



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE MEDICINA
BIOMEDICINA

**ESTUDIO DE MUTAGÉNESIS INSERCIONAL DEL RETROVIRUS
MMTV/HMTV EN CÁNCER DE MAMA DE MUJERES MEXICANAS**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

ALBERTO CEDRO TANDA

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. DIEGO JULIO ARENAS ARANDA
FACULTAD DE MEDICINA

COMITÉ TUTOR: DRA. LETICIA MORENO FIERROS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
DR. ALEJANDRO MANUEL GARCIA CARRANCÁ
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS

MÉXICO, D.F. MAYO DE 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE MEDICINA
BIOMEDICINA

**ESTUDIO DE MUTAGÉNESIS INSERCIONAL DEL RETROVIRUS
MMTV/HMTV EN CÁNCER DE MAMA DE MUJERES MEXICANAS**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

ALBERTO CEDRO TANDA

TUTOR(A) PRINCIPAL DE TESIS: DR. DIEGO JULIO ARENAS ARANDA
FACULTAD DE MEDICINA

COMITÉ TUTOR:

DRA. LETICIA MORENO FIERROS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
DR. ALEJANDRO MANUEL GARCIA CARRANCÁ
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS

MÉXICO, D.F. MAYO DE 2014



Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 17 de febrero de 2014, aprobó el jurado para la presentación de su examen para obtener el de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del alumno **CEDRO TANDA ALBERTO** con número de cuenta **407070248**, con la tesis titulada **“ESTUDIO DE MUTAGÉNESIS INSERCIONAL DEL RETROVIRUS MMTV/HMTV EN CÁNCER DE MAMA DE MUJERES MEXICANAS”**, realizada bajo la dirección del **DR. DIEGO JULIO ARENAS ARANDA:**

Presidente: DR. EZEQUIEL MOISES FUENTES PANANÁ
Vocal: DRA. LETICIA ROCHA ZAVALETA
Secretario: DR. ALEJANDRO MANUEL GARCÍA CARRANCA
Suplente: DRA. VILMA MALDONADO LAGUNAS
Suplente: DRA. LETICIA MORENO FIERROS

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
“POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU”
Cd. Universitaria, D.F., a 22 de abril de 2014

M. del Coro Arizmendi

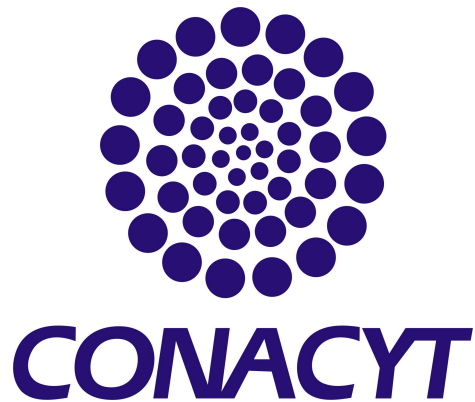
DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



AGRADECIMIENTOS



Por haberme dado la oportunidad de pertenecer a este excelente programa de posgrado.



Por promover una beca durante el tiempo de mis estudios de maestría.

A los miembros del Comité Tutor: Dr. Alejandro García Carrancá, y Dra. Leticia Moreno Fierros, por sus notables comentarios y guía durante el desarrollo del trabajo.

AGRADECIMIENTOS A TITULO PERSONAL

A él hombre que me ha enseñado a construir el mejor camino: mi padre. A la gran mujer que ama incondicionalmente: mi madre. A mis hermanos compañeros de vida: Susana y Bernardo.

Al Dr. Diego, por la oportunidad de pertenecer a su grupo de investigación por su paciencia y guía durante cada paso de la maestría.

Al Dr. Normand, quien me ha orientado en todo momento. Por su confianza, apoyo y amistad que me permitieron aprender mas allá de lo estudiado en el proyecto.

A mis profesores quienes han contribuido a mi formación como una persona de bien, para enfrentar los retos del área científica.

Agradezco a mis amigos y colegas que han contribuido a lograr este trabajo, no quisiera omitir a ninguno, por lo que les extiendo a todos mi mas sincero reconocimiento.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
Glándula mamaria	3
Generalidades del Cáncer	6
Cáncer de mama	9
Cáncer: Reto en salud Pública	18
Cáncer de mama en el mundo	21
Cáncer de mama: Un problema de salud en México	22
Biología molecular del cáncer de mama	23
Virus y Cáncer	26
Virus del tumor mamario murino MMTV	27
Generalidades	27
Ciclo de vida	29
OBJETIVOS	31
Objetivo general	31
Objetivos particulares	31
ANTECEDENTES	32
MMTV y su relación con el cáncer de mama en humanos	32
MMTV-like presente en muestras de tumores de mama humanos	34
Transmisión de MMTV-like a humanos	37
Mutagénesis insercional del MMTV	38
JUSTIFICACIÓN	40
METODOLOGIA	41
Obtención del Material Biológico	41
Criterios de inclusión	41
Criterios de exclusión	41
Extracción de DNA total	41
Amplificación de DNA Genómico	42
PCR para el gen GAPDH	42
PCR anidada de punto final para el gen env de MMTV	43
Transformación de la cepa x11 Blue de Escherichia coli con pBR322	43
Extracción de RNA total	45
Retrotranscripción	45
Eliminación de DNA contaminante y PCR de Gapdh y HPRT	45
Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real	46
Identificación de genes flanqueados por MMTV	46
Secuenciación de productos de PCR splinkerette	47
RESULTADOS	49
Obtención de las tumores de mama y tejido adyacente	49
Amplificación de DNA genómico total	51
Cuantificación y pureza	53

Rendimiento de amplificación de DNA genómico	53
PCR para el gen GAPDH	55
Transformación de E. coli (XL1 Blue) con pBR322 (env)	56
Identificación de la presencia del gen env de MMTV	58
análisis de similitud	60
obtención de RNA	64
Síntesis de cDNA	66
Cuantificación absoluta (numero de copias)	69
expresión de gen env	71
Análisis insercional	72
Análisis de resultados	78
DISCUSIÓN	81
CONCLUSIONES	85
LITERATURA CITADA	86

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

	Página
Figura 1. Anatomía de la mama.	4
Figura 2. El cáncer tiene diversidad genómica.	7
Figura 3. Capacidades para que se produzca cáncer.	8
Figura 4. Incidencia y mortalidad de cáncer en ambos sexos por nivel de desarrollo.	19
Figura 5. Incidencia y mortalidad de tipo cáncer por sexo.	20
Figura 6. Esquema de un virión de MMTV maduro.	27
Figura 7. Organización genómica del retrovirus MMTV.	28
Figura 8. Ciclo de vida de MMTV.	30
Figura 9. Eventos de mutagénesis insercional	38
Figura 10. Amplificación de genoma completo de tumores de mama y tejido no afectado.	52
Figura 11. Integridad del DNA de tumores de mama y tejido adyacente.	55
Figura 12. Productos de PCR para el gen env de MMTV a partir de plásmido pBR322.	57
Figura 13. Muestras positivas para MMTV.	58
Figura 14. Alineamiento múltiple de secuencias.	63
Figura 15. Cladograma de secuencias del gen env encontradas en muestras de tumores de mama y tejido adyacente.	64
Figura 16. Integridad de RNA total en muestras de tumores de mama.	65
Figura 17. Integridad de RNA total en tumores de mama.	66
Figura 18. PCR de constitutivo HPRT amplificado a partir de cDNA.	67
Figura 19. PCR de segmento gen GAPDH.	68
Figura 20. Confirmación de cDNA libre de DNA	69
Figura 21. Curvas de amplificación.	70
Figura 22. Gráfica de amplificación de qPCR para gen env de MMTV.	71
Figura 23. Electroforesis de productos de digestión con Xho II.	72
Figura 24. Amplicones de inserciones virales amplificados por PCR anidada.	73
Figura 25. Calidad de amplicones de inserciones virales.	74
Figura 26. Ligación de adaptadores.	75
Figura 27. Productos de PCR para comprobar presencia de inserción viral y adaptadores de secuencia Illumina.	75
Figura 28. Ferograma obtenido de la amplificación de muestra 6T	76
Figura 29. Extensión de construcción iSPK con oligo universal de secuencia.	77

	Página
Tabla 1. Principales tipos de cáncer mamario de acuerdo a su tejido de origen.	12
Tabla 2. Estadio anatómico y correlación con el grupo pronostico TNM.	14
Tabla 3. Estudios en donde evalúan el posible papel de MMTV-like en cáncer de mama de humanos.	35
Tabla 4. Pacientes diagnosticadas con diferentes tipos histológicos.	50
Tabla 2. Relación de datos de concentración y pureza de DNA purificado a través de adsorción a columna de sílica.	53
Tabla 3. Eficiencia de amplificación de DNA genómico en 14 muestras.	54
Tabla 7. Diagnóstico patológico y edad de las pacientes positivas para MMTV. T: Tumor. A: adyacente.	59
Tabla 8. Identidad de fragmentos de gen env encontrados en tumores de mama y tejido adyacente.	60
Tabla 9. Cuantificación de RNA de muestras positivas para MMTV.	64
Tabla 10. Datos de curva estándar para cuantificación absoluta.	70
Tabla 11. Número de copias del gen env en muestras positivas.	71

RESUMEN

El cáncer de mama es la principal causa de muerte por neoplasias en las mujeres mexicanas. Se ha demostrado que el retrovirus MMTV-like está asociado al cáncer de mama humano. El objetivo de este estudio fue identificar la presencia del gen env de MMTV-like, su expresión y sitios de inserción en los tumores de mama de mujeres mexicanas.

El DNA y RNA fueron extraídos de un total de 127 tumores de mama y tejidos normales. Con el fin de evaluar la calidad del ADN, se amplificó un fragmento de GAPDH de 700 pb para todas las muestras. La detección de MMTV se realizó por PCR anidada para dos fragmentos del gen env (660bp y 250 pb), como control positivo se uso el gen env de MMTV (C3H) en pBR322. La presencia del retrovirus y la cuantificación del número de copias fue validado por qPCR con sondas TaqMan. La expresión se evaluó mediante el tratamiento de RNA con DNAsa y luego una RT-qPCR con sondas TaqMan para gen env. Los sitios de inserción MMTV-like en el genoma del tumor se determinaron por PCR splinkerette.

La presencia de MMTV fue de 10.2%. Los datos se confirmaron por qPCR con sondas TaqMan. El análisis de secuencia muestra que los fragmentos del gen env presentan una identidad de 95% con HMTV, 28% con HERVs y 97% con el MMTV. Las copias virales son variables para cada muestra (6990-30000 copias). La expresión del gen env se observó en 50% de las muestras positivas. El análisis preliminar revela inserciones retrovirales en todo el genoma de los tumores de mama. Este estudio aporta datos que contribuyen a la hipótesis de una asociación entre el retrovirus MMTV-like y el cáncer de mama humano.

ABSTRACT

Breast cancer is the leading cause of neoplasia death in Mexican women. Recently, it was demonstrated that MMTV-like retrovirus is associated with human breast cancer. The aim of this study was to identify env gene MMTV-like, expression and insertion sites of retrovirus in breast tumours from Mexican women.

DNA and RNA were extracted from a total of 127 tumours and normal tissues. In order to assess DNA quality, a 700bp GAPDH fragment was amplified for all samples. MMTV detection was performed by nested PCR for two fragments of env gene (660bp and 250bp), as a positive control MMTV env gene (C3H) in pBR322 was used. Presence of the retrovirus was validated by qPCR with TaqMan probes and quantification of the number of copies using the env gene inserted into pBR322. Expression was evaluated by RNA treatment with DNase and then a RT-qPCR with TaqMan probes to detect env gene. MMTV-like retrovirus insertion sites in the tumour genome were determined by splinkerette PCR.

MMTV sequences were detected in 10.2% of tumour samples. The data was confirmed by qPCR with TaqMan probes. Sequence analysis shows that env gene fragments present an identity of 95% with HMTV, 28% with HERVs and 97% with MMTV. The number MMTV-like viral copies is variable for each sample (6990-30000 copies). env gene expression was determined in 30% of the positive samples. Preliminary analysis reveals retroviral insertions throughout the genome of breast tumours. This study provides data that contribute to the hypothesis of an association between the MMTV-like and human breast cancer.

INTRODUCCIÓN

GLÁNDULA MAMARIA

La glándula mamaria es uno de los rasgos anatómicos, morfológicos y fisiológicos de los mamíferos, representa una característica sexual secundaria del género femenino. Es una estructura evolutiva que genera beneficios para la progenie, ya que la leche que produce brinda nutrientes e inmunidad pasiva al recién nacido (Bland and Copeland 2007).

Las glándulas mamarias existen también en el hombre con el mismo origen embriológico que en la mujer. Igualmente se transforman en la pubertad, pero esta transformación se detiene y la glándula queda en estado rudimentario, reducida a un pequeño disco de tejido glandular. La mama en el varón tiene los mismos elementos que en la mujer, solo que menos desarrollados. Solo el pezón y la areola son comparables morfológicamente a los de la mujer. A pesar de esta ausencia de desarrollo, la glándula mamaria en el hombre puede ser blanco de procesos patológicos, en este trabajo se referirá únicamente a la anatomía de la mama de la mujer (Latarjet and Ruiz 2008).

La mama tiene una forma hemiesférica y está localizada entre la segunda y sexta costilla. Está constituida por estroma formado de mesénquima que brinda sostén, y por parénquima con epitelio glandular donde residen 15 a 20 lóbulos glandulares, de forma cónica, cada uno de los cuales tiene independencia funcional. Cada lóbulo de la glándula mamaria está formado por la unión de varios lobulillos que se encuentran en los alveolos. Cada uno de estos lóbulos posee un conducto excretor: el conducto galactóforo. Estos son flexibles, contorneados y se dirigen hacia el pezón, pero antes de llegar a él, presentan una dilatación fusiforme de 1.2 a 1.5mm de ancho, la ampolla o seno galactóforo donde se almacena la secreción láctea en el intervalo de cada lactación. Luego cada conducto galactóforo atraviesa el pezón según un trayecto rectilíneo para abrirse en su vértice por los poros galactóforos (Fig. 1) (Bland and Copeland 2007).

