3. Estadificación TNM del cáncer de mama

ESTADIFICACION TNM				
Estadio 0	=	Tis	N0	M0
Estadio I	=	T1	N0	M0
Estadio II A	=	T0	N1	M0
		T1	N1	M0
		T2	N0	M0
Estadio II B	=	T2	N1	M0
		T3	N0	M0
Estadio III A	=	T0	N2	M0
		T1	N2	M0
		T2	N2	M0
		T3	N1	M0
Estadio III B	=	T3	N2	M0
		T4	N0	M0
		T4	N1	M0
Estadio III C	=	T4	N2	M0
		Cualquier T	N3	M0
Estadio IV	=	Cualquier T + Cualq. N + M1		

Fuente: American Joint Committee on Cancer, Staging System for Breast Cancer, USA

Diagnóstico

Para promover la detección temprana, se hace énfasis en la autoexploración y el examen clínico con una especificidad de 90%. Dentro de los métodos de gabinete la mastografía es el método más eficaz para la detección temprana del cáncer de mama, ya que tiene una sensibilidad global del 80% al 90%. Su sensibilidad incrementa en pacientes de mayor edad, mamas adiposas y tumores mayores de 2 cm. Puede tener falsos negativos en el 2% de los tumores cancerígenos palpables, así como 10-22% de mujeres jóvenes. El Colegio Americano de Radiología, desarrolló la clasificación BI-RADS (Breast Imaging Reporting and

Data System) en la que cada categoría tiene implicaciones clínicas y terapéuticas, así como un valor predictivo positivo relacionado con la posibilidad de que exista un cáncer mamario, con las consecuentes implicaciones diagnósticas y terapéuticas.

- Para confirmar el diagnóstico, es necesario el estudio de histopatología, el cual puede hacerse mediante **PAAF (Punción por aspiración con aguja fina)**, en lesiones palpables y no palpables a través de una guía estereotáctica, y tiene una confiabilidad diagnóstica de 90-95%. **Biopsia:** por punción, biopsia estereotáctica (guiada por mastografía o ecografía) es imprescindible antes de iniciar el tratamiento. La cual además se debe analizar para determinar receptores de estrógenos, progesterona y la proteína HER 2/*neu*. Debe mencionar en detalle el tipo histológico, el grado nuclear, la presencia de necrosis, el tamaño de la lesión y el compromiso de los márgenes. Dependiendo de ciertas características de la paciente se pueden emplear otros métodos diagnóstico como se muestra en la Tabla 4:

Tabla 4. Otros estudios para diagnóstico y seguimiento en el Cáncer de mama

Estudio	Hallazgos
Ecografía	<ul style="list-style-type: none"> • Se presenta ecográficamente como un nódulo irregular hipoecoico (por absorción tumoral de ecos y con sombra acústica posterior), se observan con dificultad nódulos menores de 1cm y no se visualizan las microcalcificaciones • Aporta información cuando el examen es dudoso y la mastografía es normal y constituye un instrumento de guía que facilita la punción de lesiones no palpables, se puede emplear en mujeres menores de 40 años.
RMN y PET	No es rutinario su empleo; está indicada en el seguimiento de cicatrices mamarias intensas postquirúrgicas, estudios de multicentricidad de cáncer de mama, valoración de la extensión local para apoyar o contraindicar el tratamiento conservador y el estudio de complicaciones de prótesis mamarias así como pacientes con Síndrome de Li Fraumeni, Cowden, Banayan Riley Ruvalcaba o con familiares de primer grado con diagnóstico de alguna de estas entidades.
Gammagrafía ósea	Se debe realizar en pacientes con tumores mayores de 2 cm, así como en aquellas que presentan dolor musculoesquelético, linfadenopatías o elevación de la concentración sérica de fosfatasa alcalina o calcio
Tomografía abdominal	Se realiza si las pruebas de función hepática se encuentran anormales, ante la presencia de hepatomegalia o cáncer avanzado con o sin afectación de ganglios linfáticos axilares.
Seguimiento	Se deben realizar Radiografía de tórax, Biometría hemática completa y pruebas de función hepática.

El diagnóstico diferencial se realiza con los cambios fibroquísticos de la mama como adenosis, ectasia ductal, fibroadenomas, hiperplasia leve, quistes y metaplasia apócrina o escamosa.

Tratamiento y pronóstico

El tratamiento y pronóstico dependen de varios factores: la edad de la paciente, el tamaño del tumor primario, el grado tumoral, extensión y número de los ganglios linfáticos afectados, estadio clínico, la presencia o ausencia de Receptores de estrógenos y progesterona con un pronóstico más favorable en aquellas pacientes cuyos receptores son positivos (Lawrence, 2004) y como se mencionó anteriormente la sobreexpresión de HER2/*neu* que se relaciona con un pronóstico desfavorable, aunque se ha demostrado una respuesta adecuada a Trastuzumab y Lapatinib. Las opciones terapéuticas que se ofrecen se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Opciones de tratamiento.

Terapia	Características
Tratamiento neoadyuvante	Opción adecuada para las mujeres con tumores en estadios IIA, IIB y T3N1M0 que reúnen criterios para realizar una cirugía conservadora de la mama
Tratamiento quirúrgico	Mastectomía simple modificada con resección de ganglios linfáticos, Nodulesctomía, Resección amplia, mastectomía parcial o Cuadrantectomía y la linfadenectomía del primero y segundo nivel de la axila
Radioterapia	Durante 5 a 6 semanas posterior a la cirugía conservadora o bien en casos de afectación de la pared torácica o axilar invasiva, ha demostrado una reducción del 30% del riesgo de recurrencia.
Tratamiento sistémico	Quimioterapia o terapia endócrina después de la cirugía primaria, con el objetivo de eliminar la posible existencia de enfermedad residual microscópica y disminuir el riesgo de recidiva local o diseminación a distancia. Reduce la posibilidad de muerte anual en mujeres premenopáusicas del 25 al 35% y en posmenopáusicas de 9-19%.
Hormonoterapia	<ul style="list-style-type: none">- En la hormonoterapia se utilizan los bloqueadores de Receptores de estrógenos y progesterona como el tamoxifeno (20mg/día) y toremifeno. Se ha observado que el tratamiento por 5 años disminuye la posibilidad de muerte anual en un 25% en mujeres pre y posmenopáusicas (Incrementa el riesgo de cáncer de endometrio1%).- Los inhibidores de la aromatasas como el anastrozol, exemestano, letrozol, bloquean la producción periférica de estrógenos en mujeres posmenopáusicas (Thiantanawat A 2003).

III. ANTECEDENTES

En los últimos años han hecho grandes esfuerzos para encontrar diferentes agentes etiológicos del cáncer de mama, los datos recientes sugieren que el cáncer de mama es una enfermedad multifactorial, es decir, involucra varias causas y factores. (Antoniou, 2006) Últimamente se ha renovado el interés en la etiología viral de esta entidad, en especial un grupo de virus de ARN, los retrovirus, los cuales pueden favorecer la transformación maligna por lo que se denominan virus oncogénicos, causantes de alteración principalmente de protooncogenes. Se calcula que el 15% de todos los cánceres humanos tienen un origen viral. Dentro de los virus que provocan cáncer uno de los más importantes es el VPH, agente causal del cáncer cervicouterino (Damin, 2004). Los virus de la Hepatitis B y C se relacionan con el carcinoma hepatocelular, el VHS tipo 8 se encuentra en los tejidos de las 4 formas de Sarcoma de Kaposi (Iscovich, 2000); el virus de Epstein Barr (VEB) que infecta preferencialmente a los linfocitos B se le ha relacionado con diferentes carcinomas nasofaríngeos y con el linfoma de Burkitt (Young, 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 (C, 2000)

En el genoma también existen retrovirus endógenos, en la actualidad se han distinguido y clasificado los que se encuentran en humanos, llamados HERV (*Human endogenous retroviruses*). Dentro de estos, la clase II es más similar a los retrovirus tipo B y D de los mamíferos, e incluye al virus del tumor mamario murino (MMTV) entre otros. El genoma humano contiene al menos 50 copias de los retrovirus endógenos humanos K (*HERV-K*), que están relacionados con el MMTV de ratón. Se han descrito secuencias del gen *ENV* de *HERV-K* en tejidos de cáncer mamario y otros tipos de cáncer (Barbulescu, 1999).

En 1936 Bittner descubrió que el MMTV es un β retrovirus, históricamente se ha clasificado como un retrovirus simple, su genoma es de 9 Kb y contiene genes estructurales necesarios para la formación de partículas virales (*gag/env*) y aquellos que codifican para enzimas requeridas para la replicación viral (*pro/pol*). Sin embargo, el MMTV también codifica factores virales adicionales (Sag) y talvez (Naf) (Fig1), los cuales codifican proteínas no estructurales que facilitan la replicación viral o contrarrestan las respuestas inmunes innatas o adaptativas en la infección *in vivo* por lo que recientemente se ha sugerido sea clasificado

como un retrovirus murino complejo. El genoma de MMTV está flanqueado por terminales repetidos largos (LTR's) de aproximadamente 1.3 kb, en donde se codifican las proteínas virales accesorias denominadas Sag (superantígeno), además estas regiones son únicas ya que son inducibles por hormonas esteroideas debido a la presencia de elementos de respuesta a hormonas (HREs) dentro de la región U3 de LTR que contribuye a estos efectos inductores, razón por la cual se ha utilizado para la expresión de transgenes en el modelo murino del cáncer de mama (Ross, 2010).

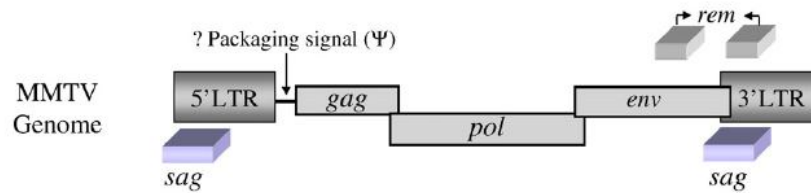


Fig.1 Genoma de MMTV, (Rizvi, 2009)

Al menos 5 transcritos se generan del genoma de MMTV, una cadena de RNA que inicia en el 5'LTR y termina en el 3'LTR y se empaqueta en los viriones; éste transcrito también funciona como mRNA para las proteínas Gag y Pol, así como una dUTPasa (Dut) y otras proteínas de función desconocida. La proteína Env, media la entrada retroviral a las células al unirse a moléculas de superficie específicas; se forma a partir de una proteína precursora de 73 kD que se escinde para formar una proteína de superficie (SU) de 52 kD que se une al Receptor de transferrina 1 (TfR1), así como una proteína transmembranal de 36 kD que es responsable de la fusión membranal.

Bittner descubrió que el MMTV por lo general, causa adenocarcinomas en el epitelio mamario después de un largo periodo de latencia en ratones. Su transmisión puede ser por vía exógena y endógena. En la vía endógena los ratones heredan la secuencia viral a través de la vía germinal e infectan a todas las células del cuerpo. (Mant, 2004).

Este virus reacciona al estrógeno durante la lactación con la influencia de las hormonas esteroideas 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 progenie en forma exógena. El virus entra al aparato digestivo de los lactantes e infecta a las células B que están en las placas de Peyer. Como se mencionó anteriormente la región 3' del genoma viral (LTR)

codifica a un super 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. 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. Se cree que el MMTV puede transmitirse de forma zoonótica a las personas por medio del ratón doméstico *Mus domesticus* y con menos frecuencia otras especies de ratones como *Mus musculus*, pues se ha observado una relación entre la incidencia del cáncer de mama en humanos y la incidencia de estas especies de ratones en diferentes partes del mundo (Stewart, 2000).