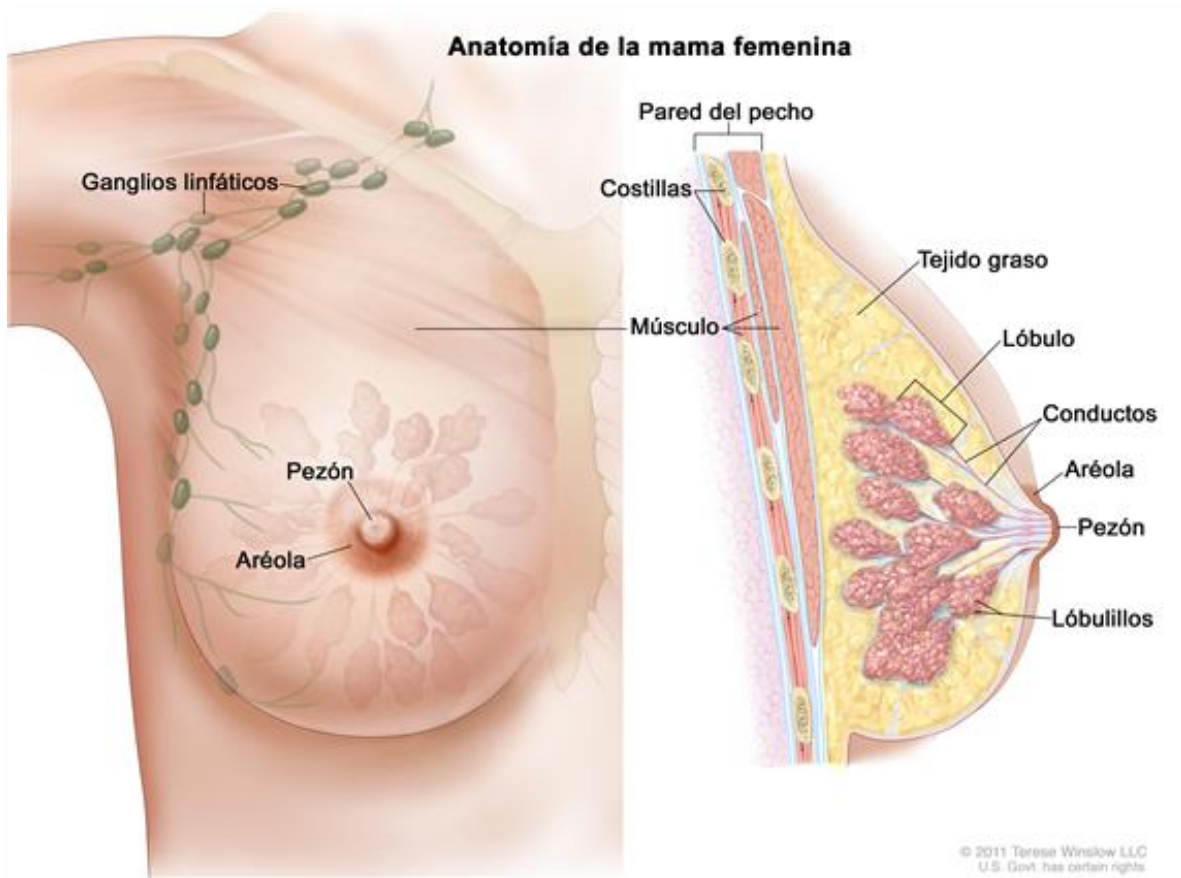


Figura 4. Anatomía de la mama. Izquierda: posición de la mama en el tórax. Derecha: corte sagital de la mama y en su interior la red de lóbulos y sus conductos que envían la leche al exterior durante la lactancia (Tomada de Terese Winslow LLC).

El tejido mamario se forma durante el desarrollo embrionario, en la 13ª semana de gestación se emiten conductos galactóforos hacia el mesénquima subyacente en la mujer los bajos niveles de testosterona permiten que los conductos vayan incursionando en el mesénquima. Durante la pubertad acontece una segunda etapa de desarrollo y diferenciación, en la cual los conductos galactóforos desembocan en el pezón y el tejido glandular se extiende hasta los extremos de la mama. Posteriormente, las últimas etapas se llevan a cabo durante el embarazo y la lactancia (Ramsay, Kent et al. 2005).

Las hormonas tienen un papel importante en el desarrollo de la glándula mamaria: los estrógenos estimulan el crecimiento y la diferenciación del epitelio ductal y conectivo; mientras que la progesterona promueve el desarrollo del lóbulo alveolar y la diferenciación de su epitelio; la prolactina es necesaria para la ramificación de los ductos y la hormona paratiroidea para el desarrollo normal del sistema ductal (Bland and Copeland 2007).

GENERALIDADES DEL CÁNCER

Las células se dividen a una tasa óptima para mantener el control perfecto que preserva la vida de cualquier organismo. La proliferación celular es un proceso controlado, que permite la multiplicación de las células, aumentando la cantidad de organelos y moléculas. Esta administración se debe a una fina red de interacciones que han sido seleccionados durante la evolución.

En ocasiones este proceso de crecimiento ordenado se descontrola, y si no es corregido, las células nuevas siguen dividiéndose aunque el cuerpo no las necesite. De tal manera que las células antiguas no mueren cuando deberían y forman una masa llamada tumor. Esta masa de células puede escapar de la regulación del cuerpo produciendo un conjunto de enfermedades conocidas como cáncer (DeBerardinis, Lum et al. 2008).

El cáncer es un proceso de múltiples pasos, se origina en las células cuando su material genético cambia o es dañado. El desarrollo de cáncer es debido a dos eventos básicos: **1)** La acumulación de variaciones genéticas debido a mutaciones que producen ganancia de función (oncogenes) los cuales son efectores positivos de la transformación; o bien producen pérdida de función (supresores de tumor) los cuales son reguladores negativos de la transformación (Levine and Puzio-Kuter 2010). **2)** La selección natural que actúa sobre la diversidad de los fenotipos resultantes. De esta manera las células que poseen una variante que les confiere capacidad de proliferar y sobrevivir son más efectivas que las células vecinas, que no poseen un genotipo ventajoso (Fig. 2) (Yates and Campbell 2012).

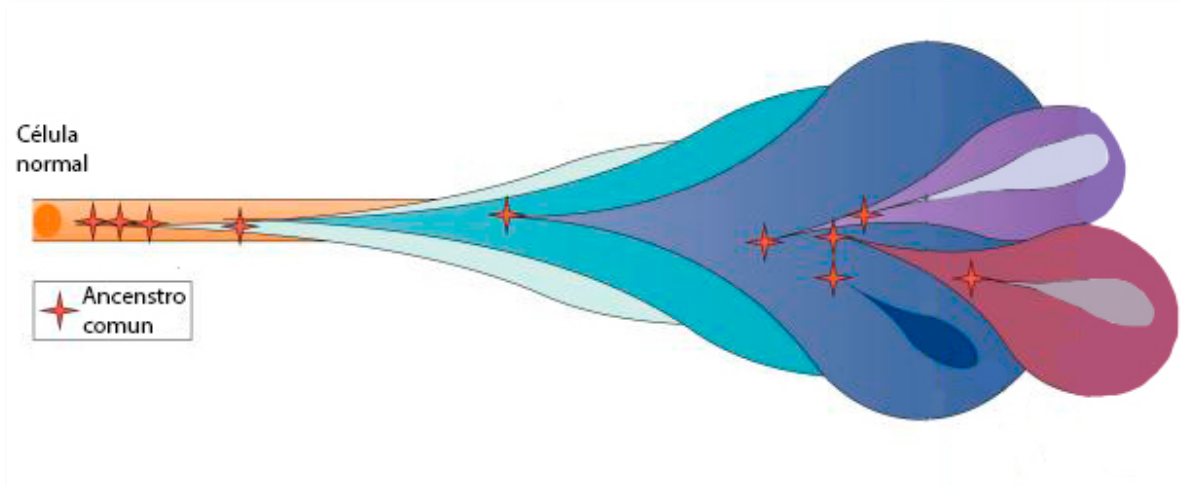


Figura 5. El cáncer tiene diversidad genómica. Las clonas (representadas por burbujas de colores) emergen como consecuencia de la acumulación de mutaciones de una célula de la progenie llamado ancestro común. La heterogeneidad del tumor esta determinada por múltiples sucesos de selección clonal, debido a las presiones derivadas del microambiente. Tomada de (Yates and Campbell 2012).

Así el genoma del cáncer acumula mutaciones a lo largo de la vida del paciente promoviendo el desarrollo tumoral, donde conjuntamente se genera resistencia a la muerte celular, se evade la destrucción del sistema inmune y se sintetizan factores angiogénicos para crear un microambiente de nutrición (Fig. 3). El desarrollo espacio temporal del tumor es variado, cuando el tumor no sobrepasa la membrana basal se llama in situ, y cuando la atraviesa comienza la cascada de invasión-metástasis, con lo que es posible que las células tumorales colonicen otros órganos (Hanahan and Weinberg 2011).

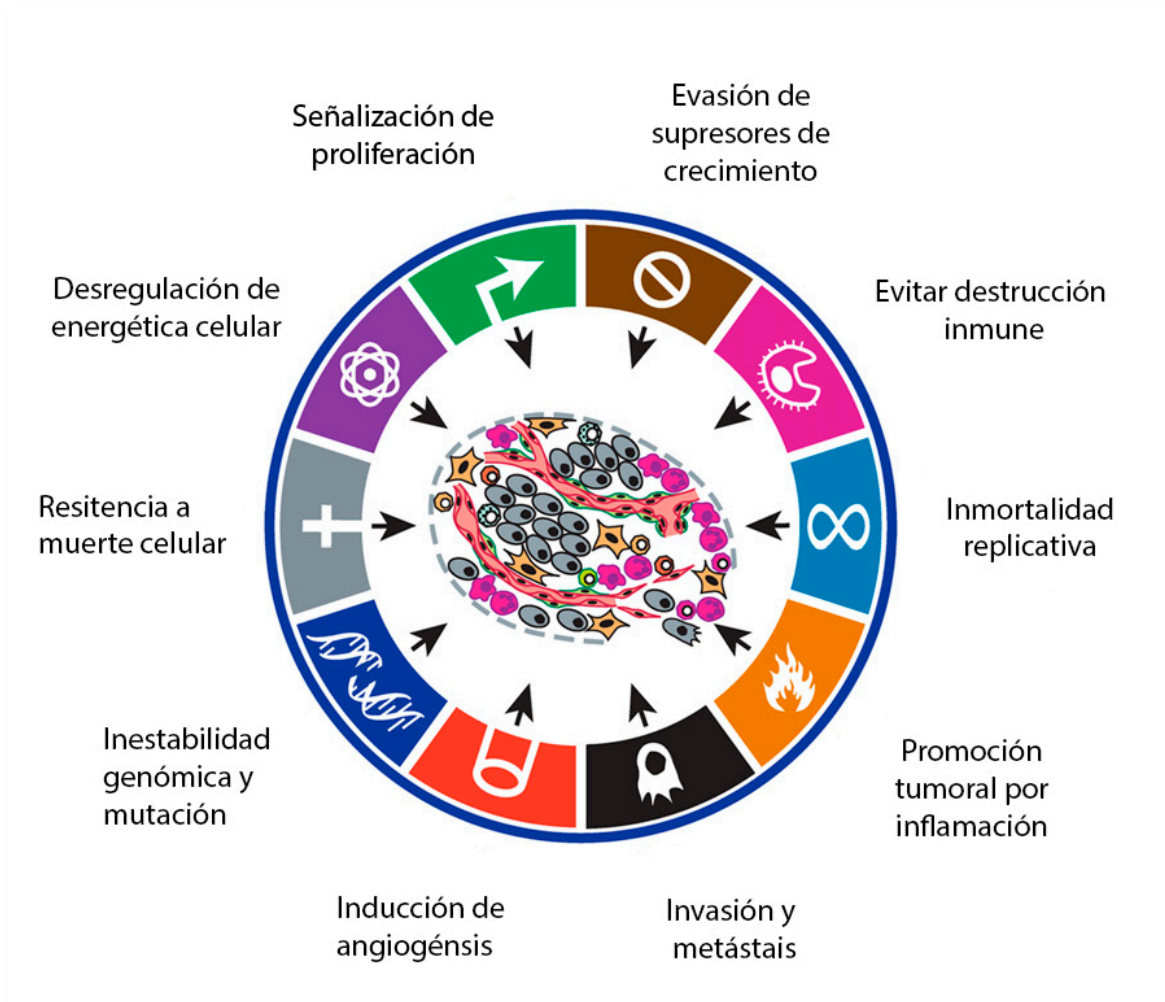


Figura 6. Capacidades para que se produzca cáncer. Características adquiridas por una célula normal que se dan en múltiples pasos hasta que adquiere un fenotipo maligno. Tomada de (Hanahan and Weinberg 2011).

Las neoplasias son microambientes donde existen un mosaico de células mutantes que compiten por el espacio y recursos, cooperan para dispersar y colonizar nuevos órganos, esto explica por qué tenemos cáncer y por qué ha sido difícil de curar. La identificación, y entendimiento de los mecanismos de transformación maligna puede proporcionar la clave para establecer nuevas estrategias para su detección temprana, tratamiento y prevención (Merlo, Pepper et al. 2006).

CÁNCER DE MAMA

El cáncer de mama se inicia con cambios celulares como hiperplasia en una capa de los conductos, de los lobulillos mamarios y en menor medida del estroma. Si estas alteraciones permanecen progresarán a un proceso de malignización. Esta transformación maligna depende de la alteración de genómica causada por componentes internos (procesos intracelulares y extracelulares) y externos (exposición a agentes mutagénicos y carcinógenos) (Institute 2014).

El cáncer de mama puede progresar siguiendo el trayecto de los vasos sanguíneos y linfáticos los ganglios o a diferentes órganos donde provoca metástasis. Los órganos que más se ven afectados por metástasis son hueso, hígado y pulmón. El 90% de los casos se considera esporádico y el 10% hereditario (Lynch, Silva et al. 2008).

El cáncer de mama es una enfermedad heterogénea, que se diferencia en su diagnóstico, patología, pronóstico y tratamiento.

Factores de riesgo

En el curso de toda la vida, una de cada ocho mujeres se le diagnosticará cáncer de mama. Los factores de riesgo para el desarrollo de cáncer de mama que no se pueden cambiar son:

- Edad y sexo: la mayoría de pacientes con cáncer de mama son mujeres, de 100 a 400 veces más frecuentes que en hombres; las glándulas mamarias de las mujeres están continuamente en cambio y crecimiento, principalmente por la acción del estrógeno y la progesterona. Respecto a la edad, las probabilidades de padecer esta neoplasia aumentan conforme la mujer envejece, principalmente después de los 50 años (Danaei, Vander Hoorn et al. 2005).

- Antecedentes familiares: el riesgo de padecer cáncer de mama aumenta si algún familiar cercano ha padecido la enfermedad. Alrededor del 20 al 30% de las mujeres con cáncer de mama tienen antecedentes de la enfermedad (Bland and M 2005).
- Genes: algunas mujeres tienen mutaciones genéticas que las hace propensas a desarrollar cáncer de mama. Los defectos más comunes están en dos genes asociados a la reparación del DNA, los genes BRCA1 y BRCA2 (5% de casos asociados a herencia). Las mujeres que heredan mutaciones en estos genes, corren mayor riesgo a lo largo de su vida a desarrollar la neoplasia. Las mutaciones en los genes PTEN y p53 también están asociadas con un alto riesgo de desarrollo de cáncer. Mutaciones en los genes CHEK2, ATM, NBS1, RAD50, BRIP1 y PALB2 están asociados con un doble riesgo de padecer cáncer de mama (Walsh and King 2007).
- Ciclo menstrual: las mujeres que inician tempranamente su periodo menstrual (antes de los 12 años) o llegan a la menopausia tarde (después de los 55) están expuestas a una carga hormonal por más tiempo, y tienen riesgo mayor de tener cancer de mama(Miller, Smeds et al. 2005).

Los siguientes factores de riesgo asociados a cáncer de mama se pueden evitar:

- Hormoterapia. El uso de anticonceptivos orales y la terapia de reemplazo hormonal (TRH) se asocia con el riesgo de cáncer de mama. Estudios sugieren que el aumento en la exposición a estrógenos endógenos a lo largo de la vida incrementa el riesgo de desarrollar cáncer de mama (Lacey, Kreimer et al. 2009).
- Parto. Las mujeres que nunca han tenido hijos, o que los tuvieron después de lo 30 años, tienen mayor riesgo de padecer este tipo de cáncer.

- El sobrepeso y obesidad aumentan el riesgo de desarrollar cáncer de mama en mujeres posmenopáusicas. La disponibilidad de energía elevada (alta ingesta de alimentos y poca actividad física) conduce a niveles altos de hormonas esteroides ováricas.
- Estilo de vida. El alcoholismo y el tabaquismo elevan de 7 a 8 veces el riesgo de desarrollar cáncer de mama (Bland and M 2005).

Tipos de cáncer de mama

De acuerdo al tejido de origen, el cáncer de mama proviene del epitelio glandular (carcinoma ductal y lobulillar), y del tejido mesenquimatoso (cistosarcoma y angiosarcoma) (Tabla 1). Dividiendo a la mama en cuatro partes, la mayor cantidad de conductos se localizan en el cuadrante superior externo, por esta razón casi el 50% de los tumores malignos se localizan en este cuadrante (Marta Lloret Sáez Bravo, David Aguiar Bujanda et al. 2004).

Tabla 4. Principales tipos de cáncer mamario de acuerdo a su tejido de origen (Perez Tamayo and López Corella 2007).

Origen	Tipo	Subtipos y Patología	Epidemiología y Pronóstico
Epitelio glandular (adenocarcinoma de mama)	Carcinoma ductal	Intraductal Ductal infiltrante Medular Mucinoso Papilar	Es el más común de los cánceres de mama (80%). El intraductal es el más común dentro de los no invasivos, mientras que el infiltrante es el invasivo más común.
	Carcinoma lobulillar	Se distingue como lesiones en los conductos galactóforos, en forma de nódulos. in situ Infiltrante Se localiza en los lobulillos secretores de leche como nódulo.	El pronóstico depende del grado de infiltración y diferenciación del tumor. Tumores raros por lo general aparecen en mujeres jóvenes. Su pronóstico depende del grado de infiltración y diferenciación del tumor.
	Enfermedad de Paget	Lesión de tipo ecematosos que afecta la región aureolear	Poco común (1 a 2% de los casos de cáncer). Tiene mal pronóstico por su diagnóstico tardío.
Tejido mesenquimatoso	Cistosarcoma filoide	Tumores de aspecto escamoso con un	Representan <1% de los tumores mamarios,

(Sarcoma de mama)		patrón en forma de hojas, muy celularizado	se presentan en mujeres de edad avanzada con un mal pronóstico por su agresividad.
	Angiosarcoma mamarios	Masas hemorrágicas mal definidas muy vascularizadas con celular endoteliales en mitosis.	Representan <0.5% de los tumores de mama. Presentes en mujeres de 20 a 30 años con mal pronóstico y mortandad elevada, debido a la alta metástasis.
Metástasis a la mama	Tumor secundario: metástasis de tumor primario a la mama.	Tumores primarios que metastatizan a la mama: linfomas, leucemias, melanomas, cáncer de pulmón y endometrio,	Su pronóstico es muy malo debido al estadio avanzado del cáncer.

Estadificación de los tumores de mama

La etapa o estadio de un tumor describe la gravedad del cáncer que padece un paciente y permite determinar el tratamiento más adecuado. El American Joint Committee on Cancer (AJCC) designó los estadios mediante la estadificación TNM, que toma en cuenta los siguientes factores: tamaño del tumor, presencia de células neoplásicas en los ganglios adyacentes y la metástasis a órganos distantes. Dichos parámetros son la base para el sistema de estadificación TNM (Singletary, Allred et al. 2002):

T. Extensión del tumor primario. Que va desde T1 (tumor que mide ≤ 20 mm) hasta T4 (tumor con extensión directa a la pared pectoral).

N. Ganglios linfáticos regionales. Que abarca desde N0 (no hay células neoplásicas en ganglios) hasta N3 (metástasis en ganglios linfáticos supraclaviculares).

M. Metástasis a distancia. M0 (sin metástasis) o M1 (hay metástasis).

Existe también la clasificación del estado anatómico del tumor que lo divide en: 0, IA, IB, IIA, IIB, IIIA, IIIB, IIIC y IV. En la tabla 2 se muestran a correlación entre el estado anatómico y el grupo pronóstico TNM.

Tabla 5. Estadio anatómico y correlación con el grupo pronóstico TNM.

Estadio	T	N	M
0	Tis	N0	M0
IA	T1	N0	M0
IB	T0	N1mi	M0
	T1	N1mi	M0
IIA	T0	N1	M0
	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
IIIA	T0	N2	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T3	N2	M0
IIIB	T4	N0	M0
	T4	N1	M0
	T4	N2	M0
IIIC	Cualquier T	N3	M0
IV	Cualquier T	Cualquier N	M1

TNM. T: Extensión del tumor primario; N: Ganglios linfáticos regionales, M: metástasis a distancia.

Diagnóstico del cáncer de mama

En la clínica se utilizan pruebas diversas para detectar y diagnosticar el cáncer de mama tales como el ultrasonido mamario, mamografía, imágenes por resonancia magnética y biopsia. Una vez diagnosticado, se realizan pruebas para saber en que etapa se encuentra; para lo cual se emplea la clasificación TNM descrita anteriormente, además existen marcadores celulares que ayudan diagnosticar el tipo de cáncer, tales como la medición de receptores de estrógeno, progesterona y HER2/neu. Actualmente algunas pacientes diagnosticadas con cáncer de mama tienen acceso a pruebas mas robustas para conocer el pronóstico de su enfermedad:

Oncotype DX. Analiza el perfil de expresión de 21 genes con el cual se determina el riesgo de recurrencia del cáncer de mama con receptores de hormonas positivos en estadio temprano, así como el beneficio de quimioterapia después de una cirugía de cáncer de mama (Kelly, Krishnamurthy et al. 2010).

MammaPrint. Analiza el perfil de expresión de 70 genes. Al igual que Oncotype analiza el riesgo de recurrencia de cáncer en estadio temprano con receptores de hormonas positivos y negativos (Bedard, Mook et al. 2009).

Mammostrat. Analiza el perfil de expresión de 5 genes. Determina la recurrencia de cáncer de mama en pacientes con estadios tempranos y receptores positivos (Weigelt, Baehner et al. 2010).

Tratamiento

Existen diferentes tratamientos para las pacientes con cáncer de mama, algunos son estándar y otros se encuentran en evaluación en ensayos clínicos.

La cirugía ha sido la más empleada, existen variaciones para conservar la mama y para extirparla completamente, así mismo se elige extirpar el ganglio centinela, y que recibe el drenaje linfático del tumor (Silliman 2006).

Otro tratamiento para el cáncer es la radiación, en donde se usan rayos X de alta energía dirigidos hacia las células cancerosas, normalmente la radiación se emite desde el exterior, pero algunas veces es necesario colocar un implante dentro del cuerpo que emita directamente la radiación al tumor. En la quimioterapia se administra por vía oral venosa, el medicamento interrumpe el crecimiento de las células cancerosas ya sea mediante su destrucción o impidiendo su división (Goldhirsch, Wood et al. 2007).

La terapia con hormonas permite bloquear la acción de las hormonas sobre el tumor, ya que en algunos tumores se ha demostrado que las hormonas elaboradas por el paciente estimulan el crecimiento tumoral. El tamoxifeno (antagonista de receptores de estrógeno) se administra a menudo a pacientes con estadios tempranos. En terapia dirigida se utilizan medicamentos que identifican y atacan células cancerosas sin dañar a las normales como anticuerpos monoclonales e inhibidores de tirosina cinasas, algunos ejemplos son: trastuzumab, pertuzumab, lapatinib, etc (Altundag, Esteva et al. 2005).

Se están probando nuevos tipos de tratamiento en ensayos clínicos, como la vacuna TriAb, que tiene capacidad de inducir respuesta inmunológica en pacientes con cáncer de mama metastásico(Reece, Foon et al. 2003). La quimioterapia de dosis alta con trasplante autólogo de células madre ha mostrado buenos

resultados, de 40 pacientes cuyo cáncer estaba en etapa IV, el 55% no tuvo reincidencia. El Instituto Nacional del Cáncer de EUA, tiene cerca de 800 ensayos clínicos para encontrar nuevos tratamientos o combinaciones de estos y cada año sigue reclutando pacientes (Eifel, Axelson et al. 2001).

Otro tipo de tratamiento experimental es la terapia vírica oncolítica que consiste en la destrucción directa de las células cancerosas. Los virus oncolíticos infectan células normales y cancerosas, pero en las primeras tienen poco efecto; y en las cancerosas provocan su muerte. El objetivo es adaptar algunos virus mediante ingeniería genética para que volverlos oncolíticos y que infecten con preferencia células cancerosas que producen un antígeno específico asociado con el cáncer como EGFR (Russell, Peng et al. 2012).

CÁNCER: RETO EN SALUD PÚBLICA

El cáncer es uno de los principales retos en salud pública ya que es la segunda causa que produce la muerte en todo el mundo, 1 de cada 8 muertes se debe al cáncer. En 2012 causó 8.2 millones de defunciones y actualmente 32.6 millones de personas viven con cáncer. Es interesante saber que en los países menos desarrollados ocurre el 57% (8 millones) de nuevos casos y el 65% (5.3 millones) de muertes a nivel mundial (Ferlay J 2012) (Fig. 4).

**Ambos sexos
Todas las edades**

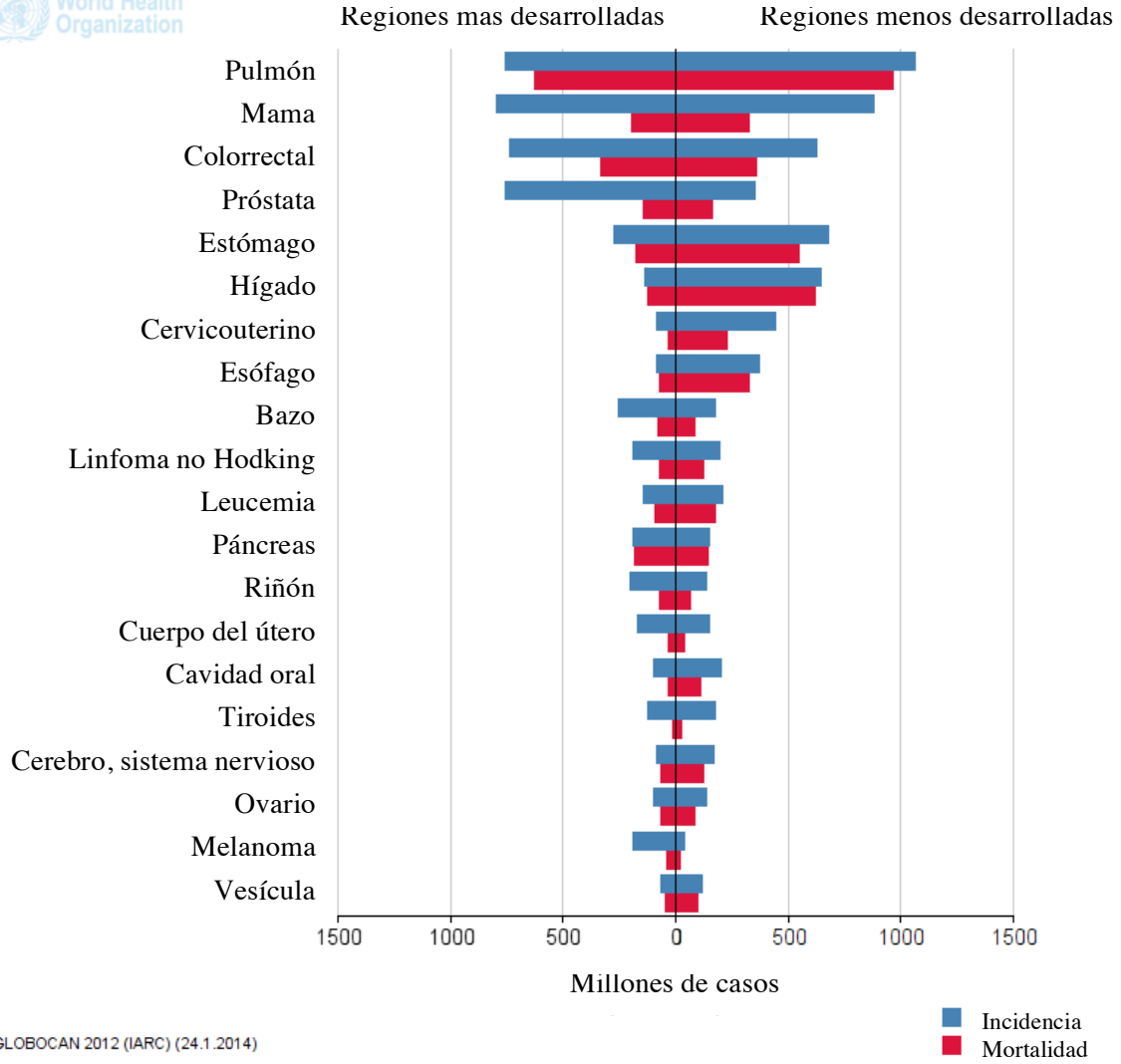


Figura 4. Incidencia y mortalidad de cáncer en ambos sexos por nivel de desarrollo. El cáncer de pulmón, mama, próstata y colorrectal son los más comunes en el mundo, pero en países en vías de desarrollo la incidencia y mortalidad es mayor que en los países desarrollados.

Se prevé que en el 2035 a nivel mundial, la mortalidad por cáncer aumentará un 56%, pasará de 8.2 millones a 14.63 millones de defunciones, debido en parte al crecimiento demográfico y al envejecimiento de la población (Ferlay J 2012). Las estadísticas revelan que los cánceres con mayor número de incidencia anual a nivel mundial corresponden a: pulmón, próstata, colorrectal y mama; los tres primeros afectan en su mayoría a hombres y en mujeres el más común es el cáncer de mama (Fig. 5) (Ferlay J 2012).