El mecanismo de transformación viral de MMTV es por mutagénesis insercional, es decir, la inserción del DNA proviral en el DNA del hospedero, proceso esencialmente al azar con alguna tendencia para los dominios transcripcionalmente activos. Las inserciones retrovirales en el mismo locus en varios tumores independientes marcan los llamados Sitios de Inserción Común (CIS), los cuales al parecer contienen genes involucrados en la tumorigénesis. De esta forma la mutagénesis insercional inactiva genes supresores de tumor o activa genes críticos para el control de la proliferación celular. (Mant, 2004). Este tipo de mutagénesis fue descrito por primera vez en 1981 por Hayward y colaboradores, al elucidar el mecanismo por el cual los virus de leucosis aviar inducían linfomas, descubrieron que el virus tenía como blanco el gen *Myc*. Posteriormente Nusse y Varmus identificaron *Wnt1* como un blanco frecuente del Virus de Tumor mamario murino (MMTV), también se han encontrado alteraciones de los genes *Fgf*, *Rspo*, *eIF3e* y *Notch4* en ratones (Callahan, 2008).

En 2007 se identificaron 33 sitios de inserción para MMTV, de los cuales 17 genes no estaban asociados con cáncer de mama 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 p53 en una mama con deficiencia de células epiteliales; también se demostraron mediante análisis bioinformáticos una gran proporción de proteínas, dominio y vías de señalización asociadas principalmente con factores de crecimiento (Theodoru, 2007).

En los últimos años se han acumulado importantes pruebas que indican las posibilidad de que este retrovirus (MMTV) o uno de sus homólogos (HMTV) desempeñen un papel importante en la manifestación del cáncer de mama 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.

Se ha demostrado que 37 a 41% de los cánceres esporádicos de mama contienen secuencias similares al gen *env* de MMTV, y se expresan como RNA y proteínas en el tejido tumoral; además, dichas secuencias están ausentes en el tejido sano de las pacientes con tumores *env* positivos y se expresan como RNA exclusivamente en el tejido neoplásico. La estructura proviral completa designada virus tumor mamario humano (HMTV) que tiene 95% de homología con el MMTV ha sido detectado; a pesar de las variaciones en la secuencia se ha demostrado que es funcional y puede activar linfocitos T humanos, incluso se han observado partículas virales con características de β -retrovirus en cultivos primarios de cáncer de mama.

Una de las precursoras en defender la hipótesis de que el MMTV o un virus semejante a éste se encuentra implicado en el origen del cáncer de mama es Beatriz G. Pogo, quien ha contribuido con una serie de trabajos acerca de la búsqueda de secuencias virales de MMTV en pacientes con cáncer de mama y en tejido sano. Esto ha motivado que otros investigadores busquen las secuencias de MMTV en diferentes poblaciones del mundo, como se muestra en la figura 2 y tabla 6.

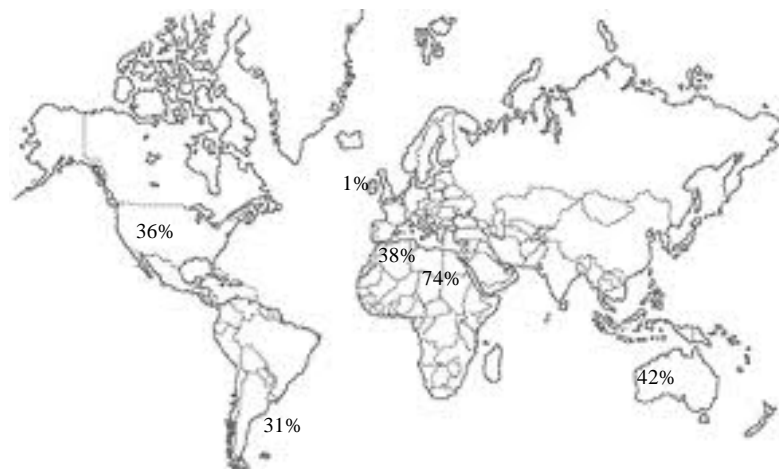


Figura 2. Localización de los Lugares donde se han realizado estudios de la relación de MMTV con el cáncer de mama en humanos. (modificado de Zapata BP, 2006).

Tabla 6. Porcentaje de aparición de MMTV en neoplasias mamarias en diferentes países.

País	Porcentaje de aparición de MMTV	Autor
Estados Unidos	36	Wang et al; 1998
Argentina	31	Melana et al; 2002
Australia	42	Ford et al; 2003
Reino Unido	0	Mant et al; 2004
Italia	38	Levine et al; 2004
Túnez	74	Levine et al; 2004
Suecia	0	Bindra et al; 2007
Japón	0	Fukuoka et al; 2008

Resulta interesante destacar que el Cáncer de mama en Túnez, un país con baja incidencia de cáncer de mama en comparación con países occidentales, ha reportado las proporciones más altas de positividad para MMTV-like (74%) (Levine, 2004); sin embargo, está alta prevalencia fue detectada entre 1978 y 1979 en un tiempo en el que el cáncer mama inflamatorio era endémico en el Norte de Africa. Para los años ochenta dos estudios describieron una alta incidencia de cáncer inflamatorio en Túnez (más de 55%) comparado con los Estados Unidos en donde el cáncer de mama inflamatorio representa solamente el 1 a 6% de los casos. No obstante, estudios epidemiológicos más recientes han mostrado una disminución importante en la prevalencia de cáncer inflamatorio representado el 10% de los casos así como un incremento de los otros tipos de cáncer de mama lo que concuerda con la occidentalización del estilo de vida y un incremento en los niveles socioeconómicos de la población Tunesina.

Las secuencias semejantes a MMTV se encuentran en algunas poblaciones humanas (hMMTV o MMTV-like) con cáncer de mama (30 a 60%) y rara vez se aprecian en el tejido no afectado (1 a 4%). Wang y sus colaboradores detectaron secuencias del gen *env* semejantes a MMTV en 30.1% de los tejidos cancerosos y sólo una muestra de 106 pacientes analizados con tejido sano resultó positiva. Lo anterior sugiere que las secuencias semejantes a MMTV no existen en el genoma sano humano y que éstas son adquiridas, por lo que el cáncer no se trasmite de manera genética sino que tiene un origen exógeno.

La mayor parte de los estudios se enfoca en la amplificación de una secuencia de la región del gen *env* de MMTV de 660pb y en una secuencia interna (250pb) de los 660pb. Estas secuencias no amplifican los virus endógenos conocidos y se han utilizado para detectar el DNA proviral y la expresión viral. Wang y sus colaboradores determinaron la expresión de

MMTV en muestras con secuencias provirales positivas y detectaron la amplificación de la secuencia de 660pb y la de la secuencia interna en 66 y 100% de las muestras analizadas, respectivamente. Estos resultados indican que el virus tiene la capacidad de integrarse y expresarse en el tejido mamario. Las secuencias semejantes a MMTV tienen alta homología para dicho virus y baja para los retrovirus endógenos.

Bingren Liu y sus colaboradores estudiaron la estructura proviral en dos tumores de mama humanos *env* positivos. El provirus LTR-gag-pol-env-LTR de 9.9 kb manifestó una homología del 95% a MMTV y del 57% a los retrovirus endógenos de humanos (HERVs) en los genes *gag* y *pol*. Se analizó la secuencia amplificada de 660 pb del gen *env* y se encontró una homología del 90 al 98% con el gen *env* de MMTV. Ford y sus colaboradores encontraron una relación entre el grado de malignidad del cáncer de mama y el porcentaje de secuencias relacionadas con MMTV. Se detectaron 43 de 136 (32%) tumores con secuencias de MMTV de éstos 23, 34 y 38% se observaron en el carcinoma ductal infiltrante de primer, segundo y tercer grado, respectivamente. Estos resultados suponen una relación de las secuencias de MMTV con la manifestación de tumores de mama y sugieren una asociación con el incremento de gravedad del cáncer.

En México (Zapata, 2007) se ha encontrado una frecuencia de 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.

IV. JUSTIFICACIÓN

El cáncer de mama esporádico representa el 90% de todos los casos de cáncer de mama y gran parte de su etiología es desconocida, se ha considerado que puede ser de origen multifactorial, en el cual existen factores genéticos de susceptibilidad y factores exógenos que juegan un papel importante; por lo anterior, es necesario estudiar la presencia en el tejido tumoral de otros agentes, entre ellos la presencia del Virus del Tumor Mamario Murino o el análogo humano (HMTV), que pudiera explicar la transformación maligna del tejido mamario y de esta manera tomar las medidas necesarias para contribuir a la disminución de la incidencia y prevalencia del cáncer de mama.

V. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En los últimos años se ha renovado el interés en la investigación sobre la posible etiología viral del cáncer de mama humano. En publicaciones previas se ha demostrado la presencia de secuencias homólogas al gen *env* del virus del Tumor Mamario Murino (MMTV) en alrededor del 38% de cánceres de mama de mujeres procedentes de Estados Unidos e Italia; estas secuencias están generalmente ausentes en otros tumores y en tejido mamario no afectado. En el presente trabajo se pretende analizar un fragmento del genoma del virus del tumor mamario murino (gen *env*) mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa para determinar la presencia del MMTV/ HMTV (MMTV-like) en biopsias del banco de tejidos de la Unidad de Genética Humana del Hospital de Pediatría de CMN SXXI (Tumores de mama y tejido mamario adyacente no afectado de pacientes con cáncer de mama del Centro Médico Nacional S.XXI, del Hospital de la Mujer y del Hospital Juárez de México) y establecer una correlación genotipo-fenotipo.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿La secuencia del gen *env* de MMTV está presente en el tejido mamario tumoral? ¿En presencia del gen *env* de MMTV en tejido tumoral de cáncer de mama es posible establecer una relación genotipo-fenotipo?

VI. HIPÓTESIS GENERAL

Si el MMTV provoca mutagénesis insercional es posible encontrarlo con mayor frecuencia en las biopsias de tejido tumoral de las pacientes con cáncer de mama que en el tejido mamario no afectado adyacente.

VII. OBJETIVO GENERAL

1. Identificar la secuencia del gen *env* de MMTV en las biopsias de pacientes con cáncer de mama

Objetivos secundarios

- a) Determinar la presencia/ausencia de la secuencia viral del MMTV en las biopsias de tejido tumoral en pacientes con cáncer de mama
- b) Determinar la presencia/ausencia de la secuencia viral del MMTV en las biopsias de tejido mamario adyacente no afectado en pacientes con cáncer de mama.
- c) Determinar si existe una relación genotipo-fenotipo entre la presencia del virus y el estadio clínico.

VIII. MATERIAL Y MÉTODOS

- **Tipo de estudio**

- Observacional, Analítico

- **Universo de estudio:** mujeres mexicanas con cáncer de mama del Hospital de Oncología de CMN S.XXI, Hospital de la Mujer y Hospital Juárez de México.

- **Muestra:** mujeres con cáncer de mama de reciente diagnóstico.