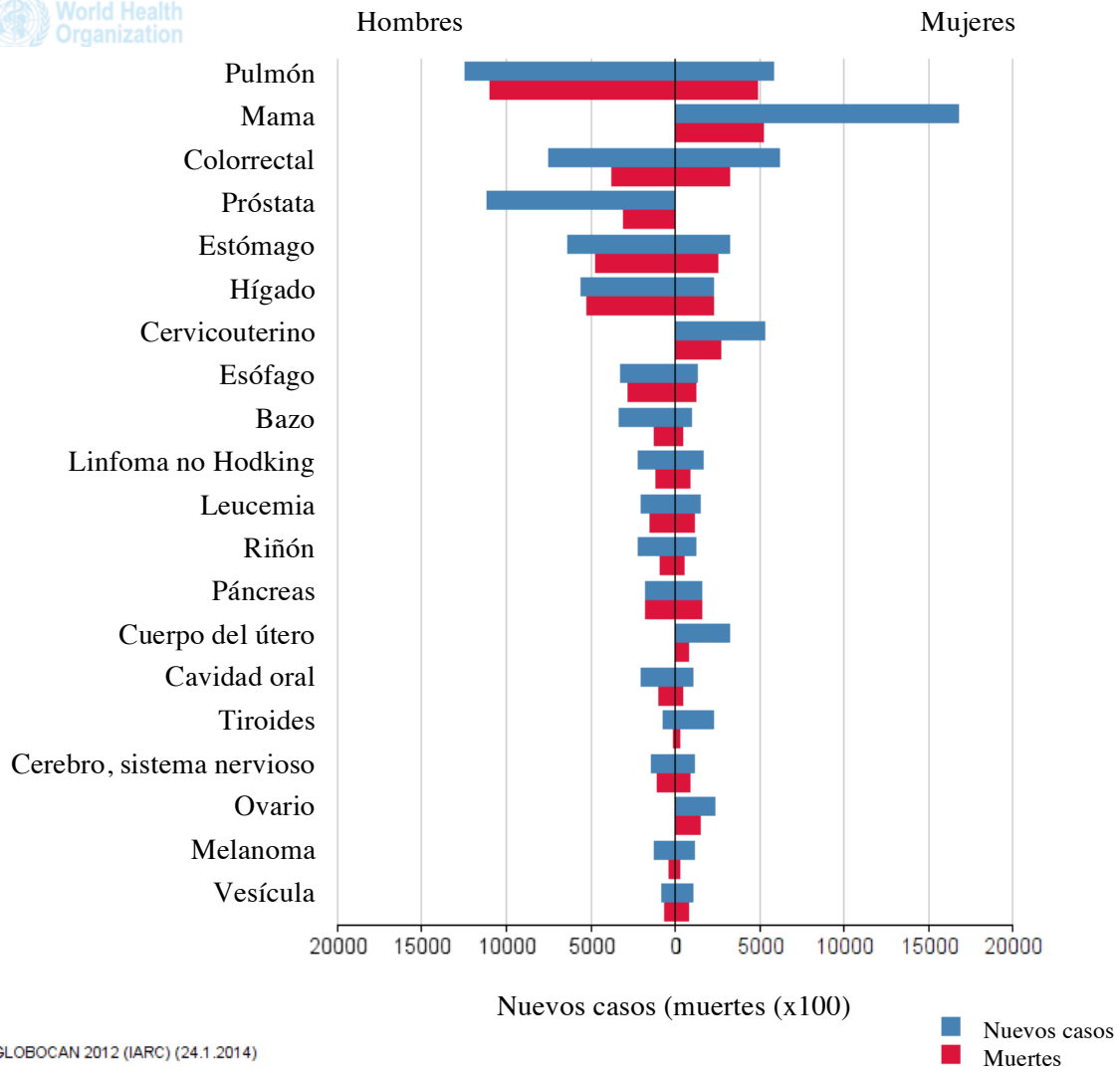


Figura 7. Incidencia y mortalidad de tipo cáncer por sexo. Los hombres tienen mayor incidencia de cáncer de pulmón, próstata y colorrectal; mientras que en las mujeres el cáncer de mama es el mas común.

CÁNCER DE MAMA EN EL MUNDO

De todas las neoplasias a nivel mundial, el cáncer de mama es el más frecuente, ya que representa el 27.17% de todos los cánceres femeninos; en 2012 se diagnosticaron 1.67 millones de casos. Su incidencia es de 43.3 casos por cada 100,000 habitantes la cual varía mucho en todo el mundo, con tasas normalizadas por edad de hasta 99.4 casos por cada 100,000 habitantes en América del Norte. Mientras que en Europa Oriental, América del Sur, África Austral y Asia Occidental presentan incidencias moderadas, pero en aumento. De esta manera, uno de cada 10 casos de cáncer detectados anualmente por primera vez en el mundo corresponde a cáncer de mama. Se estima que en el 2035 el cáncer de mama representará el 33.9% de los cánceres femeninos (Ferlay J 2012).

En 2012 fallecieron 521,817 mujeres a causa de cáncer de mama (13% más que el año 2008), lo que representa el primer lugar de muerte en mujeres debido a una neoplasia. Aunque este cáncer está considerado como una enfermedad del mundo desarrollado, la mayoría (69%) de las defunciones por esa causa se registran en los países en desarrollo (Jemal, Bray et al. 2011, Ferlay J 2012).

Las tasas de supervivencia del cáncer mamario varían mucho en todo el mundo, desde el 80% o más en América del Norte, Suecia y Japón, pasando por un 60% aproximadamente en los países de ingresos medios, hasta cifras inferiores al 40% en los países de ingresos bajos. Las bajas tasas de supervivencia observadas en los países poco desarrollados pueden explicarse principalmente por la falta de programas de detección temprana, pero también por la falta de servicios adecuados de diagnóstico y tratamiento (Ferlay J 2012, Bray, Ren et al. 2013).

CÁNCER DE MAMA: UN PROBLEMA DE SALUD EN MÉXICO

Como consecuencia del nuevo escenario demográfico y de la transición epidemiológica que vive actualmente nuestro país, el cáncer de mama es ahora una enfermedad de interés nacional, el 24.8% de todos los cánceres femeninos corresponde a mama, colocándolo como el primer lugar en enfermedades neoplásicas (Bray, Ren et al. 2013).

Durante el 2012, 20 444 mujeres fueron diagnosticadas con cáncer de mama. En este sentido, resulta importante conocer la magnitud de este padecimiento; por ejemplo, la mayor incidencia se presenta en el Distrito Federal (45.84), seguida por Sinaloa (45.76) y San Luis Potosí (45.20), en contraparte, la incidencia más baja se observa en los estados de Guerrero (6.52), Tabasco (6.55), Chiapas (4.24) y Tlaxcala (2.96). Esta distribución está relacionada con el estatus socioeconómico y desarrollo industrial de la región (Rodriguez-Cuevas, Macias et al. 2001).

En México durante el 2012 fallecieron 5,475 mujeres (15 cada día) por esta causa, abarcando un rango de edad diverso desde los 20 a los 64 años, esto ha reducido la esperanza de vida y representa para el país una carga económica considerable (INEGI 2013). Para el año 2030 se estima que las mujeres mayores de 25 años constituirán el 68.7%, respectivamente, de la población femenina total. Estos incrementos permiten anticipar el impacto en los servicios que el Sistema Nacional de Salud tendrá con estos grupos de edad, porque es la población más susceptible de desarrollar cáncer de mama (CONAPO 2006).

Actualmente se cuenta con métodos de diagnóstico y tratamiento, sin embargo, son diversos los factores que determinan la aparición y desarrollo de cáncer. Por ello el estudio del cáncer es un reto científico, tecnológico y social, que al comprenderlo brindará nuevas y mejores soluciones.

BIOLOGÍA MOLECULAR DEL CÁNCER DE MAMA

Nos encontramos en el período mas productivo que jamás ha alcanzado la investigación biomédica. Los descubrimientos científicos se producen cada vez mas rápido, gracias a que hoy las tecnologías disponibles son mas poderosas que nunca.

En las últimas décadas la biología molecular ha logrado importantes avances en la comprensión de las enfermedades humanas. El desafío mas importante al que nos enfrentamos los científicos es entender los mecanismos básicos responsables del cáncer. Seguirle la pista a la orquesta genética y molecular del cáncer permite el entendimiento de los eventos que afectan e intervienen en su desarrollo.

La biología moderna esta descubriendo las bases moleculares de la transformación cancerosa, al develar alteraciones en los genes, y en su expresión.

El cáncer de mama es una enfermedad multifactorial, ya que involucra varias causas, hasta hoy se han hecho grandes esfuerzos para conocer su etiología. En los años 90's se descubrieron alteraciones somáticas recurrentes. El supresor tumoral p53, se encuentra mutado en un 25 a 40% de los casos esporádicos de cáncer de mama y se ha asociado a un pronostico agresivo (Isola, Visakorpi et al. 1992). Mutaciones en el gen BRCA1 y BRCA2 (genes reparadores del DNA) están involucradas en un 5% de los casos (Diamond, Borges et al. 2009).

Los trabajos de investigación en biología molecular también han permitido identificar mas factores que participan en la carcinogénesis mamaria, como la sobreexpresión del oncogén ERBB2 (Her2) en algunos tipos de tumores mamaros, este gen codifica para un receptor transmembranal de tirosin cinasas que se ha usado como diana terapéutica (Vanderhaegen, Paridaens et al. 2012).

En los últimos años hemos estado presenciando la descripción de otros genes, que podrían ser usados en un futuro cercano para diagnóstico. Algunos de ellos se expresan solo en cánceres invasivos pero no en cánceres in situ (HS-CUI4A y DIL2) mientras que otros muestra un comportamiento opuesto (T1A12) (Burger, Zhang et al. 1998). También se ha observado que la maspina codificada por el gen SERPINB5 un supresor tumoral, pierde su expresión conforme progresa el cáncer de mama, entre sus acciones destacan la inhibición de motilidad celular, invasión y metástasis (Umekita, Ohi et al. 2002).

Otra área del conocimiento estudiada ha generado importantes contribuciones al análisis genómico del cáncer de mama es el estudio de perfiles de expresión de RNAm, una investigación basada en perfiles transcriptómicos de cáncer de mama consiguió identificar 10 clases de tumores cada uno con diferentes características biológicas y clínicas, lo cual abre paso a que en un futuro se proporcionarán mejores tratamientos (Curtis, Shah et al. 2012).

Basado en la secuencia de 103 exomas de cáncer de mama se han descubierto mutaciones recurrentes en el factor de transcripción CBFβ y deleciones en RUNX1. Se identificó una fusión MAGI2-AKT3 enriquecida en cáncer de mama triple negativo, dicha fusión activa la cinasa AKT que es abolida por el tratamiento. Estos estudios pueden permitir en un futuro conocer más genes asociados a la génesis de esta neoplasia (Banerji, Cibulskis et al. 2012).

La biología de sistemas ha tenido una participación activa en la identificación de oncogenes, se emplearon datos de 3,000 microarreglos de expresión de cáncer de mama para construir una red de interacciones. Se obtuvieron seis genes que comandaban la actividad general de los genes encargados del control de las células. En ensayos experimentales se silenció el gen HOXA1 (que codifica para factores de transcripción) lo que permitió revertir el desarrollo del tumor, normalizando el tejido, dejándolo sano (Brock, Krause et al. 2014).

Los avances moleculares en el cáncer de mama han sido amplios, sin embargo, aun queda por estudiar mas mecanismos de regulación y expresión génica. Actualmente se cuenta con conocimientos que permiten detectar secuencias específicas de material genético, de igual forma al tener mas información del genoma humano se han generado metodologías mas confiables. Por ultimo el creciente avance de la tecnología como microarreglos de expresión y secuenciación de nueva generación ofrece nuevos campos para la investigación molecular (Schweiger, Kerick et al. 2011).

Se está estudiando ampliamente la función de nuevos actores biológicos en el desarrollo de la carcinogénesis mamaria, hoy en día surge un interés en los virus de RNA, los retrovirus.

Los retrovirus son clasificados como virus simples o complejos basados en la organización de su genoma. Poco después de la infección, el genoma de RNA viral se retrotranscribe en una copia de DNA de doble cadena, que luego se integra en el genoma huésped y se expresa bajo el control de secuencias reguladoras de la transcripción viral. Una vez integrado, el provirus rara vez se pierde del cromosoma huésped. Como consecuencia de la integración y de importancia en la oncogénesis, los retrovirus tienen capacidad de adquirir y transducir material genético celular o activar genes, este hallazgo condujo al descubrimiento de los oncogenes, que como ya hemos visto tienen un papel importante en el control del crecimiento y diferenciación celular.

Recientemente las evidencias han mostrado que los retrovirus tienen un papel importante en el desarrollo tumoral mamario, por lo que es de interés descubrir las alteraciones moleculares que provoca en el genoma huésped y en su capacidad oncogénica.

VIRUS Y CÁNCER

En la actualidad se acepta que entre el 15 y 20% de los cánceres humanos tienen un origen viral. Los virus tumorales pertenecen a varias familias de virus, incluyendo las de RNA (Retroviridae y Flaviviridae) y las familias de virus de DNA (Hepadnaviridae, Herpesviridae y Papillomaviridae). En 1964 se comprobó por primera vez que el virus Epstein-Barr es un agente etiológico de cáncer (Linfoma de Burkitt) (Young and Rickinson 2004). Subsecuentemente otros virus humanos oncogénicos fueron reconocidos: el virus del papiloma humano (VPH) responsable de la totalidad de los casos del cáncer cervicouterino y anogenital (zur Hausen 2009). Los virus de la hepatitis B y C se relacionan con el carcinoma hepatocelular (Stuver, Boschi-Pinto et al. 1997), el virus del herpes tipo 8 con el sarcoma de Kaposi (Iscovich, Boffetta et al. 2000), el virus linfotrópico de las células T tipo 1 (HTLV-1) con los linfomas y la leucemia en adultos (Farias de Carvalho, Pombo de Oliveira et al. 1997), y el poliomavirus Merkel asociado a cáncer trabecular de piel (Chang and Moore 2012). Existen virus con papeles potenciales en neoplasias humanas, incluidos: el virus vacuolar 40 de simio (SV409 asociado a cáncer de cerebro, de hueso y mesoteliomas (Shah 2007), el virus BKV con cáncer de próstata (Delbue, Matei et al. 2013), el virus JC con cáncer de cerebro (Maginnis and Atwood 2009), el virus Torque teno con cáncer de pulmón, gastrointestinal y mieloma (zur Hausen and de Villiers 2009), y el virus del Tumor Mamario Murino con cáncer de mama (Holland and Pogo 2004).

Varios factores de riesgo han sido implicados en el cáncer de mama incluyendo la edad, dieta, nuliparidad, obesidad, e historia familiar. La predisposición genética (mutaciones en los genes BRCA1 y BRCA2), sólo representa aproximadamente el 5% de los cánceres de mama; se han hecho grandes esfuerzos para tener en cuenta el resto. El virus de tumor mamario murino (MMTV) ha sido implicado como uno de los factores que podrían explicar el resto de los casos esporádicos (Walsh and King 2007).