- **Cálculo de la muestra:** Programa EPI-info (n= 55; intervalo de confianza 95%)
- **Análisis estadístico:** SPSSv.18 (χ^2)

- **Criterios de inclusión:**

- Mexicanas con cáncer de mama
- Cualquier tipo histológico confirmado por histopatología
- Cualquier estadio clínico
- Se cuente con biopsias con tejido tumoral y tejido adyacente no afectado

- **Criterios de exclusión:**

- No acepte formar parte del estudio inicial.
- Pacientes multitratadas
- Muestras que correspondan a cáncer de mama recidivante

- **Criterios de eliminación:**

- Muestras insuficientes en las que no se obtenga cantidad adecuada de DNA para la realización de PCR
- Muestras en las que se presente degradación de DNA
- Pacientes en las que no sea posible extraer DNA tanto del tejido tumoral como del no afectado adyacente

Tabla 8. Definición de variables

Variable de Estudio	Definición conceptual	Definición operacional	Tipo de variable	Escala de medición y unidades de medición
Estadio clínico del Cáncer de mama Dependiente	Condición neoplásica caracterizada por crecimiento anormal y desorganizado, con pérdida de la diferenciación de las células del tejido mamario	Mediante mastografía se realizó el diagnóstico de cáncer de mama y se confirmó por patología (biopsia de tejido mamario)	Cualitativa	Nominal Politómica - Estadio clínico de la clasificación TNM
Presencia del MMTV Independiente	Secuencia del gen <i>env</i> del MMTV	Mediante la técnica de PCR se determina la presencia o ausencia de MMTV	Cualitativa	Nominal dicotómica -Presente -Ausente
Variable demográfica	Definición conceptual	Definición Operacional	Tipo de variable	Escala de medición y unidades de medición
Edad	Tiempo que ha vivido una persona desde su nacimiento, expresado en años	Resultado de la resta de la fecha actual a la fecha de nacimiento	Cuantitativa	Ordinal <40 años 41-50años 51-60 años 61-70años >71 años
Residencia	Acción y efecto de vivir en un lugar determinado	Estado de la República Mexicana en donde habita regularmente	Cualitativa	Nominal politómica Estados de la República Mexicana
Variables confusoras	Definición conceptual	Definición operacional	Tipo de variable	Escala de medición y unidades de medición
Lactancia	Proceso de síntesis, producción y secreción de leche de las mamas para la alimentación del niño	Alimentación de los hijos con leche materna	Cualitativa	Nominal Si/no
Antecedente de cáncer de mama familiar	Mujeres con múltiples familiares afectadas de cáncer de mama	Presencia 2 ó más familiares de 1° grado con cáncer de mama diagnosticado antes de los 40 años	Cualitativa	Nominal Si/No
Tabaquismo	Adicción al tabaco, fumar o consumir tabaco en sus diferentes formas y posibilidades	Fumar o inhalar el humo de más de 1 cigarrillo diariamente	Cualitativa	Nominal Si/No
Consumo de Alcohol	Abuso incontrolado de bebidas alcohólicas a nivel que interfiere con la salud física o mental del individuo	Ingesta de más de 1 bebida alcohólica diariamente	Cualitativa	Nominal Si/No

TRABAJO EXPERIMENTAL

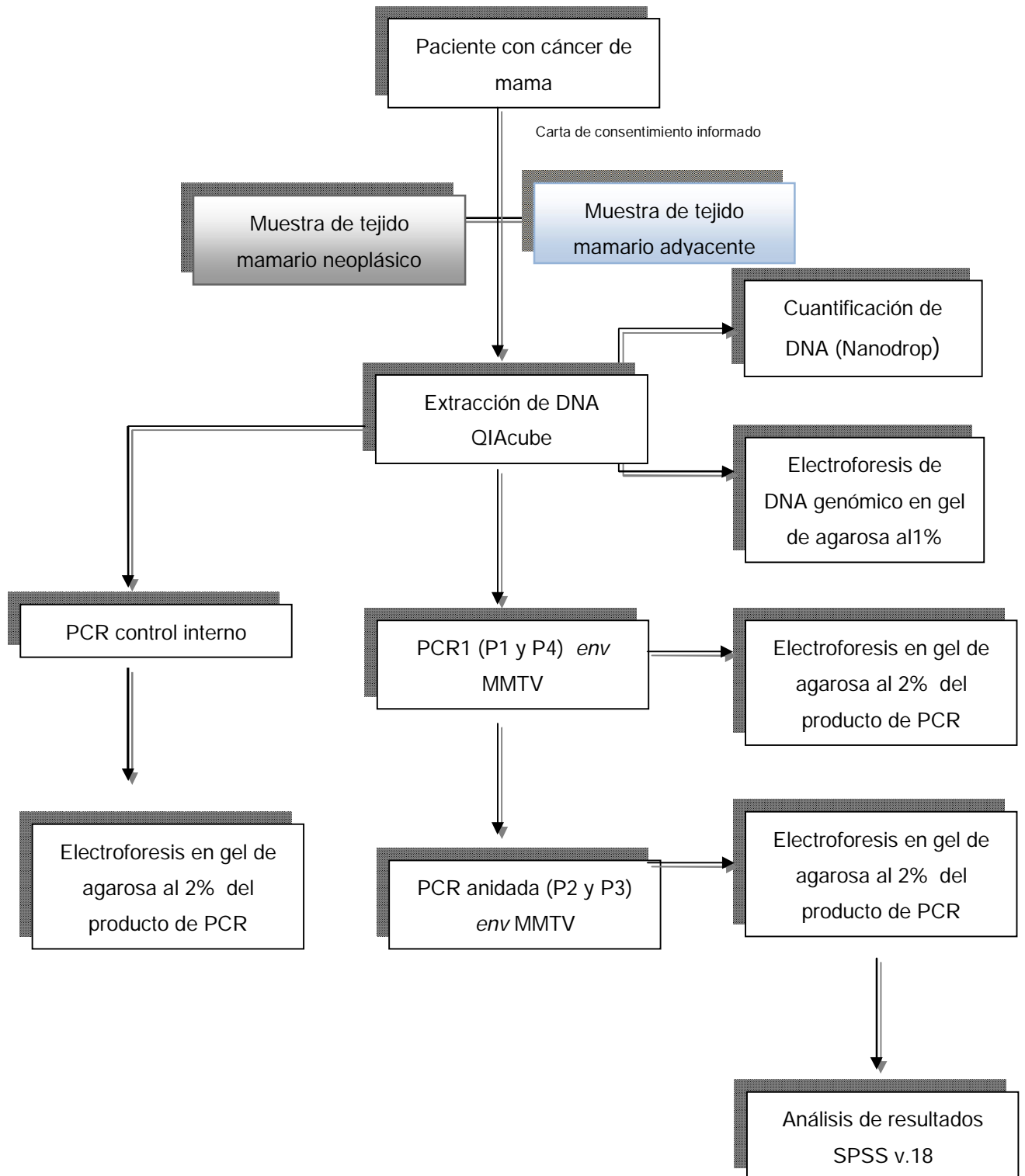


Figura 3. Diagrama de flujo que describe el trabajo experimental

1. Obtención de las muestras de tumores de mama

Las muestras de tumores mamarios se obtuvieron del banco de tumores de la Unidad en Investigación en Genética Humana del Hospital de Pediatría de CMN SXXI a cargo del Dr. Diego J. Arenas Aranda. Las muestras fueron provenientes de mujeres atendidas en: El Hospital de Oncología del CMN SXXI, Hospital Juárez de México y Hospital de la Mujer. Al obtenerse fueron transportadas al laboratorio de Genética Humana del CMN SXXI en un contenedor de nitrógeno líquido y se mantuvieron almacenadas a -70°C hasta su uso.

2. Extracción de DNA

a) Protocolo de QIAcube: DNeasy® Blood & Tissue Kit

- Protocolo standard: Purificación de DNA total de tejidos animales
- Material: 20 mg de tejido tumoral y 20 mg de tejido mamario no afectado adyacente
- Procedimiento:
 - Las muestras se digirieron previamente con proteinasa K (20 μl) y Buffer ATL (180 μl) en un tubo de 200 μl .
 - Se incubaron por 12 horas a 65°
 - Posteriormente se sometieron durante 3 ciclos en el Tissue Lyser (20s a 15 Hz)
 - Se extrajo el sobrenadante del tubo y la muestra se colocó en el sitio indicado del QIAcube
 - Finalmente se obtuvo la muestra de DNA en un volumen de 200 μl y se almacenó a -30°C .

b) Extracción de DNA de las muestras de tejido tumoral y tejido sano adyacente por método manual: Para la extracción del DNA se utilizó el método con fenol-cloroformo-isoamilíco (Sambrook et al 1989), las muestras de aproximadamente 200mg fueron cortadas en fragmentos y maceradas en un mortero con nitrógeno líquido, previamente enfriado y esterilizado. A la muestra macerada se le agregó 1.2ml de buffer de digestión que contiene:

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

Posteriormente las muestras se incubaron en tubos eppendorf de 1.5ml durante 18 horas a temperatura de 50°C con agitación constante; se les adicionó la mezcla de

fenol-cloroformo-isoamílico (25:24:1) volumen/volumen, se agitó y centrifugó 15 minutos a 13,000 rpm, 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 se lavó 2 veces la pastilla 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 DNA se resuspendió en 50 μl de ddH₂O y se almacenó a -30°C.

2. Cuantificación e integridad del DNA

a) La cuantificación de DNA se realizó mediante espectrofotometría con la ayuda de un espectrofotómetro (NanoDrop Technologies, ND-1000). El espectrofotómetro se calibró con 1 μl de agua destilada y se seleccionó el factor para DNA; se colocó 1 μl de la muestra, se llenaron los campos de datos y se obtuvieron los siguientes datos del DNA :

- Cantidad de DNA en ng/ μl
- Cociente de 260/280 como parámetro de pureza de la muestra

c) Integridad del DNA

La integridad del DNA se verificó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% los cuales se colocaron en una cámara de electroforesis y se sumergieron en una solución amortiguadora con pH neutro (TBE 1x), 1 μl de cada muestra de DNA teñido con Sybr-Gold y buffer de carga fue colocado en los pozos del gel al que se le aplicaron 90 volts durante 1 hora para permitir que el ADN migrara en dirección hacia el ánodo debido a su carga negativa. Posteriormente se obtuvo la imagen en un transiluminador de Luz Ultravioleta (Geldoc de BIORAD).

1. Montaje de la PCR del control interno:

a) Conjuntamente con la PCR del gen *env* del MMTV se realizó PCR a las muestras para el exón 5 del gen *NPHS2* el cual codifica para la podocina como control interno: se amplificó un fragmento de 201 pares de bases (pb) empleando los siguientes oligonucléotidos.

- Oligo F: 5'- TCTGCCTAGATCGTGACCAA-3'
- Oligo R: 5'- GGCGATGCTCTTCCTCTCTA-3'

b) Controles:

- Positivo (C+): se utilizó una muestra secuenciada en el exón 5 del gen *NPHS2*, previamente amplificada mediante PCR
- Negativo (C-): ausencia de DNA

c) Condiciones de la reacción

- La PCR se llevó a un volumen final de 30 µl, en donde a cada tubo se le agregaron los siguientes reactivos:

REACTIVO	CONCENTRACIÓN FINAL	VOLUMEN
Buffer	1x	3 µl
DNTPs	10 mM	0.6µl
Oligonucleótido 1	20 pmol	1 µl
Oligonucleótido 2	20 pmol	1 µl
MgCl ₂	1.5mM	0.75µl
<i>Taq</i> polimerasa	1.5 U	0.3 µl
DNA	100 ng	"x" µl
Agua		"x" µl

- Los tubos eppendorf se colocaron en un termociclador GeneAmp® PCR System 9700 y se llevo a cabo la PCR bajo las siguientes condiciones:

- a) 94° 5'
 - b) 94° 30"
 - c) 51° 30"
 - d) 70° 2'
 - e) 4° ∞
- 30 CICLOS

2. Montaje de la PCR anidada para la secuencia del gen *env* de MMTV

a) Controles:

- Positivo (C+): se utilizó el gen *env* del MMTV cepa C3H, insertado en el plásmido pBR322 (adquirido de la ATCC 45006), el cual fue introducido en la cepa XL1-Blue de *E. coli*. La cual fue donada por el laboratorio de Genética de la Unidad de Morfología y Función de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Se obtuvieron células competentes mediante cloruro de calcio 0.1M y se transformaron con el plásmido mediante shock térmico. Posteriormente se seleccionaron las clonas que adquirieron el plásmido usando tetraciclina 20ug/ml como marcador de selección. Las clonas se propagaron en cultivos líquidos hasta su fase exponencial y se extrajo el DNA plasmídico con el paquete comercial Qlaprep Miniprep (27106, Quiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante.
- Negativo (C-): ausencia de DNA

b) Diseño de oligonucleótidos específicos: con el 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 Gene Bank, NCBI con número NC_001503.

```

5341 ctatgcttgt gttttccac aggatgccga aacaccaatc tgggtccccg accgattcat
5401 ccgacctttt actgagcggg aagaagcaac gcccacacct ggcactgcgg agaaaacgcc
5461 gccgcgagat gagaaagatc aacaggaag tcccaagaat gaatctagtc cccatcaaaq
5521 agaagacggc ttggcaacat ctgcaggcgt tgatctccga agcggaggag gtccttaaaa
5581 cctcacaaac tcccaaacc tcttgacct tattcttgc ttgtgtct gtcctggcc
5641 ccccgcctgt qacaggggag agttattgg cctacctacc taaaccacct attcctcatc
5701 ccgtgggatg gggaagtaca gaccccatta gagttctgac aatcaaac atgtattgg
5761 gtggttcgcc tgactttcat gggttcagaa atatgtctgg taatgtacat ttgagggga
5821 agtctgatac gctccccatt gctcttct tctcctttc tacccccacg ggctgcttc
5881 aagtagacaa gcaagtattt cttctgata ccccacggt tgataataat aaacctgggg
5941 gaaaggggta taaaagcgt atgtgggaaac ttggttgac tacctgggg aactcagggg
6001 ccaatacaaa actggtccct ataaaaaaga agttgcccc caaatatcct cactgccaga
6061 cgccttaa gaaggacgcc ttctgggagg gagacgagtc tgctcctca cggtggtgc
6121 cttgcgcctt cctgaccag ggggtgagtt ttctccaaa aggggccctt gggttacttt
6181 gggatttctc cttccctcg cctagttag atcagtcaga tcagattaaa agcaaaaaga
6241 atctatttgg aaattatact ccccctgtca ataaagaggt tcatcgatgg tatgaagcag
6301 gatgggtaga acctacttgg ttctgggaaa attctcctaa ggalcccaat gatagagatt
6361 tcactgcact agtccccat acagaattgt ttgcttagt cgcagcctca agacatctta
6421 ttctcaaaag gccaggattt caagaacatg agatgattcc tacatctgcc tgtgttact
6481 acccttatgc catattatta ggattacctc agttaataga tatagagaaa agaggatcta
6541 cttttcatat ttctgttct tctttagat tgactaattg tttagactct tctgcctacg
6601 actatgcagc gatcatagtc aagaggccgc catatgtct gctacctga gatattggtg
6661 atgaacatg gttgatgat tctgccattc aaacctttag gtagccaca gatttaattc
6721 gagctaagcg attcgtcgca gccattatcc tgggcatatc tgctttgatt gctattatta
6781 ctcctttgc ttagctact actgccttag ttaaggagat gcaaactgct acgtttgta
6841 ataacttca taggaatgtt acattagcct tatctgaaca acggataata gatttaaaat
6901 tagaagctag acttaatgct ttagaagaag tagttttaga gttgggacaa gatgtggcca
6961 attaaagac cagaatgccc actaggtgic atgcaaatta tgactttatc tgcgttacac
7021 ctttaccta taatgctact gagaactggg aaagaaccag gqctcattta ttgggcattt
7081 ggaatgataa tgagatttca tataacatac aggagttaac caacctgatt agtgatatga
7141 gcaaaacaaca tattgatgca gtggaccctta gtggcttggc tcagtccttt gccaatggag
7201 tgaaggcttt aaatccatta gattggacac aatatttcat tttataggt gttggagccc
7261 tgcttttagt cattgtactt atgattttcc ccatgtttt ccagtcctt gcgaagagcc
7321 ttgaccaagt qcagtcagat ctaacgtgc ttcttttaa aaagaaaaaa gggggaaatg
7381 ccgcgcctgc agcagaaatg gttgaactcc cgagagtgtc ctacacttag gggagaagca

```

P1(F) →

P2 (F) ←

P3(R) ←

P4 (R) →

- **Primera Reacción:** se utilizaron los oligos reportados como P1 y P4 esperando un fragmento de 660 pares de bases, bajo las siguientes condiciones:
 - Oligo 1(F): 5'- CCT CAC TGC CAG ATC-3'
 - Oligo 4(R): 5'- GAA TCG CTT AGC TCG-3'
 - La PCR se llevó a un volumen final de 30 µl, en donde a cada tubo se le agregaron los siguientes reactivos:

REACTIVO	CONCENTRACIÓN FINAL	VOLUMEN
Buffer	1x	3 µl
dNTPs	10 mM	0.6µl
Oligonucleótido 1	20 pmol	1 µl
Oligonucleótido 4	20 pmol	1 µl
MgCl ₂	1.5mM	0.9µl
<i>Taq</i> polimerasa	1.5 U	0.2 µl
DNA	100 ng	"X" µl
Agua		"X" µl

- Posteriormente los tubos eppendorf se colocaron en un termociclador GeneAmp® PCR System 9700 y se llevo a cabo la PCR bajo las siguientes condiciones:
 - 94° 3'
 - 94° 1.5' | 35 CICLOS
 - 55° 2' |
 - 72° 3' |
 - 72° 10'
 - 4° ∞
- Una vez terminada la reacción de PCR, el producto (2µl) se verificó en geles de agarosa al 2% teñidos con Sybr-Gold incluyendo un marcador de peso molecular en escalera de 1 Kb; se realizó la separación a 90 Volts durante 45 minutos y se tomo la respectiva fotografía en un transiluminador UV Geldoc de BIORAD utilizando el Software Quantity One.

- **Segunda reacción de PCR:** El producto de la primera reacción se purificó y se realizó una PCR con el segundo par de oligonucléotidos (P2 y P3) esperando un fragmento de 250pb, bajo las siguientes condiciones:
 - Oligo P2(F): 5'- TACATCTGCCTGTGTTAC-3'
 - Oligo P3 (R): 5'- ATCTGTGGCATAACCT-3'

- Para la segunda reacción se utilizó 1 μ l del producto de la primera reacción teniendo un volumen final de 30 μ l a cada tubo se le agregó:

REACTIVO	CONCENTRACIÓN FINAL	VOLUMEN
Buffer	1x	3 μ l
dNTPs	10 mM	0.6 μ l
Oligonucleótido 2	20 pmol	1 μ l
Oligonucleótido 4	20 pmol	1 μ l
MgCl ₂	1.5mM	0.9 μ l
Taq polimerasa	1.5 U	0.2 μ l
DNA	100 ng	"X" μ l
Agua		"X" μ l

- Se colocaron en un termociclador Gene Amp® PCR System 9700. En la segunda reacción las condiciones fueron las mismas:

94° 3'
 94° 1.5' |
 55° 2' | 35 CICLOS
 72° 3' |
 72° 10'
 4° ∞

- Al terminar la reacción se verificó el producto de geles de agarosa al 2% para un volumen de 100 ml, la solución se colocó y se dejó polimerizar, se agregó TBE 1x (amortiguador), hasta cubrir el gel y posteriormente se cargaron 2 μ l del producto de PCR mezclada con Sybr-Gold y buffer de carga, con un marcador de peso molecular de 1 Kb, un control positivo (una muestra amplificada con DNA plasmídico) y un control negativo (sin DNA); enseguida se separaron los ácidos nucleicos mediante 90 volts durante 1 hora y posteriormente se tomaron las respectivas fotografías a través de luz UV en un transiluminador Geldoc de BIORAD utilizando el software Quantity One. Por último se verificó la presencia del amplificado del gen *env* del MMTV.

IX. CONSIDERACIONES ÉTICAS

El presente estudio se apegó a los lineamientos éticos contemplados para la investigación en seres humanos de la declaración de Helsinki y de acuerdo al apartado I del artículo 17 en el título segundo del reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, este trabajo se considera con riesgo mínimo. Debido a que se utilizaron muestras de tejido criopreservadas en el banco de tejido de cáncer de mama de la UIM en Genética Humana del Hospital de Pediatría Centro Médico Nacional Siglo XXI de mujeres procedentes del Hospital de Oncología de Centro Médico S.XXI, Hospital de la Mujer y Hospital Juárez de México a cargo del Dr. Diego J. Arenas Aranda.

Se asegura que las pacientes no serán identificadas en las presentaciones o publicaciones que deriven de este estudio y que sus datos serán manejados en forma confidencial. Todo lo anterior se plasmó en el consentimiento informado (Anexo II).

X. RESULTADOS

A Continuación se muestra en la siguiente tabla los datos correspondientes a las concentraciones del DNA genómico de los tumores y los tejidos adyacentes no afectados en nanogramos/microlitros, así como la pureza (espectro 260/280).

Tabla. Cuantificación de DNA. Concentraciones obtenidas en ng/μl y cocientes de pureza 260/280

Número	Muestra	[ng/μl]	260/280	Número	Muestra	[ng/μl]	260/280
1	1909T	13.7	1.88	27	4009T	22.7	1.95
2	1909A	12.3	1.79	28	4009A	10.2	1.76
3	2109T	7.7	1.67	29	5110T	24.4	1.80
4	2109A	14.9	1.57	30	5110A	13.2	1.57
5	3209T	9.4	1.92	31	T6T	68.9	1.94
6	3209A	14.3	1.76	32	T6A	16.1	1.78
7	T3T	12.4	1.73	33	3109T	40.8	1.92
8	T3A	46.9	1.96	34	3109A	8.4	1.94
9	T4T	17.6	1.90	35	3409T	76.7	1.82
10	T4A	45.1	1.89	36	3409A	30.1	1.76
11	0109T*	149.2	1.99	37	3509T	74.1	1.84
12	0109A*	234.6	2.0	38	3509A	21.4	1.80
13	1209T	27.5	1.90	39	4609T	140.8	1.90
14	1209A	14.8	1.70	40	4609A	16.2	1.62
15	1309T	21.8	1.74	41	RSGT	25.1	2.04
16	1309A	10.6	1.82	42	RSGA	37.2	1.92
17	2009T	41.5	1.81	43	CLGT	82.1	1.91
18	2009A	22.9	1.77	44	CLGA	16.3	1.79
19	2809T	38.1	1.82	45	RHFT	42.1	1.84
20	2809A	11.2	1.62	46	RHFA	55.0	1.84
21	2909T	72.5	1.87	47	CPCT	45.7	1.85
22	2909A	15.5	1.80	48	CPCA	16.8	1.67
23	3609T(13)	34.0	1.83	49	AGM T	33.0	1.91
24	3609A(13)	18.1	1.65	50	AGM A	10.7	1.68
25	3909T	21.7	1.90	51	LVC T	14.3	1.62
26	3909A	8.3	1.70	52	LVC A	116.4	1.86

*Muestras extraídas manualmente con kit de Qiagen * [ng/μl]: concentración en nanogramos/microlitros

Electroforesis en gel de agarosa de DNA genómico

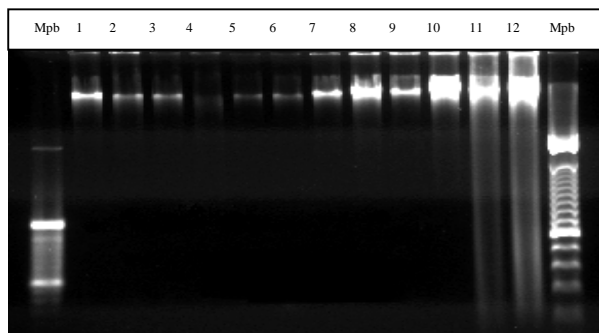


Fig. 4

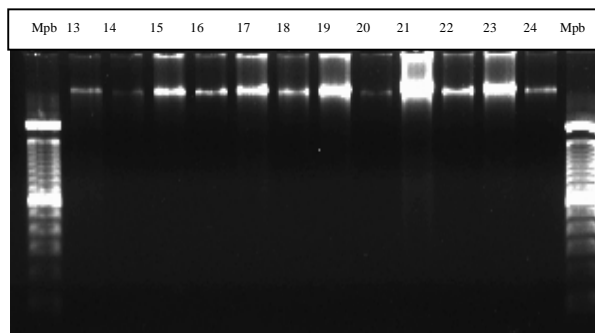


Fig. 5

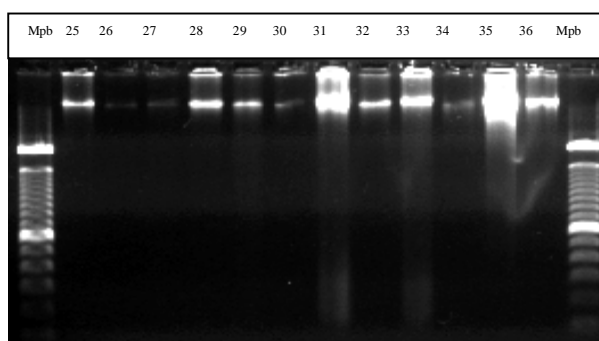


Fig. 6

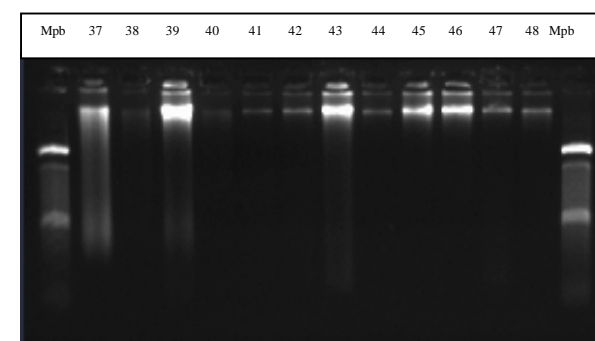


Fig. 7

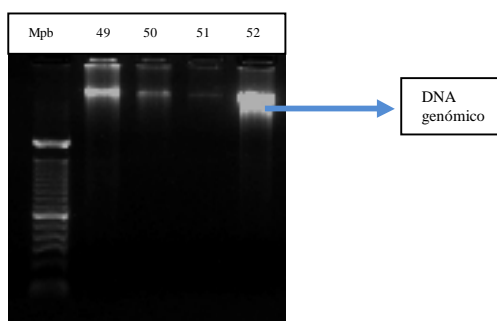


Fig. 8

Fig. 4-8. Electroforesis de geles de agarosa al 1% para mostrar integridad de DNA genómico. Mpb: marcador de 100 pares de bases. Muestras 1-52.