VIRUS DEL TUMOR MAMARIO MURINO MMTV

GENERALIDADES

El MMTV pertenece al género de los β retrovirus de mamíferos. Se presenta en dos formas: exógeno (virión) y endógeno (integrado en el genoma huésped). El virión posee dos cadenas de RNA(+), con un CAP en el extremo 5' y cola poli A en el extremo 3', estas cadenas están contenidas en una nucleocápside con las enzimas integrasa y retrotranscriptasa. El virión maduro posee una cápside externa recubierta por proteínas (Fig. 6) (Hulo, de Castro et al. 2011).

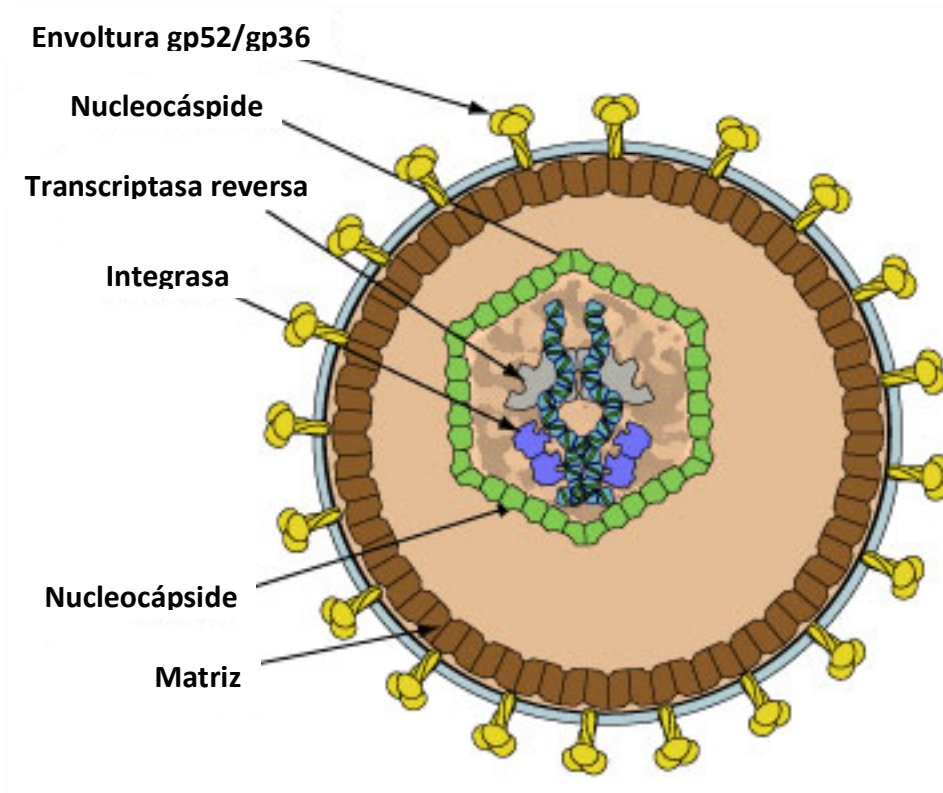


Figura 8. Esquema de un virión de MMTV maduro. Se muestra la disposición del material genético RNA, empaquetado en una nucleocápside (verde), recubierta a su vez por una matriz de proteínas de envoltura (café y amarillo). Este virión tiene capacidad infectiva. Modificado de (Hulo, de Castro et al. 2011).

El genoma del MMTV exógeno y endógeno está compuesto por los genes Gag, Pol y Env (Fig. 7).

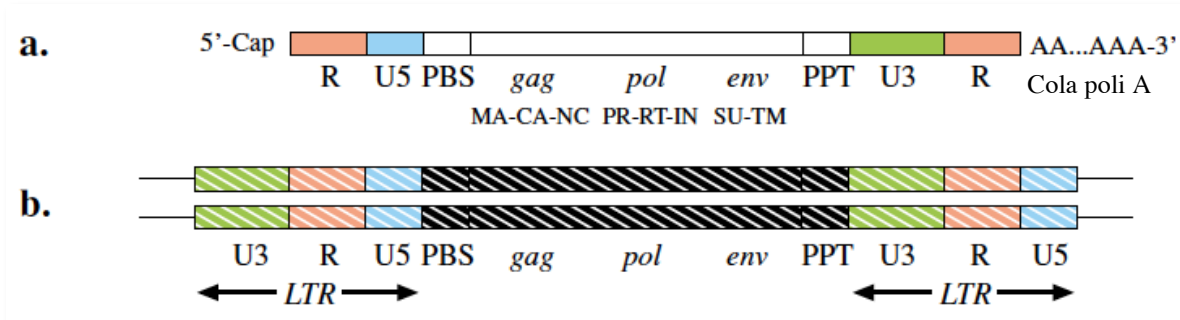


Figura 9. Organización genómica del retrovirus MMTV. a) Se muestra la disposición de los genes en la cadena de RNA, cuando el virus se encuentra en forma exógena, es decir dentro del virión. b) Organización del virus endógeno ya integrado en el genoma huésped. Sitio de unión a primer (PBS), tracto de polipurina (PPT), long terminal repeat (LTR), nucleocápside (NC), proteínas de cápside (CA), matriz proteica (MA), proteasa (PR), transcriptasa reversa (RT), integrasa (IN), proteínas de superficie (SU) y proteína transmembranal (TM). Tomada de (Burmeister 2001).

Gag tienen labor arquitectónica, ya que codifica proteínas estructurales de la nucleocápside (NC), proteínas de la cápside (CA) y matriz proteica (MA). Pol se encarga de las funciones enzimáticas: codifica para una proteasa (PR), transcriptasa reversa con RNasa H (RT) y una integrasa (IN). Env determina la unión del virión con su célula huésped, codifica para proteínas de superficie (SU) y proteína transmembranal (TM) (Burmeister 2001).

En su forma de RNA (exógeno) esta flanqueado por regiones U5 y U3, las cuales mas tarde se convertirán en LTRs (long terminal repeats) cuando sea integrado en el genoma huésped (endógeno) (Fig. 6).

Los LTRs están compuestos por 3 regiones: U3, R y U5. (Fig. 6). En U3 se codifica la proteína Sag que facilita la replicación viral estimulando la proliferación de las células a las que infecta (Wang, Jiang et al. 2004), también se presentan elementos de respuesta a hormonas TEF-1. Las LTRs son necesarios para la integración del virus en el genoma huésped (Tabla 3).

A diferencia de los retrovirus de transducción (que incorporan oncogenes en su genoma), el retrovirus MMTV una vez integrado actúa en cis, es decir, no contiene secuencias derivadas de la célula huésped sino que transforma a las células mediante la integración en las proximidades de un oncogen o supresor de tumor celular. Los retrovirus que actúan en cis conservan todos sus genes virales (Tanaka, Dong et al. 1991).

CICLO DE VIDA

En ratones el MMTV causa adenocarcinomas en el epitelio mamario, su transmisión puede ser por vía exógena o endógena. En la vía endógena los ratones heredan el genoma viral a través de la vía germinal e infectan a las células de todo el cuerpo. Este virus endógeno reacciona al estrógeno durante la lactancia, debido a sus, estimulado por las hormonas esteroides y prolifera en las glándulas mamarias; las partículas virales son secretadas por medio de la leche y se transmiten a la progenie por la vía exógena (Mant, Gillett et al. 2004).

El virus ingresa al aparato digestivo de los lactantes e infecta linfocitos B de las placas de Peyer intestinales, para que esta infección se eficiente se requiere de la expresión de la proteína SAg (superantígeno). Esta se une al complejo principal de histocompatibilidad de clase II (MHC II) para estimular a las célula T mediante la interacción con el dominio V β del receptor de células T. Las reacciones inmunes resultantes conducen a la expansión clonal preferencial de células B infectadas, incluyendo las de memoria. Una infección estable de MMTV se lleva a cabo por lo tanto, lo que resulta en la propagación de una variedad de superficies epiteliales, de las cuales el epitelio mamario es el más común (Fig. 8) (Acha-Orbea, Finke et al. 1999).

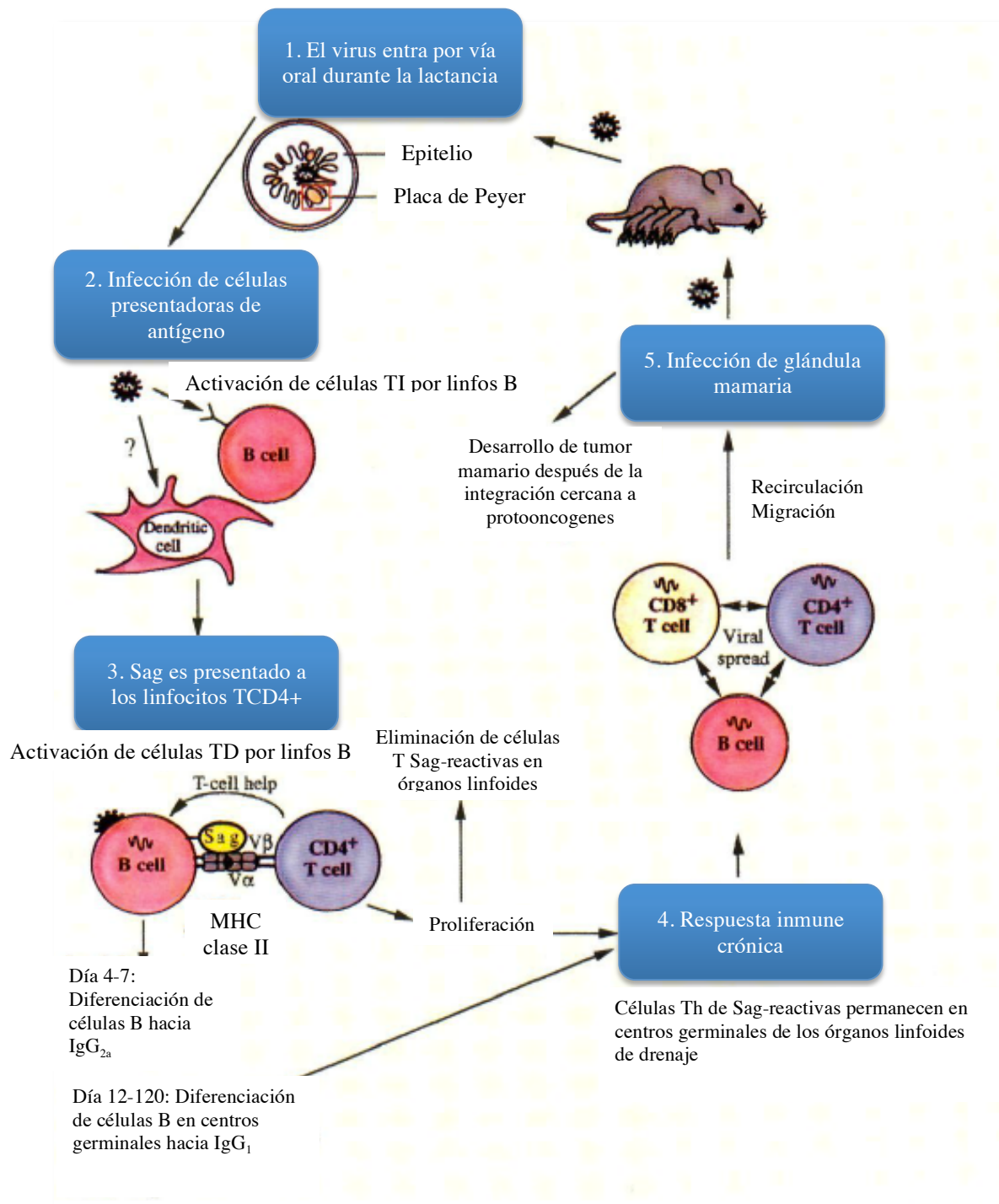


Figura 10. Ciclo de vida de MMTV. Debido al pequeño tamaño de las Placas de Peyer en neonatos, muchos de los mecanismos de infección fueron determinados en ratones adultos infectados vía subcutánea con el virus, analizando su comportamiento en órganos linfoides como ganglios y bazo. No obstante es posible comparar la respuesta inmune de neonatos y adultos, Tomada de (Acha-Orbea, Finke et al. 1999).

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Estudiar la mutagénesis insercional del retrovirus MMTV-like en tumores de mama de mujeres mexicanas.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar la presencia del retrovirus MMTV-like en tumores de mama y su respectivo tejido adyacente, mediante la detección de un segmento del gen env.
- Evaluar la expresión del gen env involucrado en la construcción de la partícula viral.
- Clonar las inserciones provirales de MMTV-like y secuenciar las regiones genómicas humanas flanqueantes.

ANTECEDENTES

MMTV Y SU RELACIÓN CON EL CÁNCER DE MAMA EN HUMANOS

John Bittner y otros investigadores del Laboratorio Jackson en Maine, EUA, descubrieron un factor que se transmitía por la leche materna y causaba cáncer de mama entre ratones (Bittner 1936). Mas tarde se determinó que el factor era el MMTV. De este descubrimiento surgió un pregunta obvia: ¿puede un virus similar causar cáncer de mama en humanos?. Se dio un intenso periodo de investigación décadas posteriores a la Segunda Guerra Mundial, consiguiendo una serie de observaciones inconclusas. Estas incluyeron la identificación por microscopia electrónica de virus en leche materna humana, que tenían características similares al MMTV y la detección de la glicoproteína 52 de MMTV como antígeno presente en tumores de mama (Moore, Charney et al. 1971).

Otros estudios a principios de los 80's investigaron la reacción cruzada de antígenos de MMTV y anticuerpos en suero de pacientes con cáncer de mama, dichos estudios reportaron correlación positiva (Witkin, Sarkar et al. 1980, Holder and Wells 1983).

Los estudios con anticuerpos y antígenos fueron reemplazados gradualmente por biología molecular. Inicialmente se demostró que las secuencias de DNA de MMTV hibridaban con tumores de mama humanos, pero pronto se dieron cuenta que el genoma humano normal también contenía secuencias similares (Callahan, Drohan et al. 1982, May, Westley et al. 1983). Estas secuencias fueron designadas como retrovirus endógenos humanos (HERVs).

Se estima que el 8% de nuestro genoma está compuesto por HERVs. Las infecciones virales ancestrales han estado presentes en nuestra evolución,

dejando evidencias en el genoma. Parece que la mayoría de los HERVs ingresó hace millones de años, sin embargo, la presión evolutiva ha provocado la inactivación de algunos, dando lugar a la idea de que son simplemente “DNA basura”. Aunque muchos de estos elementos han sido inactivados con el tiempo por la acumulación de mutaciones deletéreas, o recombinación interna, varios miembros de la familia HERV-K han sido identificados casi intactos capaces de formar partículas virales y probablemente representan eventos de integración reciente (Hughes and Coffin 2004).