Electroforesis en gel de agarosa de la PCR del exón 5 del gen *NPHS2* (control interno) 201pb

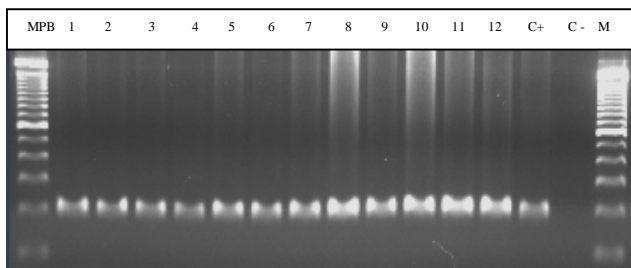


Fig. 9

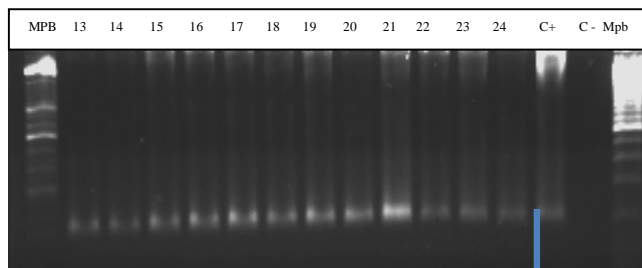


Fig. 10

201pb

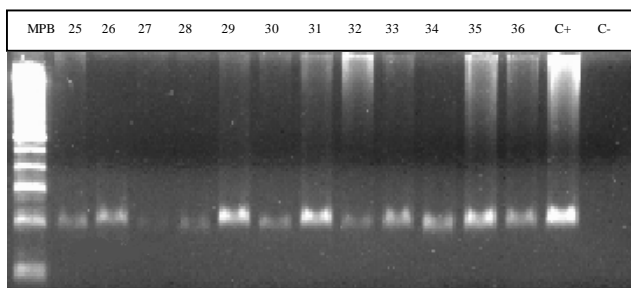


Fig. 11

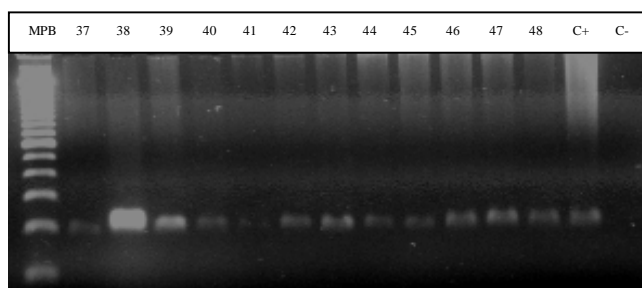


Fig. 12

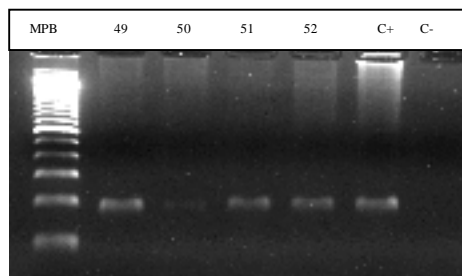


Fig. 13

Fig. 9-13. Electroforesis de gels de agarosa al 2% del producto de PCR del exón 5 de *NHPS2* utilizado como control interno para mostrar calidad del DNA genómico para amplificación. Mpb. Marcador de 100 pares de bases. Muestras 1-52.

Electroforesis en gel de agarosa de PCR de un fragmento del gen *env* de MMTV

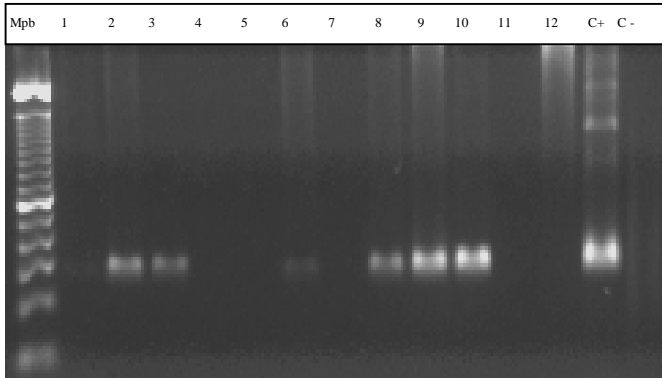


Fig. 14(a)

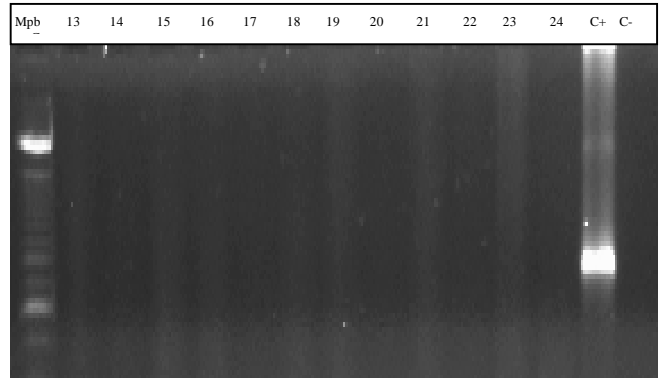


Fig. 15(a)

Figura 14 (a) y 15 (a) Electroforesis en gel del agarosa al 2% del Producto de PCR 1 de un fragmento de 660 pb del gen *env* de MMTV. Fig 14(a) muestras 1-12. Fig 15(a). Muestras 13-24. Mpb: marcador de 100 pares de bases.

C+: control positivo (DNA plasmidico) C -: control negativo (ausencia de DNA)

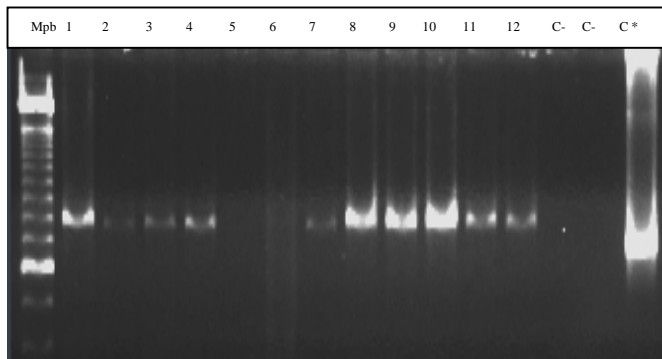


Fig. 14(b)

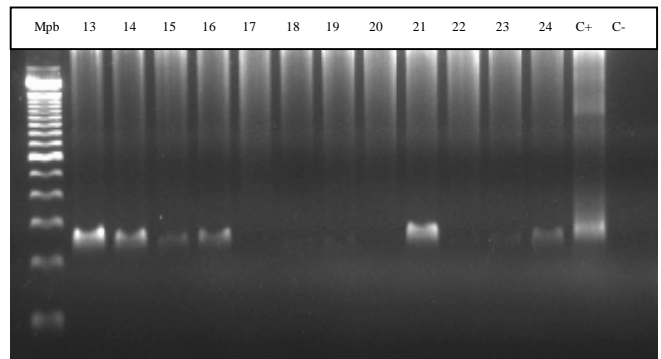


Fig. 15 (b)

Figura 14 (b) y 15(b) Electroforesis en gel del agarosa al 2% del Producto de PCR anidada de un fragmento de 250 pb del gen *env* de MMTV. Fig 14(b): muestras 1-12. Fig 15(b): muestras 13-24. Mpb: marcador de 100 pares de bases.

C+: control positivo (DNA plasmidico) C -: control negativo (ausencia de DNA)

Electroforesis en gel de agarosa de PCR de un fragmento del gen *env* de MMTV

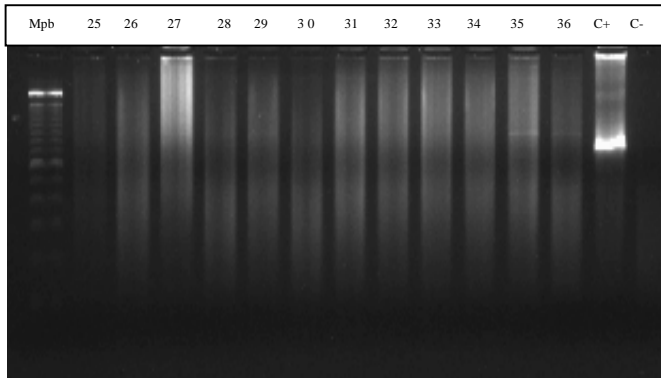


Fig. 16(a)

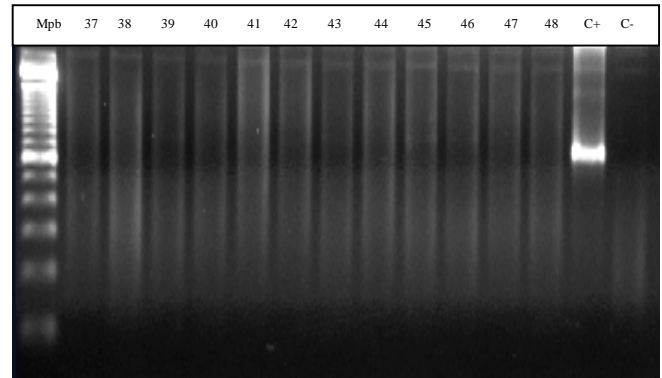


Fig. 17(a)

Figura 16 (a) y 17 (a) Electroforesis en gel del agarosa al 2% del Producto de PCR 1 de un fragmento de 660 pb del gen *env* de MMTV. Fig 16(a) muestras 25- 36. Fig 17(a). muestras 37-48. Mpb: marcador de 100 pares de bases. C+: control positivo (DNA plasmídico) C -: control negativo (ausencia de DNA)

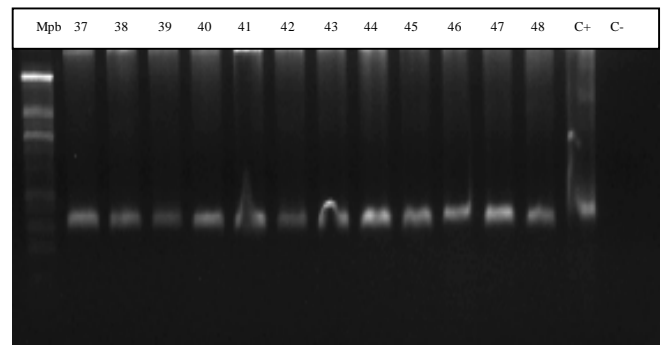
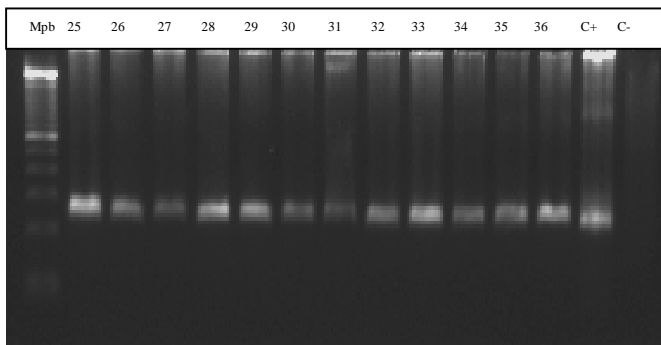


Fig. 16(b)

Figura 16 (b) y 17 (b) Electroforesis en gel del agarosa al 2% del Producto de PCR anidada de un fragmento de 250 pb del gen *env* de MMTV. Fig 16(b): muestras 25-36. Fig 17(b): muestras 37-48. Mpb: marcador de 100 pares de bases. C+: control positivo (DNA plasmídico) C -: control negativo (ausencia de DNA)

Electroforesis en gel de agarosa de PCR de un fragmento del gen *env* de MMTV

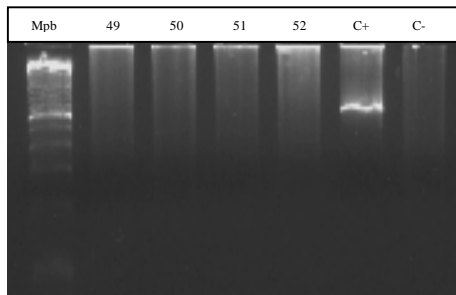


Figura 18(a) Electroforesis en gel del agarosa al 2% del Producto de PCR 1 de un fragmento de 660 pb del gen *env* de MMTV. Muestras 49-52

Mpb: marcador de 100 pares de bases.

C+: control positivo (DNA plasmídico)

C -: control negativo (ausencia de DNA)

Fig. 18(a)

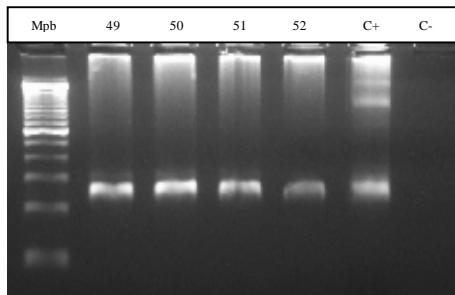


Figura 18(b) Electroforesis en gel del agarosa al 2% del Producto de PCR anidada de un fragmento de 250 pb del gen *env* de MMTV. Muestras 49-52

Mpb: marcador de 100 pares de bases.

C+: control positivo (DNA plasmídico)

C -: control negativo (ausencia de DNA)

Fig. 18(b)

ANÁLISIS DE RESULTADOS

Se obtuvieron muestras pareadas de 26 pacientes consistentes en tejido mamario tumoral y su correspondiente tejido mamario adyacente no afectado (n=52). La mediana de edad de las pacientes fue 50 años, la mayoría proveniente del DF. El tipo histológico más frecuente fue el carcinoma ductal en 76.9%, en cuanto al estadio clínico el más frecuentemente observado fue el IIIA (26.9%), seguido del IIB (23.1%). El 84.6% de las pacientes presentó lactancia positiva, el 19.2 % de las pacientes contaba con antecedentes de cáncer de mama familiar. Por otro lado el 30.8% de las pacientes refería tabaquismo y el 15.4% alcoholismo. El 38.5% de las pacientes contaba con Receptores de estrógenos positivos, y 30.8% con Receptores de Progesterona positivos, la sobreexpresión de HER2/*neu* se encontró en 7.7% de las pacientes.

En la Gráfica 1 se observa que las muestras de tejido mamario tumoral que fueron positivas para la secuencia del gen *env* de MMTV en la PCR1 se encontraron con mayor frecuencia en el estadio clínico IIB (n=3,30%), seguido del IIA y IIIA (ambos con 20%). No obstante, las pacientes con resultado negativo para la secuencia viral en la PCR1 su estadio clínico más frecuente fue IIIA (n=5,31.3%), seguido del IIIB (n=4, 25%).

En la Gráfica 2 se observa que en la PCR anidada del tejido tumoral se encontró la secuencia del gen *env* de MMTV con mayor frecuencia en los estadios clínicos IIB (n=6,25%) y IIIA (n=6, 25%), seguidos del IIA (n=5, 20.8%) No obstante, las pacientes con resultados negativos para la secuencia viral su estadio clínico fue IIIA (50%) y un tumor del estadio clínico IIIB (50%).

En la Gráfica 3 se observa que las muestras de tejido mamario adyacente no afectado que fueron positivas para la secuencia del gen *env* de MMTV se encontraron con mayor frecuencia en el estadio clínico IIB (n=3, 33.3%), seguido del IIIB (n=2, 22.2%), llama la atención que ninguna paciente en estadio clínico IIIA fue positiva para la secuencia viral en esta primera PCR (n=7, 41.2%), y tampoco 4 del estadio clínico IIA presentaron la secuencia del virus. (n=4, 23.5%).

En la Gráfica 4 se observa que en la PCR anidada del tejido mamario adyacente no afectado se encontró la secuencia del gen *env* de MMTV con mayor frecuencia en el estadio clínico

IIIA (n=7, 28%), seguido del IIB (n=6, 24%) y IIA (n=5, 20%), encontrándose únicamente una paciente correspondiente al estadio clínico IIIB sin la secuencia viral.

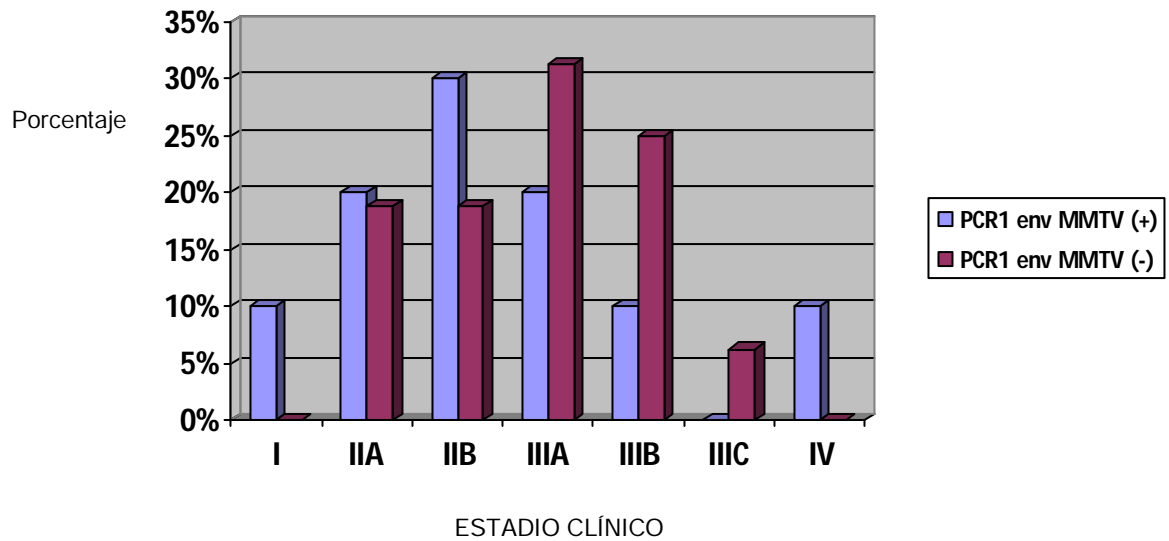
En la Tabla R1 se observa que en el tejido tumoral mediante la PCR1, del total de mujeres que dieron lactancia el 39.1% resultaron positivas para la secuencia del gen *env* de MMTV, aquellas pacientes con antecedente de cáncer de mama familiar presentaron positividad en 33.3%, de las mujeres que fumaron el 62.5% fue positiva, de las que consumieron alcohol 50% tenían la secuencia y de las que se contaban con Receptores de estrógenos y progesterona positivos se encontró la secuencia en 20 y 12.5% respectivamente. Por otro lado de las pacientes que sobreexpresaron *HER2/neu* el 50% fue positiva en la PCR1. Cabe señalar que de las pacientes que tuvieron Receptores de Progesterona positivos el 87.5% no mostró la secuencia viral en la PCR1; sin embargo, no se obtuvieron valores significativamente estadísticos.

En la Tabla 2R se aprecia que en el tejido tumoral mediante la PCR anidada, del total de mujeres que dieron lactancia el 91.3% resultaron positivas para la secuencia del gen *env* de MMTV, las pacientes con antecedente de cáncer de mama familiar el 83.3% tuvo la secuencia viral, de las que presentaban tabaquismo el 87.5% fue positiva, de las que consumieron alcohol el 100% tenían la secuencia y de las que se contaban con Receptores de estrógenos y progesterona positivos se encontró la secuencia en 80 y 75% respectivamente. De las pacientes que sobreexpresaron *HER2/neu* el 50% fue positiva para la secuencia viral en la PCR anidada. No obstante los resultados no fueron significativamente estadísticos.

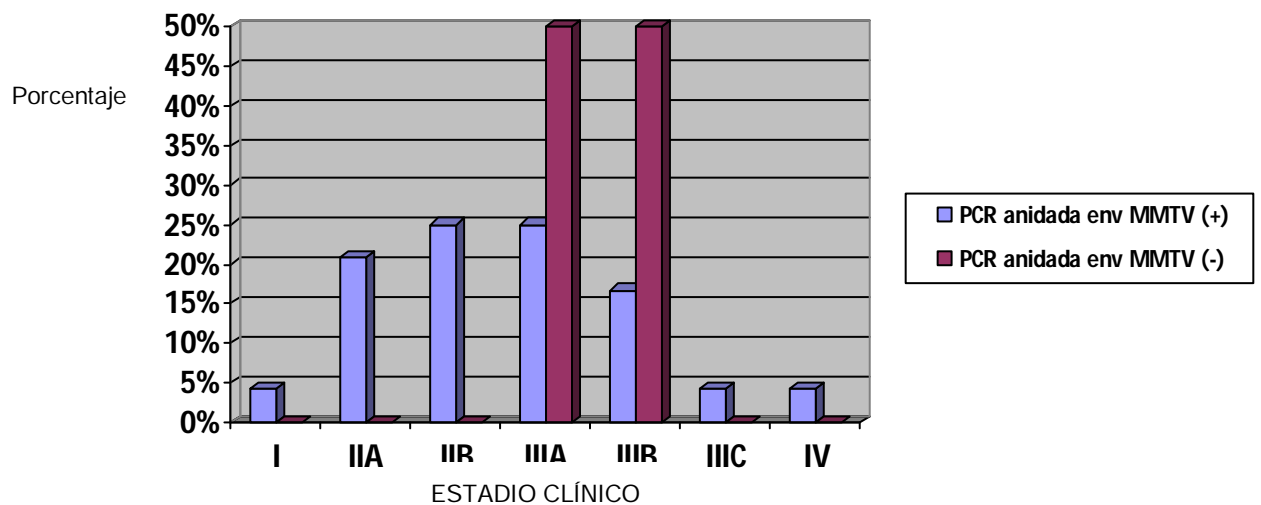
En la Tabla 3R se observa que en el tejido mamario adyacente no afectado mediante la PCR1, del total de mujeres que dieron lactancia el 100% resultaron positivas para la secuencia del gen *env* de MMTV, aquellas pacientes con antecedente de cáncer de mama familiar presentaron positividad en 33.3%, de las mujeres que fumaron el 50% fue positiva, de las que consumieron alcohol 25% tenían la secuencia y de las que se contaban con Receptores de estrógenos y progesterona positivos se encontró la secuencia en 40 y 37.5% respectivamente. Por otro lado de las pacientes que sobreexpresaron *HER2/neu* el 50% fue positiva en la PCR1. Sin embargo, los resultados obtenidos tuvieron valores significativamente estadísticos.

Por último en la Tabla 4R se observa que de todos los casos de mujeres con tabaquismo, consumo de alcohol, positividad de Receptores de estrógenos y progesterona así como con sobreexpresión de *HER2/neu* cuando se evaluó el tejido mamario adyacente no afectado mediante PCR anidada el 100% mostraron la secuencia viral del gen *env* de MMTV. Por otro lado el 91.3% de las que dieron lactancia resultó positiva y en el 83.3% de las que tenían antecedente de cáncer de mama familiar se encontró la secuencia viral.