Los HERVs han sido una fuente potencial de diversidad genética en el genoma humano, pueden influir en la regulación del genoma ya sea mediante reordenamientos (transposiciones intracelulares) o controlando la expresión génica, con lo que se crean nuevos entornos genómicos y nuevas funciones. (Hughes and Coffin 2001). Aunque la función exacta de HERVs aun tiene que ser plenamente aclarada, algunos estudios han sugerido que podrían desempeñar un papel en la carcinogénesis. Algunos HERVs han sido implicados principalmente por la expresión de mRNA y sus proteínas funcionales para formar partículas retrovirales en ciertos tipos de cáncer, están relacionados también con la generación de nuevos promotores y la activación de oncogenes (Acha-Orbea, Finke et al. 1999).

Los estudios actuales se centran en la asociación de HERV de la familia K, (HERV-K) con tumores de células germinales (Sauter, Schommer et al. 1995), cáncer de mama y ovario (Bera, Tsukamoto et al. 1998), melanoma (Buscher, Trefzer et al. 2005), y cáncer de próstata (Tomlins, Laxman et al. 2007). Ninguno de estos estudios proporciona evidencia convincente que la expresión de HERV-K contribuye a la tumorigénesis y es igualmente posible que la expresión de los genes pueden simplemente representar una consecuencia de la transformación celular.

Antes de la secuenciación de ácidos nucleicos, era difícil distinguir entre MMTV y los HERVs, por lo que muchos científicos optaron por dedicarse a otros intereses (Ono 1986, Ono, Yasunaga et al. 1986).

En 1995, un grupo de investigación dirigido por Beatriz Pogo del Mount Sinai Hospital, NY, USA, identificó una secuencia del gen env de MMTV en tumores de mama de mujeres que tenía baja homología con los HERVs (57%) (Wang, Holland et al. 1995). Esto permitió la identificación del MMTV-like, que podía ser distinguido de las miles de secuencias de HERVs en el genoma humano normal. El virus MMTV-like como término, se utilizará en este trabajo, en lugar de los empleados en otras investigaciones tales como Virus del Tumor Mamario Humano (HMTV), o Virus del Tumor Mamario Murino (MMTV). Esto debido a que el material genético del MMTV-like encontrado en tumores de mama humano puede ser el mismo MMTV con solo 5% de variación en su genoma. Por otro lado, el término MMTV-like está tan bien establecido que los lectores pueden entender inmediatamente el tema de discusión.

Ha surgido un interés mundial en investigar al retrovirus MMTV-like como un agente implicado en cáncer de mama en humanos. Se han acumulado pruebas que proponen una posible etiología viral del cáncer de mama en humanos.

MMTV-LIKE PRESENTE EN MUESTRAS DE TUMORES DE MAMA HUMANOS

En lo que se refiere al material genético viral, secuencias del gen env de MMTV-like han sido identificadas en varios estudios, de nueve laboratorios independientes. Todos estos trabajos usaron los oligos diseñados por Wang en 1995, que tienen una baja homología con los HERVs. En estos estudios, se usaron 1,337 tumores de mama y secuencias del MMTV-like fueron identificadas en 346 (25.8%). El porcentaje de muestras positivas es variable, desde un 73% en pacientes de Túnez hasta algunos países en donde los investigadores no han identificado secuencias de MMTV-like (Austria, Japón, Reino Unido) (Tabla 3).

Tabla 6. Estudios en donde evalúan el posible papel de MMTV-like en cáncer de mama de humanos.

País	Casos/MMTV+ (%)	Referencia
Argentina	74/23 (31%)	(Melana, Picconi et al. 2002)
Australia	45/19 (42.2%)	(Ford, Tran et al. 2003)
Australia	136/44 (32%)	(Ford, Faedo et al. 2004)
Austria	50/0 (0%)	(Witt, Hartmann et al. 2003)
Estados Unidos	73/27 (37.0%)	(Etkind, Du et al. 2000)
Estados Unidos	29/18 (62%)	(Wang, Melana et al. 2003)
Estados Unidos	314/121 (38.5%)	(Wang, Holland et al. 1995)
Estados Unidos	12/6 (50%)	(Etkind, Stewart et al. 2004)
Italia	106/32 (30.1%)	(Melana, Holland et al. 2001)
Japón	46/0 (0%)	(Fukuoka, Moriuchi et al. 2008)
México	119/5 4.2%)	(Zapata-Benavides, Saavedra-Alonso et al. 2007)
Reino Unido	44/0 (0%)	(Mant, Gillett et al. 2004)
Túnez	38/28 (73.7%)	(Levine, Pogo et al. 2004)
Vietnam	120/1 (0.8%)	(Ford, Tran et al. 2003)
China	131/22(16.8%)	(Luo, Wu et al. 2006)

Se realizó un ensayo para la detección de MMTV-like basado en PCR fluorescente, en donde se observó la presencia del virus en 33% de 45 tejidos frescos. El análisis de secuencia confirmó que los fragmentos virales amplificados a partir de tumores de mama fueron similares al genoma del MMTV-like. Sería de gran ayuda emplear una técnica más sensible que la PCR fluorescente para la detección de MMTV-like (Zammarchi, Pistello et al. 2006).

La mayoría de los ensayos para identificar MMTV-like se hicieron en base a la detección de una secuencia del gen env. Sin embargo en 2001, se amplificó el genoma proviral completo de MMTV-like a partir de dos muestras de tumores de mama humanos. Este provirus de 9.9Kb de tamaño tuvo una homología de 95% con el MMTV, mostró características típicas de replicación de un virus competente: codones de terminación conservados, marcos de lectura abierto para

superantígeno y elementos de respuesta a hormonas, el grupo de investigación lo llamo Virus de Tumor Mamario Humano o HMTV (Liu, Wang et al. 2001).

Se han aislaron partículas virales en fluidos pleurales de pacientes con cáncer de mama metastásico quienes también fueron positivo para MMTV-like, las partículas virales mostraron similitud a retrovirus tipo B, de 100 a 110nm, con forma esférica un núcleo central denso y presencia de cápside madura (Melana, Nepomnaschy et al. 2007).

Los resultados de dos trabajos independientes muestran claramente que las células de cáncer de mama en cultivos primarios son infectadas por partículas virales similares al MMTV-like (Indik, Gunzburg et al. 2005, Melana, Nepomnaschy et al. 2007). El MMTV-like estuvo presente en el cáncer de mama de un padre, una madre y su hija, todos habitando la misma casa desde hace décadas, lo cual sugiere la posibilidad de un agente ambiental como un factor etiológico común (Etkind, Stewart et al. 2008).

Se confirmó la presencia de secuencias génicas y de partículas virales de MMTV en la leche humana de mujeres sanas. Como es sabido, MMTV se transmite a través de la leche de las madres de ratón a sus crías recién nacidas, lo que puede causar tumores de mama cuando se convierten en adultos (Johal, Ford et al. 2011).

La presencia de MMTV-like está correlacionada con el estadio del tumor, secuencias del gen env estuvieron el 23% de carcinoma ductal infiltrante (CDI) grado I, 34% en CDI grado II y 38% en CDI grado III (Ford, Tran et al. 2003).

Las secuencias virales de MMTV-like son prácticamente indetectables en tejido normal, por lo que se piensa que las presentes en los tumores podrían tener un origen exógeno (Wang, Holland et al. 1995, Holland and Pogo 2004).

TRANSMISIÓN DE MMTV-LIKE A HUMANOS

No está claro como es adquirido el virus por los seres humanos. Una transmisión a través de la leche se ha considerado. En 1998 se abordó esta hipótesis, mediante la evaluación del riesgo de padecer cáncer de mama en mujeres que eran amamantadas por madres que posteriormente desarrollaron la enfermedad. En este estudio no se encontró evidencia de una asociación positiva entre haber sido amamantado y el riesgo de cáncer de mama. También se demostró que el cáncer de mama no se incrementó por haber sido amamantado por una madre que posteriormente desarrollará la enfermedad. Estos hallazgos tienen un fuerte argumento en contra de la presencia de dicho agente transmisible en la leche materna humana (Titus-Ernstoff L, Egan KM et al. 1998).

Sin embargo esto no excluye la posibilidad de un origen zoonótico. Varios grupos han tratado de explicar la variación en la distribución geográfica del cáncer de mama basándose en la incidencia de la distribución de ratones domésticos del género *Mus*: *M. musculus*, *M. castaneus* y *M. domesticus* (Stewart, Sage et al. 2000). *M. domesticus* está presente en Europa Oriental y *M. musculus* en Europa Occidental. Tomando en consideración que el MMTV se presenta tanto como partículas exógenas como provirus endógeno, se observó que los ratones *M. domesticus* contenían más virus exógeno y *M. musculus* tenía más loci de provirus. Basándose en la incidencia de cáncer de mama de humano, se mostró que el cáncer es mayor en Europa Occidental, habitada por *M. domesticus* que en Europa Occidental donde habita *M. musculus* (Stewart, Sage et al. 2000).

Curiosamente el MMTV-like ha sido aislado de cáncer de mama humano en regiones habitadas por *M. domesticus*, esto incluye América del Norte, Australia y Túnez. Mientras que las regiones no habitadas por estos ratones, incluyendo Vietnam, Suecia y Austria, son áreas donde MMTV-like no ha sido aislado de cáncer de mama de humanos (McLaughlin-Drubin and Munger 2008).

MUTAGÉNESIS INSERCIONAL DEL MMTV

El mecanismo de transformación maligna de MMTV es por mutagénesis insercional. La inserción proviral en el genoma de las células epiteliales mamarias puede conducir a la inapropiada activación transcripcional de genes adyacentes u otros eventos mutagénicos que causan transformación oncogénica en células infectadas, en consecuencia la tumorigénesis es impulsada por la activación de oncogenes o inactivación de supresores de tumor (Fig. 9). Por lo tanto la mutagénesis insercional es potencialmente uno de los modelos biológicos mas eficientes hasta ahora para descubrir genes implicados en la tumorigénesis mamaria (Nawijn, Alendar et al. 2011).

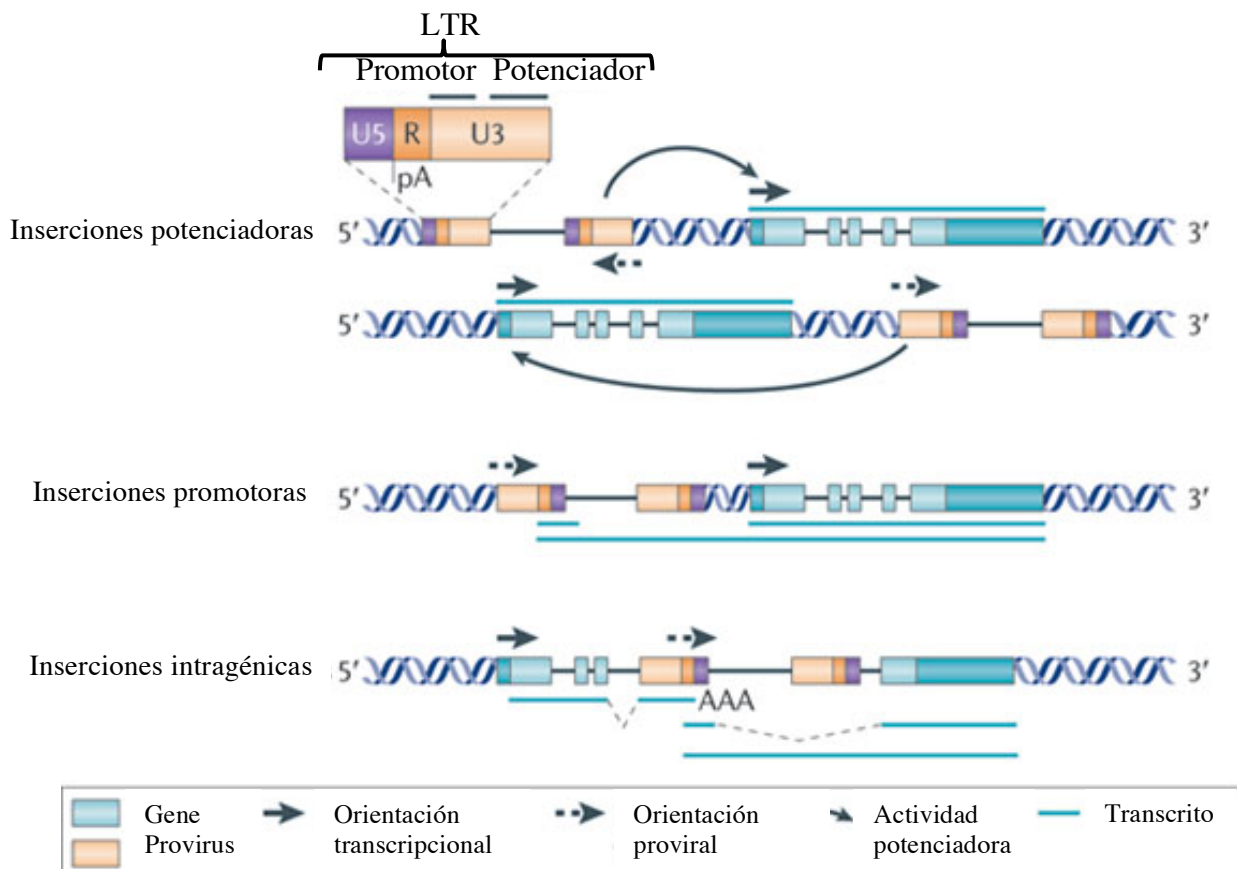


Figura 11. Eventos de mutagénesis insercional. La LTR contiene una región promotora. La integración proviral puede conducir a la sobreexpresión de genes vecinos en virtud de los elementos potenciadores que están presentes en las LTR, o por la inserción del promotor que crea fusión de transcritos virus-huésped. Además la integración en regiones codificantes puede dar la inactivación de la transcripción. Tomado de (Nawijn, Alendar et al. 2011).

La identificación de los genes que contribuyen a la transformación neoplásica se logra mediante la clonación de inserciones provirales y secuenciación de las regiones genómicas flanqueantes. Los locis que contienen inserciones provirales en tumores independientes a frecuencias mas altas de lo esperado por azar, se llaman sitios comunes de integración (CIS) y son susceptibles de albergar genes implicados en el desarrollo del tumor (Faschinger, Rouault et al. 2008).

En modelo murino, se han identificado 33 CIS, de los cuales 17 están asociados con cáncer de mama. El 63% de las inserciones provirales están asociadas a la familia Wnt y el 67% con la familia Fgf. Hay 13 CIS que no habían sido previamente vinculados con cáncer en general, dentro de ellos están los genes: Rspo3 y Rspo2 perteneciente a la familia de trombospondina tipo I con funciones de transducción de señales por tirosin cinasas y los genes Adamts que codifican proteasas involucradas en angiogénesis. Es interesante conocer los genes ortólogos responsables de cáncer de mama en humanos (Theodorou, Kimm et al. 2007).

JUSTIFICACIÓN

El cáncer de mama es aún un importante problema de salud pública en México que afecta en lo individual, a la familia, la sociedad y al sistema de salud. Actualmente, una prioridad en investigación biomédica es la generación de evidencia sobre factores causales del cáncer de mama y el conocimiento del ámbito molecular implicado en el avance de esta enfermedad, lo que en un futuro permitirá traducir estos hallazgos de investigación a herramientas con aplicación en la práctica clínica.

Los retrovirus causan alteraciones en el genoma huésped debido a la mutagénesis insercional, por lo que son un modelo biológico útil para dilucidar que genes humanos se encuentran afectados durante el proceso de carcinogénesis. Es prioritario estudiar si la presencia del retrovirus MMTV-like podría actuar como un agente de promoción o como un factor etiológico relacionado con la transformación maligna.

METODOLOGIA

OBTENCIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO

Se efectuó un muestreo de casos consecutivos en el que se obtuvieron tumores mamarios de mujeres que acuden al Hospital de Oncología de Centro Médico Nacional Siglo XXI, Hospital de Gineco Obstetricia Núm. 4 del IMSS e Instituto Nacional de Cancerología. Se extirpó el tumor y un margen de tejido sano circundante en 127 pacientes diagnosticadas con cáncer de mama.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Mujeres mayores de 30 años de edad con diagnóstico de cáncer de mama en varias etapas. Las mujeres deberán otorgar su consentimiento para la realización del estudio.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

Tratamiento previo al momento de la toma de muestra (quimioterapia y radioterapia).

EXTRACCIÓN DE DNA TOTAL

Se empleó el paquete comercial DNAeasy (#Cat 69581, Quiagen) y el equipo automatizado QIAcube (Quiagen), el cual permitió una concentración y pureza similar en las muestras. Se pesaron 100mg de tumor de mama y 100mg de tejido no afectado. El tejido fué digerido con 20µl de proteinasa K (20mg/ml) y 180µl de Buffer AP1. Se incubó 12h a 55°C. El tejido digerido fué usado para la extracción de DNA en el QIAcube, siguiendo las instrucciones del paquete comercial QIAamp

DNA Mini QIAcube Kit. Las muestras fueron almacenadas a -80°C hasta su uso. Se determinó la pureza e integridad mediante análisis espectrofotométrico y electroforesis, respectivamente.

AMPLIFICACIÓN DE DNA GENÓMICO

Para tener mayor cantidad de material genómico para los ensayos posteriores, las muestras de DNA se sometieron a amplificación completa de DNA genómico, usando el paquete comercial Whole Genome Plex de SIGMA (#Cat WGA2-500RXN), basado en una librería de random primers OmniPlex, el cual amplificó el DNA genómico total hasta mil veces, por lo que a partir de 10ng de DNA genómico se pudieron obtener hasta 10 μg . Se realizó electroforesis en agarosa para observar la amplificación completa del DNA, lo cual se evidencía con un barrido de DNA de 400 a 1000pb. Los productos finales fueron purificados con el paquete comercial PCR Clean Up Kit (#Cat NA1020) de SIGMA, y el DNA se eluye en 50 μl . Se determinó la concentración y pureza mediante espectrofotometría.

PCR PARA EL GEN GAPDH

Se evaluó la calidad del DNA extraído mediante la amplificación de un fragmento de 700pb del gen GAPDH con el siguiente par de primers: 5' AGCCCCTAAGGTCTTCAAGC 3' y 5' CATGCCTGTAGCTGGGACTA 3'. Las condiciones de amplificación en el termociclador (AxyGen, MaxiGen) fueron: 94°C 10' y 35 ciclos (94°C 0.5'. 56°C 0.5' y 72°C 0.5') y una extensión final a 72°C por 8' (van Beers, Joosse et al. 2006).

PCR ANIDADA DE PUNTO FINAL PARA EL GEN ENV DE MMTV

Se amplificó primero un segmento de 660pb del gen env de MMTV-like, y este producto de PCR fue el molde para amplificar el segundo segmento (250pb). Los oligos para el segmento de 660pb fueron: 5'CCTCACTGCCAGATC 3' y 5'GAATCGCTTGGCTCG 3'. Para la amplificación del fragmento de 250pb los oligos fueron: 5' TACATCTGCCTGTGTTAC-3' y 3N: 5' ATCTGTGGCATAACCT 3'. Las reacciones contuvieron: 200 ng de DNA y 20 pmoles de cada oligo. El termociclador (AxyGen, MaxiGen) fue configurado primero para una activación de la polimerasa a 94°C por 10 min seguido por 35 ciclos de: 94°C, 1 min 30 seg; 55°C, 2 min seg y 72°C, 3 min; el tiempo final de extensión fue de 10min a 72°C. De acuerdo al método reportado por Wang en 1995. El marcador de pares de bases fué 1kb plus ladder (Gibco BRL). Como control negativo se incluirán reacciones sin molde y como control positivo se usará la construcción del gen env de MMTV cepa C3H en pBR322 y propagado en Escherichia coli XL1 Blue (Cat 45006, ATCC) (Wang, Holland et al. 1995). Los productos de PCR fueron secuenciados usando el método Sanger con terminadores fluoroescuentes en un secuenciador capilar automatico ABI 3100 en la Unidad de Biotecnología y Prototipos de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM.

TRANSFORMACIÓN DE LA CEPA XL1 BLUE DE ESCHERICHIA COLI CON PBR322

La cepa XL1 Blue fue donada por el laboratorio de Genética de la Unidad de Morfología y Función de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala. El plásmido (pBR322) con el gen env fue comprado a la ATCC. Para la obtención de células competentes se inoculó una colonia aislada de la cepa XL1 Blue en 5ml de medio de cultivo líquido Luria Bertani (LB), incubando a 37°C, en agitación constante (300rpm) durante 16hr, posteriormente este cultivo se adicionó a 100ml de medio LB, y se incubó a 37°C, en agitación constante (300rpm) hasta que la población bacteriana se encontró en fase de crecimiento exponencial, posteriormente se enfrió en hielo por 5min. Se obtuvieron las células bacterianas mediante

centrifugación a 5,000rpm durante 10min a 4°C. Se resuspendió suavemente el pellet en 25ml de cloruro de calcio 0.1M frío, a continuación se centrifugó 8min a 5,000rpm a 4°C. Se resuspendió el pellet en 25ml de cloruro de calcio 0.1M frío. Se incubó en hielo durante 20min para posteriormente centrifugar a 5,000rpm durante 10min a 4°C. Se resuspendió el pellet en 4.3ml de cloruro de calcio 0.1M mezclado con 1ml de glicerol y se crearon alícuotas de 100µl en frío. Las células competentes se almacenaron a -70° antes de su uso (Sambrook and Russell 2006).

Para la transformación se agregó 10ng de pBR322 (env) a 100 µl de células competentes. Se incubó 30min a 4°C. Se dio un choque térmico a 42°C por 30seg, y posteriormente se mantuvieron 2min en hielo. Se adicionó 1ml de medio LB y se incubaron 60min en agitación constante (200rpm) a 37°C. El plásmido pBR322, contiene una región que codifica para resistencia al antibiótico tetraciclina. Utilizando un medio que contenga este antibiótico, es posible seleccionar las bacterias que han incorporado el vector. De esta manera, por lo dicho anteriormente, es esperable que solo sobrevivan las bacterias transformadas. Las células se sembraron en agar LB con tetraciclina 20µg/ml como marcador de selección en cajas Petri, las cuales se incubaron 16h a 37°C. Como control de transformación se sembraron células competentes no transformadas en agar LB con tetraciclina 20µg/ml.

Se seleccionarán las clonas que hayan adquirido el plásmido las cuales se inocularon en 5ml de medio líquido LB hasta su fase exponencial y se purificaron los plásmidos pBR322 (env) con el paquete comercial QIaprep Miniprep (27106, Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante.

EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL

Se empleó el reactivo TRIzol (#Cat 15596-026, Invitrogen) que contiene isotiocianato d guanidina y cloroformo. Se pesaron 20mg de tumor de mama y 20mg de tejido no afectado. El tejido fué triturado a 60Hz por 6min, usando el equipo Tissue Lyser. El homogenizado fué sometido a extracción de RNA total con TRIzol siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras se almacenaron a -80°C hasta su uso.

RETROTRANSCRIPCIÓN

Para la síntesis de cDNA a partir de RNA de tumores de mama y tejido no afectado, se empleó el paquete comercial High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (#Cat 4375575, Applied Biosystems). Se usaron 2µg de RNA como molde e iniciadores Random Primers. El programa del termociclador fué: 1) 10min a 25°C, 2) 120min a 37°C y 3) 5min a 85°C.

ELIMINACIÓN DE DNA CONTAMINANTE Y PCR DE GAPDH Y HPRT

Para eliminar trazas posibles de DNA contaminante se empleó DNAsa (# Cat 04716728001, Roche). Incubando el RNA total durante 15min con 2U de DNAsa, se detuvo la reacción con EDTA a una concentracion final de 8mM y se calentó a 75°C por 10min. Para evaluar la calidad de la retrotranscripción se emplearon oligos HPRT que producen un amplicon de 650pb: 5' GTTGGATACAG GCCAGACTTTGTTG 3' y 5' GAGGGTAGGGCTGGCCTATGGCT 3'.

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA EN TIEMPO REAL

El cDNA de tumores de mama y tejido no afectado fue utilizado para evaluar la expresión del gen env MMTV-like usando sondas TaqMan. La sonda del gen env es 6FAM.TGTTTCTGTTCTACAAAGACC.MGBNFQ. Las secuencias de los iniciadores del gen env son: 5' AAGGGTGATAAAAGGCGTATGTG 3' y 5' TTTTGTATTGGCCCCTGAGTTC 3'. Para la PCR se prepararon 20µl de volumen final de reacción que contiene: 1.0µl de 20X TaqMan Gene Expression Assay, 10µl de 2X TaqMan Master Mix, 4.0µl de molde DNA (1 a 100ng), 1.0µl de primers y 4.0µl de agua MiliQ. Se incluyeron dos réplicas de cada reacción. El programa de temperatura en el termociclador constó de tres pasos: 1) 10min a 95°C para activar a la polimerasa AmpliTaq Gold y 2) 40 ciclos: 15seg a 95°C (desnaturalización) y 1min a 60°C (alineamiento y extensión). Se incluyeron como control negativo reacciones sin molde y como controles positivos se utilizó la construcción del gen env del MMTV cepa C3H en pBR322 y propagado en Escherichia coli HB101 (Cat 45005, ATCC). Para la determinación del número de copias se realizaron curvas patrón de concentraciones conocidas del genes env (construcción en pBR322) y se hizo análisis de regresión.

IDENTIFICACIÓN DE GENES FLANQUEADOS POR MMTV

Para detectar e identificar el DNA flanqueado por secuencias LTR del MMTV-like se utilizó el método modificado de PCR splinkerette reportado por Theodorou Vassiliki (Theodorou, Kimm et al. 2007).

Las muestras de DNA positivas para MMTV (2ug) se sometieron a digestión con 20U de la enzima Xho II (Promega) durante 6h a 37°C, inactivando después a 10min a 65°C. Como control de digestión se usó plasmido pBR322, el cual tiene ocho sitios de corte para la enzima Xho II. Los productos de digestión se desalaron con columnas Amicon Ultra 0.5 (Millipore).

Posteriormente se construyeron los adaptadores splinkerette, mezclando los oligos 4HMSP-A: CGAAGAGTAACCGTTGCTAGGAGAGACCGTGGCTGAATA GACTGGTGTGCGACATCGATGG y 4HMSP-BD: GATCCCATCGATGTCCG ACACCAGTCTCTAATTTTTTTTTTTCAAAAAA a 150pmol c/u. Se incubaron a 95°C durante 5min y se enfriaron a temperatura ambiente a una tasa de 1°C/15seg.

Se ligaron los productos de digestión con los adaptadores usando 20U de Ligasa T4 (New England), incubando 16h a 4°C. El producto de ligación que contiene adaptador splinkerette, DNA humano y LTR 5' viral, fueron sometidas a digestión con 20U de enzima Dra I (Promega), para evitar ampliación de secuencias internas del virus. Se incubaron 2h a 37°C. El producto de digestión se desalo con columnas Amicon (Millipore).

Se realizo una primera PCR usando los siguientes oligos 4HMSP-1a: AGAGTAACCGTTGCTAGGAGAG que se une al adaptador splinkerette y el oligo LTR-beg2+6: GTCTTTGTCTGATGGGCTCATCCGTTTGTG que se une a la LTR 5' viral. Del producto de PCR obtenido se tomo 1ul y se uso como molde para una segunda PCR con los oligos 4HMSP-1a: AGAGTAACCGTTGCTAGGAGAG y LTR-beg4-C3H+1: CCCTAGGTGTAGGACACTCTCG.

SECUENCIACIÓN DE PRODUCTOS DE PCR SPLINKERETTE

Con el fin de conocer la secuencia adyacente a la LTR del MMTV-like, los productos de PCR fueron purificados con filtros Amicon Ultra 0.5 (Millipore). Y posteriormente se enviaron al Servicio de Secuenciación del Instituto Nacional de Medicina Genómica.

Se secuenciaron usando el sistema MiSeq de Illumina con el protocolo TruSeq que constó de una fragmentación del DNA por sonicación, reparación a extremos romos, adenilación en 3', ligación de adaptadores, purificación de ligaciones,

validacion de librería y secuenciación. Las secuencias obtenidas se buscarán en bases de datos utilizando herramientas bioinformáticas basadas en algoritmos y programas de análisis, lo anterior con el fin de determinar los genes humanos afectados por mutagenesis insercional.

RESULTADOS

OBTENCIÓN DE LAS TUMORES DE MAMA Y TEJIDO ADYACENTE

Se obtuvieron muestras de tumores de mama y tejido no afectado de 127 pacientes diagnosticadas con cáncer de mama en 3 hospitales diferentes, 12 pacientes del Instituto Nacional de Cancerología, 60 pacientes del Hospital de Oncología de CMN Siglo XXI y 55 pacientes del Hospital de Gineco Obstetricia Núm. 4 del IMSS. La edad promedio fue de 58 años, el 18.9% de las pacientes estuvieron entre los 25 y 45 años de edad, el 40.9% entre los 46 y 60 años y el 41.7% de los 61 a 89 años. Los pacientes provenían de 18 estados de la República Mexicana, siendo el DF el más representativo con el 59% de la muestras, seguido del Estado de México con 7.8%. El tipo histológico más frecuente fue ductal infiltrante en 54.3%, seguido de carcinoma lobulillar infiltrante en el 7% de las pacientes (Tabla 4). El 75% de las pacientes presentó lactancia, el 32% refería tabaquismo y el 50% alcoholismo. Con el fin de ordenar los pacientes y proteger sus datos personales, a cada tejido se le asignó un número consecutivo.