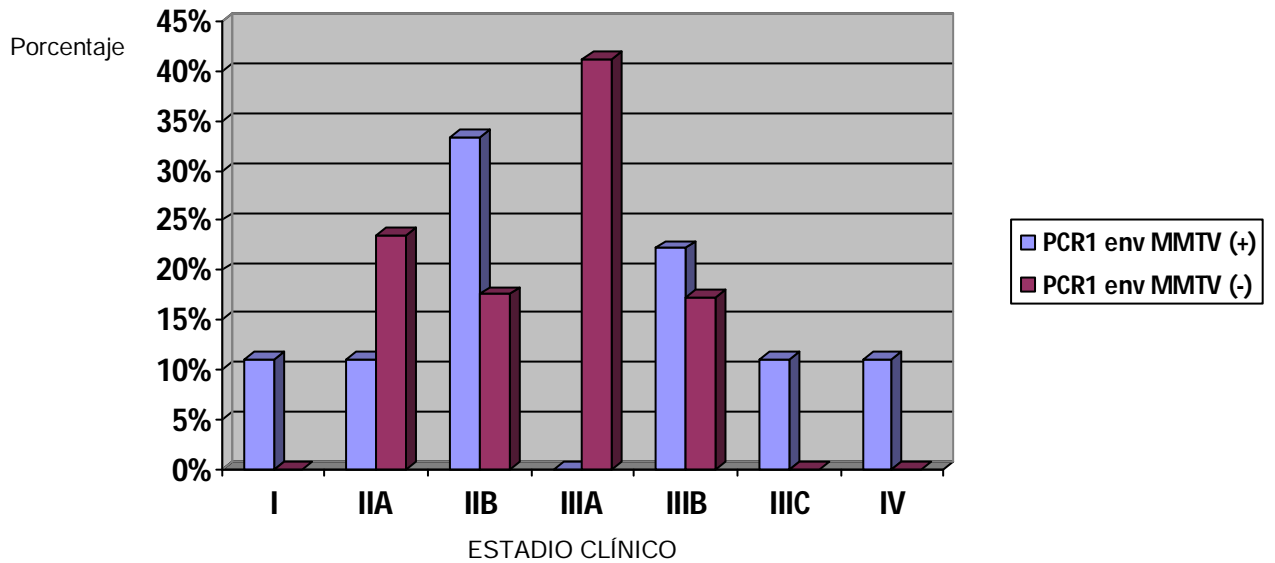
Gráfica 1. Relación de la presencia/ausencia del gen *env* de MMTV en la PCR1 y el estadio clínico en el Tejido mamario tumoral



Gráfica 2. Relación de la presencia/ausencia del gen *env* de MMTV en la PCR anidada y el estadio clínico en el tejido mamario tumoral



Gráfica 3. Relación de la presencia/ausencia del gen *env* de MMTV en la PCR1 y el estadio clínico en el tejido mamario no afectado adyacente.



Gráfica 4. Relación de la presencia/ausencia del gen *env* de MMTV en la PCR anidada y el estadio clínico en el tejido mamario no afectado adyacente.

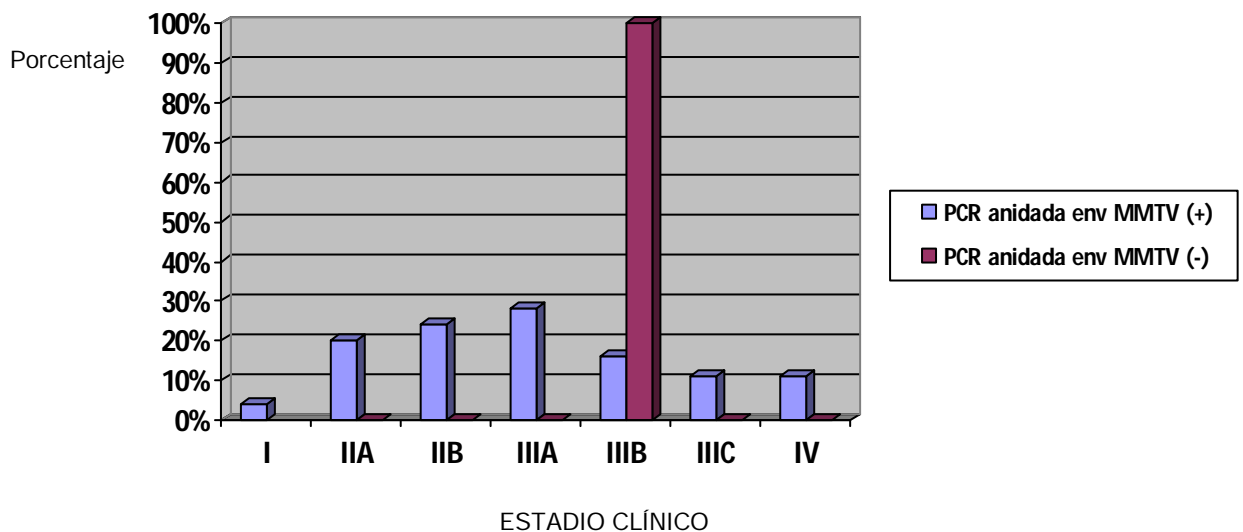


Tabla 1R. Relación de variables con la presencia/ausencia del gen *env* de MMTV en PCR de tejido mamario tumoral

Variable	Tejido tumoral				
	PCR1 (+)	%	PCR1 (-)	%	p
Lactancia	9	39.1	14	60.9	1
Antecedente de cáncer de mama familiar	2	33.3	4	66.7	1
Tabaquismo	5	62.5	3	37.5	.189
Alcoholismo	2	50	2	50	.625
Receptor estrógenos	2	20	8	80	.604
Receptor progesterona	1	12.5	7	87.5	.569
HER2/ <i>neu</i>	1	50	1	50	1

Tabla 2R. Relación de variables con la presencia/ausencia del gen *env* de MMTV en PCR anidada de tejido mamario tumoral

Variable	Tejido tumoral				
	PCRA (+)	%	PCRA (-)	%	p
Lactancia	21	91.3	2	8.7	1
Antecedente de cáncer de mama familiar	5	83.3	1	16.7	.415
Tabaquismo	7	87.5	1	12.5	.529
Alcoholismo	4	100	0	0	1
Receptor estrógenos	8	80	2	20	.500
Receptor progesterona	6	75	2	25	.467
HER2/ <i>neu</i>	1	50	1	50	.200

Tabla 3R Relación de variables con la presencia/ausencia del gen *env* de MMTV en PCR de tejido mamario adyacente no afectado

Variable	Tejido adyacente				
	PCR1 (+)	%	PCR1 (-)	%	p
Lactancia	23	100	0	0	1
Antecedente de cáncer de mama familiar	2	33.3	4	66.7	1
Tabaquismo	4	50	4	50	.382
Alcoholismo	1	25	3	75	1
Receptor estrógenos	4	40	6	60	1
Receptor progesterona	3	37.5	5	62.5	1
HER2/ <i>neu</i>	1	50	1	50	1

Tabla 4R Relación de variables con la presencia/ausencia del gen *env* de MMTV en PCR anidada de tejido mamario adyacente no afectado

Variable	Tejido adyacente				
	PCRA (+)	%	PCRA (-)	%	p
Lactancia	21	91.3	2	8.7	1
Antecedente de cáncer de mama familiar	5	83.3	1	16.7	.231
Tabaquismo	8	100	0	0	1
Alcoholismo	4	100	0	0	1
Receptor estrógenos	10	100	0	0	-
Receptor progesterona	8	100	0	0	-
HER2/ <i>neu</i>	2	100	0	0	-

XI. DISCUSIÓN

El cáncer de mama es una entidad heterogénea, la mayor parte de los casos son de etiología desconocida, en la que existen varios factores de susceptibilidad y se han propuesto algunos factores ambientales. La asociación positiva entre el MMTV y el cáncer de mama humano es altamente controversial y ha sido un debate que ha durado aproximadamente 60 años. Solamente algunos grupos (Pogo, 2003) han sido capaces de reproducir las observaciones moleculares originales de MMTV en el DNA de los cánceres de mama en humanos, mientras que otros no han podido reproducir estos resultados (Witt, 2003). Esto posiblemente tenga una explicación racional como variaciones en la metodología y tecnología empleadas, diferencias en la susceptibilidad a las infecciones y al cáncer en los diversos grupos de poblaciones (Ford, 2003); así como en la distribución geográfica de algún agente etiológico o vector (mayor incidencia donde existe la presencia de *M.domesticus*).

En el presente estudio se detectó una secuencia del gen *env* de MMTV en biopsias de tejido mamario tumoral en 92% y en el tejido adyacente no afectado en 96% mediante PCR anidada. En contraste, investigaciones previas han reportado positividad en 30 a 40% de los tejidos tumorales y no se había encontrado que los tejidos sanos adyacentes tuvieran la secuencia viral o como máximo 0.8-1% (Holland, 1995). Se ha descartado la contaminación de las muestras desde el proceso de extracción, hasta su manipulación para la realización de la PCR, como se demuestra por los blancos sin amplificación de la secuencia viral. (Figuras 13-17 a, b) pensando que se pudiera tratar de casos de contaminación cruzada. Sin embargo, es importante señalar que al momento de obtener las biopsias no existe alguna medida macroscópica para minimizar tanto el número normal de células en las muestras de tejido tumoral como asegurar que las muestras de tejido no afectado se encuentren libres de células tumorales contaminantes.

Considerando estudios previos en los que se han reportado positividad de hasta 74%, se menciona que los casos de cáncer inflamatorio son aquellos en los que más

se presenta la secuencia viral (Hachana, 2008); no obstante, la mayoría de nuestros casos se trataron de carcinoma ductal y no se recabó ninguna muestra de cáncer de mama inflamatorio que pudieran explicar los resultados.

La secuencia de 660pb del gen *env* (de envoltura de MMTV) aparentemente no tiene homología con ninguna secuencia humana reportada en GenBank. Pese a que se ha encontrado una estructura proviral con 95% de homología al MMTV determinada MMTV-like (HMTV) por lo que no podemos descartar que nuestros resultados se traten de HERV's, especialmente HERV-K10y HERV-K-T47D (Voisset C, 2008). Para determinar lo anterior es necesario realizar estudios de biología molecular más sensibles y específicos como la secuenciación. También se puede disponer de PCR múltiple para investigar la presencia de varias secuencias del genoma del MMTV al mismo tiempo, o bien mediante estudios de expresión como RT-PCR y Western blot para observar la presencia de transcritos y proteínas virales. Así mismo podría identificarse a nivel tisular mediante inmunohistoquímica con el uso de algún marcador antigénico característico.

En cuanto a la relación propuesta por Ford sobre grado de malignidad de la neoplasia y la positividad para la secuencia del gen *env*; en nuestro estudio encontramos que la secuencia viral se encuentra en el tejido mamario tumoral con mayor frecuencia en el estadio clínico IIB y IIIA, seguidos del IIA. Mientras que la secuencia viral en el tejido mamario no afectado adyacente se encontró con mayor frecuencia en el estadio clínico IIIA. Sin embargo, no contamos con un número similar de biopsias de cada estadio clínico que nos permitan determinar la relación genotipo-fenotipo esperada.

Por otro lado a pesar de que nuestros resultados no fueron significativamente estadísticos se ha hecho una correlación entre la presencia de las secuencias MMTV-like y la negatividad de los receptores de progesterona, la cual sugiere un fenotipo agresivo en los tumores asociados a MMTV (Faedo, 2004).

En relación a HER2/*neu* se ha hecho una correlación negativa entre la presencia de las secuencias de MMTV y la sobreexpresión de HER2/*neu*. Únicamente dos estudios han investigado dicha correlación.

Es importante señalar que no existen reportes de frecuencia de la presencia de MMTV en tejido mamario no afectado (sin neoplasia) obtenido por causas diferentes a cáncer de mama, ya que no se considera ético; pero podría ser posible realizarlos en tejido mamario procedente de mamoplastias de reducción o cirugías plásticas en mujeres mexicanas; así como identificar y conocer la frecuencia de ratones de la especie *Mus domesticus* con la infección en nuestro país, considerando una zoonosis en la que mediante un mecanismo de exposición directa a los ratones de casa o bien la presencia a niveles industriales de alimentos de consumo humano contaminados con secreciones de esta especie de murinos, podría explicar la alta prevalencia del cáncer de mama y de ser comprobado es factible de ser controlado mediante medidas de salud pública como el control de plagas o creación de vacunas. Así mismo de comprobarse la presencia del MMTV como factor etiológico una vez conociendo los sitios de inserción en el genoma humano generar blancos terapéuticos o incluso iniciar experimentos con terapia antirretroviral.

LIMITACIONES

En el presente estudio inicialmente estaba contemplado estudiar muestras pareadas de 55 pacientes, es decir, tejido tumoral y su tejido adyacente no afectado; sin embargo no fue posible completar la muestra y tampoco fue posible contar con el mismo número de muestras para cada estadio clínico. Cabe mencionar que la técnica de biología molecular fue la misma empleada por otros laboratorios; sin embargo, es únicamente cualitativa.

XII. CONCLUSIONES

La frecuencia de positividad de la presencia del gen *env* de MMTV mediante PCR anidada en muestras de tejido tumoral es mayor a la reportada mundialmente; así mismo en el tejido adyacente se encontró una alta positividad, la cual no se había reportado previamente; sin embargo, como se mencionó en las limitaciones el tamaño de la muestra no es lo suficientemente grande, por lo que será necesario ampliar el tamaño de ésta y realizar mediante otros métodos de biología molecular que tengan mayor sensibilidad y especificidad la confirmación de la presencia del MMTV y descartar de este modo que se traten de retrovirus endógenos o casos de contaminación cruzada.

En caso de comprobarse la identidad de MMTV habrá que considerar una posible etiología que pudiera explicar estos resultados como la hipótesis propuesta que sugiere que el virus es transmitido exógenamente del ratón a los humanos (Stewart TH, 2000) por una susceptibilidad a la infección o una prevalencia mayor del ratón *mus domesticus* en la población mexicana, mediante un mecanismo de exposición directa a los ratones de casa o bien la presencia de alimentos de consumo humano contaminados con secreciones de los mismos, la cual que a niveles industriales podría explicar la alta prevalencia del cáncer de mama y de ser comprobado es factible de ser controlado mediante medidas de salud pública, así mismo de comprobarse la presencia del MMTV como factor etiológico al ser este un retrovirus una vez conociendo los sitios de inserción en el genoma humano generar blancos terapéuticos o incluso iniciar estudios experimentales con terapia antirretroviral.

XIII. ANEXOS

ANEXO I



INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
DIRECCIÓN DE PRESTACIONES MÉDICAS
UNIDAD DE EDUCACIÓN, INVESTIGACIÓN Y POLÍTICAS DE SALUD
COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN EN SALUD

COMISIÓN NACIONAL DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA

Ref. 09-B5-61-2800/018

Enero 11, 2008

DOCTOR FRANCISCO JAVIER TORRES LÓPEZ

Jefe de la Unidad de Investigación Médica
en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias
Unidad Médica de Alta Especialidad
Hospital de Pediatría
Centro Médico Nacional Siglo XXI

Informo a usted que el proyecto titulado: **“Infección, inflamación y cáncer; estudio para el desarrollo de pruebas de diagnóstico y la identificación de biomarcadores de riesgo, pronóstico y prevención”**, fue sometido nuevamente 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: **2008-785-001**.

De acuerdo a la normatividad institucional vigente, deberá informar a esta Comisión en los meses de junio y diciembre de cada año, acerca del desarrollo del proyecto a su cargo.

Atentamente

DOCTORA DOLORES MINO LEÓN

Secretario Ejecutivo
Comisión Nacional de Investigación Científica

Con copia:

- Doctor Hermilo de la Cruz Yáñez, Director de la Unidad Médica de Alta Especialidad, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI
- Doctor Miguel Ángel Villasís Keever, Director de Educación e Investigación en Salud, Unidad Médica de Alta Especialidad, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI

DML'brs

IMSS

SEGURIDAD Y SOLIDARIDAD SOCIAL

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





CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA EL PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN:

“Infección, inflamación y cáncer; Estudio para el desarrollo de pruebas de diagnóstico y la identificación de biomarcadores de riesgo, pronóstico y prevención”

1. Información sobre el estudio.

Se me ha invitado a participar en un estudio de investigación, éste involucra a persona 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 se pretende 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 un gen del retrovirus MMTV, así como crear un banco de tejidos en el que se almacenaran hasta por 5 años para efectuar estudios genéticos o genómicos más profundos posteriores relacionados con el protocolo.

2. Procedimiento.

Se tomaran 6 ml de sangre periférica antes del procedimiento quirúrgico. 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. Beneficio.

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.

4. Participación.

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.

6. Consentimiento.

El Dr. Diego Julio Arenas Aranda, investigador responsable del proyecto, y la Dra. Mariana Rives Güendulain 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 56276941 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: _____

XIV. BIBLIOGRAFIA

- Aceves, E. *Boletín Trimestral*. México: Johnson & Johnson Medical México. (2003).
- Antoniou AC, Easton DF. Models of genetic susceptibility to breast cancer. *Oncogene* (2006) 25: 5898-5905.
- Arraztoa. *La mama, diagnóstico y tratamiento*. Chile: Editorial Mediterráneo. (2004).
- Barbulescu M, TG. Many humans endogenous retrovirus K (HERV-K) proviruses are unique to humans. *Current Biology*, (1999); 6: 861-8.
- Bernstein JL, Haile RW, Stovall M, Boice JD Jr et al. Radiation exposure, the ATM Gene, and contralateral Breast Cancer in the Women's Environmental Cancer and Radiation Epidemiology Study. *J Natl Cancer Inst* (2010); 102, (7): 475-483.
- Boyle P, LB. *World Cancer Report*. Obtenido de World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, Lyon. (2008).
- Brandan ME, V. N. Detección de cáncer de mama: Estado de la mamografía en México. *Cancerología*, (2006);1: 147-162.
- C, B. HTLV-1 infections. *Journal of Clinical Pathology*. (2000); 53: 581-6.
- Callahan R, Smith GH. Common Integration Sites for MMTV in viral Induced Mouse Mammary Tumours. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, (2008); 13: 309-321.
- Damin A, KR. Evidence for an association of human papillomavirus and breast carcinomas. *Breast Cancer Research Treatment*, (2004); 84(2): 131-7.
- De Villiers E, S. RH. Presence of papillomavirus sequences in condylomatous lesions of the mamillae and invasive carcinoma of the breast. *Breast Cancer Research*, (2005);7: 1-11.
- Faedo M, Ford CE, Mehta R, Blazek K, Rawlinson. Mouse mammary tumor-like virus is associated with p53 nuclear accumulation and progesterone receptor positivity but not estrogen positivity in human female breast cancer. *Clin Cancer Res* (2004);10: 4417-4419.
- Ford CE, Tran D, Deng YM, Ta VT, Rawlinson WD, Lawson JS. Mouse mammary tumor virus-like gene sequences in breast tumors of Australian and Vietnamese women. *Clin Cancer Res* (2003); 9: 1118-1120.
- Hachana M, Trimeche M, Ziadi S, Amara K, Gaddas N, Mokni M. Prevalence and characteristics of the MMTV-like associated breast carcinomas in Tunisia. *Cancer Letters* (2008); 271: 222-230.
- Herrera P, V. P. Papel del gen TP53 en la oncogénesis. *Salud UIS*, (2004); 36: 88-89.

- INEGI. (2008). Obtenido de www.inegi.org.mx.
- Holland JF, Pogo BG. Mouse mammary virus-like viral infection and human breast cancer. *Clin Cancer Res* (1995); 55: 5173-5179.
- IK. Retroviruses in breast cancer. A challenge for future research. *Woman & cancer*.(1998);1-7.
- Iscovich J, B. F. Classic Kaposi Sarcoma: epidemiology and risk factors. *Cancer*. (2000); 88: 500-17.
- Knaul F, LR. *El cáncer de mama en México: cifras para la toma de decisiones*. México: Observatorio de la Salud. (2008).
- Knaul FM, NG. Breast Cancer in Mexico: A Pressing Priority. *Reprod Health Matter* . (2009); 16 (32):113-123.
- Levine PH, Pogo BP *et al*. Increasing evidence for a human breast carcinoma virus with geographic patterns. *Cancer* . (2004);1:721-726.
- Lozano R, KF. Tendencias en la mortalidad por cáncer de mama en México, 1979-2006. *Observatorio de la Salud. Competitividad y Salud, Fundación Mexicana para la Salud*. (2008).
- Lynch HT, Silva E, Snyder C, Lynch JF. Hereditary breast cancer: part I. Diagnosing hereditary breast cancer syndromes. *Breast J* (2008); 14: 3-13.
- MacLennan M, M. W. Role of dietary fatty acids in mammary gland development and breast cancer. *Breast Cancer Research*. (2010); 12:211.
- Mant C, G. C. 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* , (2004); 393-404.
- Mant C, HS. A viral etiology for breast cancer: time to re-examine the postulate. *Intervirology*, (2004); 47: 2-13.
- Moelans CB, Weger RA, Ezendam C, van Diest PJ. HER-2/neu amplification testing in breast cancer by Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification: influence of manual- and laser microdissection. *BMC Cancer* (2009); 9(4).
- National Cancer Institute. (2007) Obtenido de www.cancer.gov
- NCBI. Obtenido de National Center for Biotechnology Information: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Pogo BGT, Holland JF. Human tumor viruses and breast cancer. *J Womens's Cancer* (2003); 4: 141-147.

- Rizvi TA, Ali J, Phillip PS, Ghazawi a A, Jayanth P, Mustafa F. Role of a heterologous retroviral transport element in the development of genetic complementation assay for mouse mammary tumor virus (MMTV) replication. *Virology* (2009); 385:464–472.
- Romero FM, SA. Frecuencia de factores de riesgo de cáncer de mama. *Ginecología y Obstetricia Mexicana*. (2008);72(11): 667-672.
- Ross, SR. Mouse Mammary Tumour Virus molecular Biology and Oncogenesis. *Viruses* (2010); 2(9):2000-2012.
- Royds JA, Iacopetta B. p53 and disease: when the guardian angel fails. *Cell Death Differ* (2006);13:1017-1026.
- Sánchez CR, S. B. Cáncer de mama. Modalidades terapéuticas y marcadores. *Cuad Cir*. (2008); 22: 56-63.
- StewartT, S. R. Breast cancer incidence highest in the range of one species of house mouse, *Mus domesticus*. *British Journal of Cancer*. (2000);82: 445-51.
- Theodoru V, K. M. MMTV insertional mutagenesis identifies genes, gene families and pathways involved ion mammary cancer. *Nature genetics*. (2007); 759-69.
- Thiantanawat A, Long BJ, Brodie AM. Signaling pathways of apoptosis activated by aromatase inhibitors and antiestrogens. *Cancer Res* (2003); 63: 8037-8050.
- Voisset C, Weiss RA, Griffiths DJ. Human RNA "Rumor" Viruses: the search for novel Human Retroviruses in Chornic Disease. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* (2008); 72 (1): 157-196.
- Young L, R. A. Eipstein-Barr virus: 40 years on. *Nature Review Cancer*, (2004); 4: 757-68.
- Zamora P, E. E. Cáncer de mama. Clasificación y concepto. *Medicine*. (2001); 8(57): 3041-49.
- Zapata BP. Virus del tumor mamario murino y su relación con el cáncer de mama. *Medicina Universitaria* . (2006); 8(30): 30-43.
- Zapata P, S. S. Mouse mammary tumour virus-like gene sequences in breast cancer samples of Mexican women. *Intervirolgy* . (2007); 50(6): 402-7.
- Zhang S, Liu S, Al-Salsem L. E2F-1: a proliferative marker of breast neoplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* (2000); 9: 395-401.