Tabla 7. Pacientes diagnosticadas con diferentes tipos histológicos.

Tipo de cáncer de mama, según su histología	Número de pacientes (n=127)
Ductal Infiltrante	69
Mixto Ductal y Lobulillar	13
Lobulillar Infiltrante	9
Canalicular Infiltrante	6
Intraductal	4
Phylliodes Maligno	3
Mucinoso Puro	2
Tubulolobulillar	2
Canalicular Infiltrante y Lobulillar	1
Carcinoma Coloide	1
Carcinoma Lobulillar	1
Carcinoma Mixto Ductal y Lobulillar	1
Carcinoma Mucinoso Puro	1
Ductal in situ	1
Ductal Invasor	1
Ductal y Lobulillar	1
Ductal y Papilar	1
Micropapilar Invasor	1
Mixto Ductal Infiltrante y Micropapilar	1
Mixto Ductal Infiltrante y Lobulillar	1
Mixto Ductal y Mucinoso	1
Mixto Invasor Lobulillar y Ductal	1
Mixto Papilar y Ductal in situ	1
Mixto, Infiltrante Pleomórfico y Ductal	1
Papilar	1
Papilar + Ductal	1
Tubulolobular Invasor	1

AMPLIFICACIÓN DE DNA GENÓMICO TOTAL

De las muestras de DNA que no se tenía cantidad suficiente para los ensayos posteriores (n=146), se sometieron a amplificación de DNA genómico total. Al finalizar el procedimiento de amplificación, se obtienen fragmentos que van de 200 a 1,300pb. Cuando este grupo de fragmentos se somete a electroforesis en agarosa, se observa un corrimiento de DNA similar a un barrido (Figura 10), en donde cada carril representa una muestra de DNA que fue amplificada con esta tecnología.

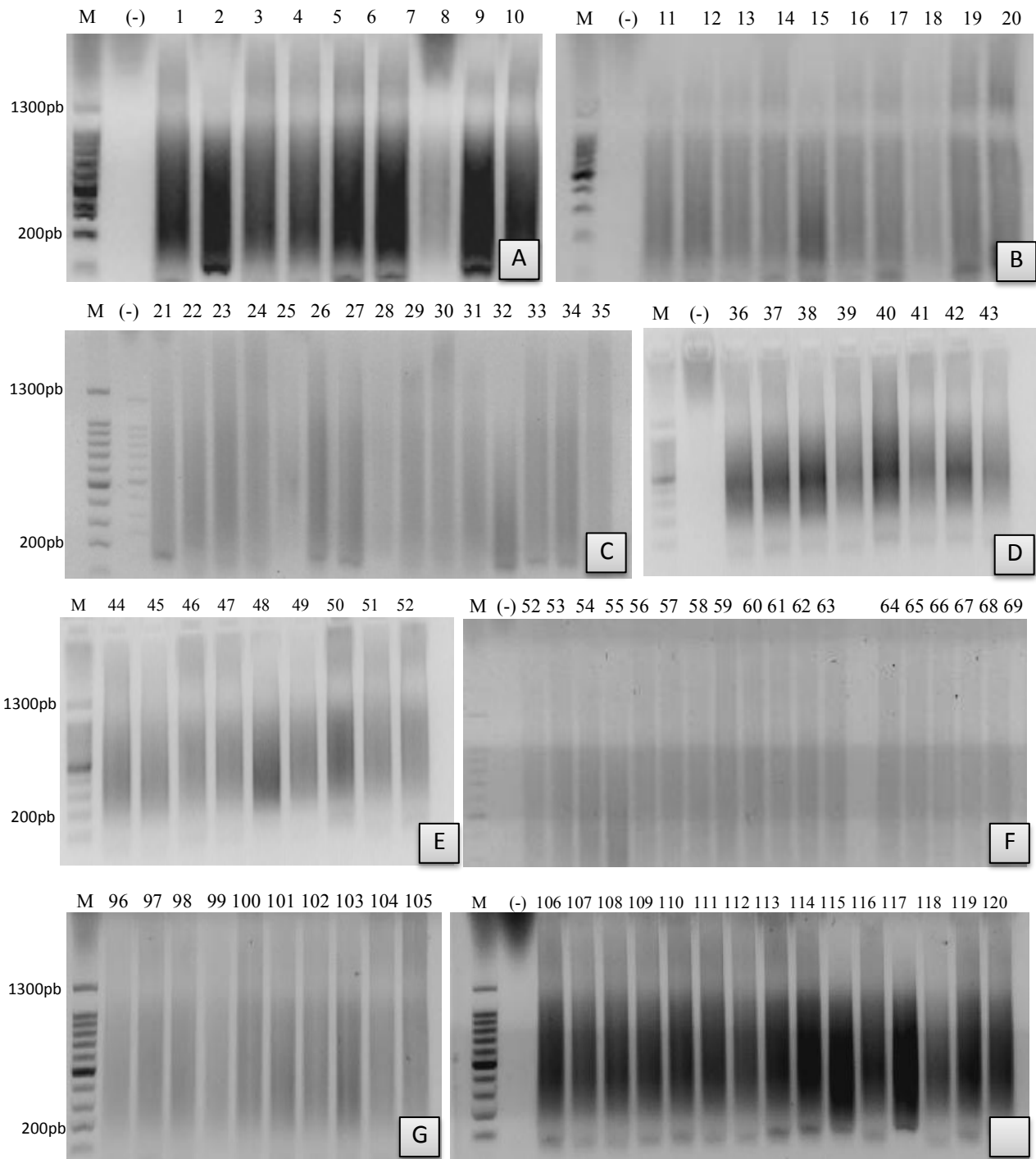


Figura 12. Amplificación de genoma completo de tumores de mama y tejido no afectado. La amplificación genómica enriquece el genoma completo en fragmentos de diversos tamaños, representados por un barrido desde 200 a 1300pb. A: muestras 1 -9; B: 11-20; C: 21-34; D: 36-43; E: 44-52; F: 52-69; G: 96-105 y H:106-120. Agarosa 1.5%, 90V. 3ul de muestra cargada en cada pozo, como control negativo (-) se uso reacción sin molde.

CUANTIFICACIÓN Y PUREZA

El tratamiento con el paquete comercial GenomePlex, implica el uso de enzimas de restricción, polimerasas, oligonucleótidos y amortiguadores, cofactores; los cuales deben eliminarse antes de que el DNA sea usado para otros ensayos. Para lo cual, las muestras se purificaron con un paquete comercial basado en la adsorción del DNA a una columna de sílica y su posterior elusión. En la tabla 5, se muestran los promedios de cuantificación y pureza del DNA para las muestras que fueron purificadas con este método. En el anexo 2 se detallan los datos para cada muestra.

Tabla 8. Relación de datos de concentración y pureza de DNA purificado a través de adsorción a columna de sílica. Para fines estadísticos solo se muestra el valor de la media y el rango menor a mayor.

Parámetro	Media n=146	Mínimo	Máximo
Concentración [ng/ μ l]	163.87	40.97	354.89
ng finales	8,193.5	2,048.4	17,744.5
Pureza 260/280nm	1.896	1.83	2.02

RENDIMIENTO DE AMPLIFICACIÓN DE DNA GENÓMICO

En base a la cantidad inicial de DNA utilizado para amplificación y la cantidad final obtenida. Se calculó la eficiencia del paquete comercial GenomePlex para algunas de las muestras amplificadas (Tabla 6).

Tabla 9. Eficiencia de amplificación de DNA genómico en 14 muestras. La metodología de amplificación genómica permitió utilizar poco material genómico inicial (desde 9.2ng) para obtener hasta 9.8ug al final de la amplificación.

260/280 inicial	260/230 inicial	gDNA (ng)	inicial	gDNA final (ng)	Factor de amplificación
1.91	0.22	9.2		9871.6	1073
2.05	0.96	9.26		5806.02	627
2.06	0.53	14.46		7027.56	486
2.25	1.07	15.86		14702.22	927
1.82	0.88	16.42		12906.12	786
2.00	1.12	18.68		6855.56	367
1.89	1.34	21.06		6044.22	287
1.93	0.72	28.08		7497.36	267
1.91	0.42	28.22		17722.16	628
1.96	0.69	33.4		7548.4	226
2.04	0.68	34.82		10933.48	314

PCR PARA EL GEN GAPDH

Se realizó PCR en 127 muestras de tejido tumoral y 127 muestras de tejido adyacente, para amplificar un segmento de 700pb del gen GAPDH, el cual esta presente en todas las células humanas. En la figura 11 se observan las electroforesis en agarosa de los productos de PCR para este segmento.

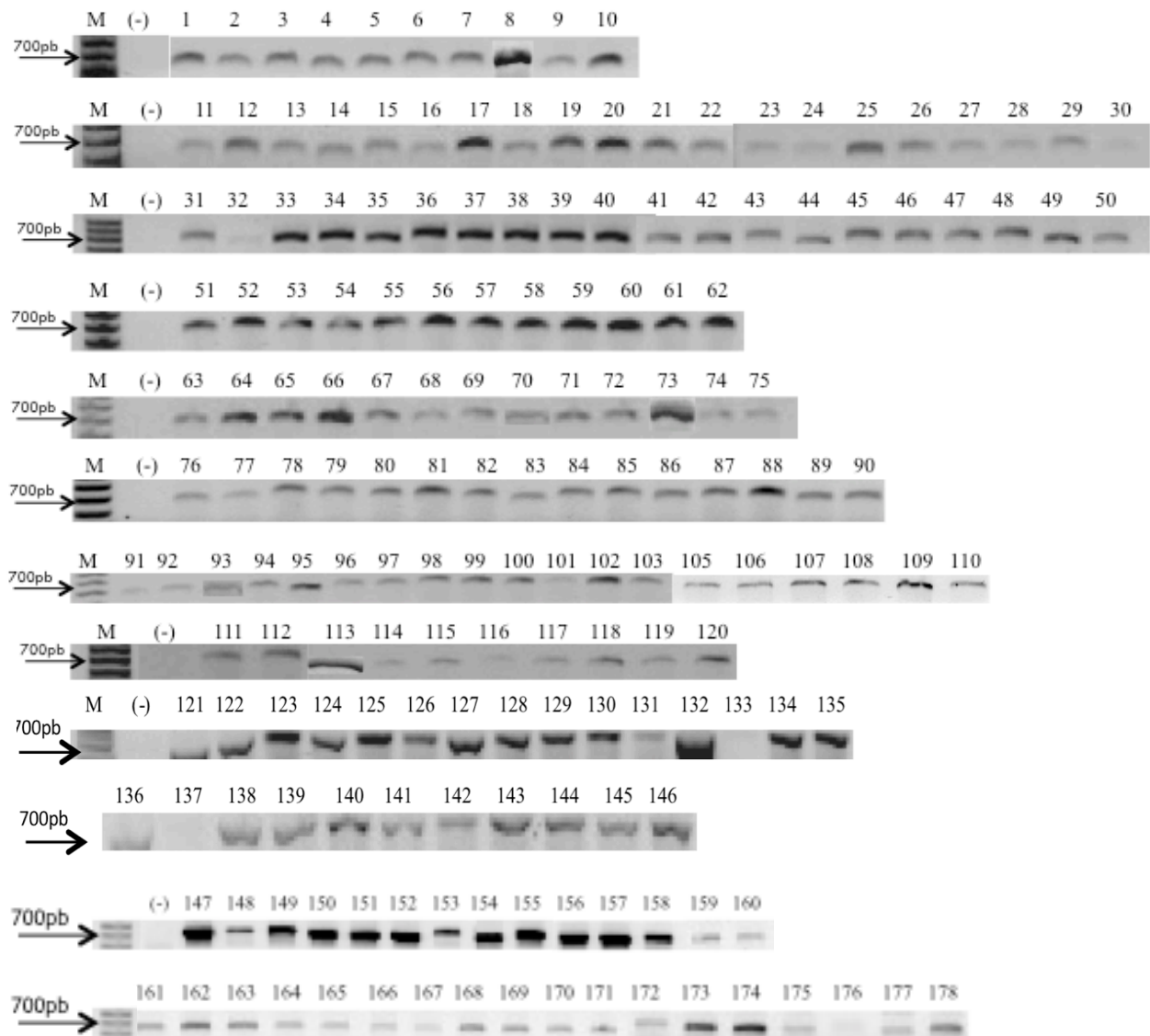




Figura 13. Integridad del DNA de tumores de mama y tejido adyacente. Electroforesis en agarosa al 1.5% a 90V de productos de PCR para el segmento de 700pb del gen *GAPDH*. Como control negativo se uso reacción sin molde. El marcador de pares de bases fue de 100pb. Las muestras impares corresponden a tumor y las muestras pares a tejido adyacente.

TRANSFORMACIÓN DE *E. COLI* (XL1 BLUE) CON PBR322 (ENV)

Para obtener controles positivos del gen env de MMTV, se transformaron células de *E. coli* (XL1 Blue) calcio-competentes con shock térmico, con el plásmido pBR322 env de MMTV. No se observó crecimiento de UFC en las cajas Petri controles. La eficiencia de transformación fue de 3.5×10^4 UFC/ μ g.

En todos los casos las extracciones de DNA plasmídico mostraron valores de A260/A280 de 1.8 a 2.0, los cuales son considerados aceptables en los Miniprep plasmídicos.

Para confirmar la presencia del gen env en las colonias transformadas se realizo una PCR para amplificar un segmento específico del gen env, con un tamaño de 660pb. En la figura 12 se observa en los carriles 2 y 3 este segmento de 660pb.

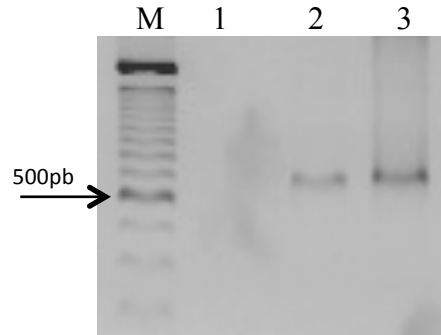


Figura 12. Productos de PCR para el gen env de MMTV a partir de plasmido pBR322. En los carriles 2 y 3 se muestran los amplicones de 660pb para el gen env de MMTV que contiene el pBR322. Como control negativo de amplificación se usó una reacción sin molde (carril 1). M: marcador de pares de bases.

IDENTIFICACIÓN DE LA PRESENCIA DEL GEN ENV DE MMTV

Secuencias del gen env de MMTV-like estuvieron presentes en el 10.2% de los pacientes. 10 muestras corresponden a tumores y 3 a tejidos adyacentes de diferentes pacientes.

La figura 13 muestra los productos de PCR anidada. Las muestras 75, 100 y 61b corresponden a tejido adyacente positivo para MMTV-like y las muestras restantes para tejido tumoral. El control positivo (env de MMTV C3H) amplificó en todos los experimentos.

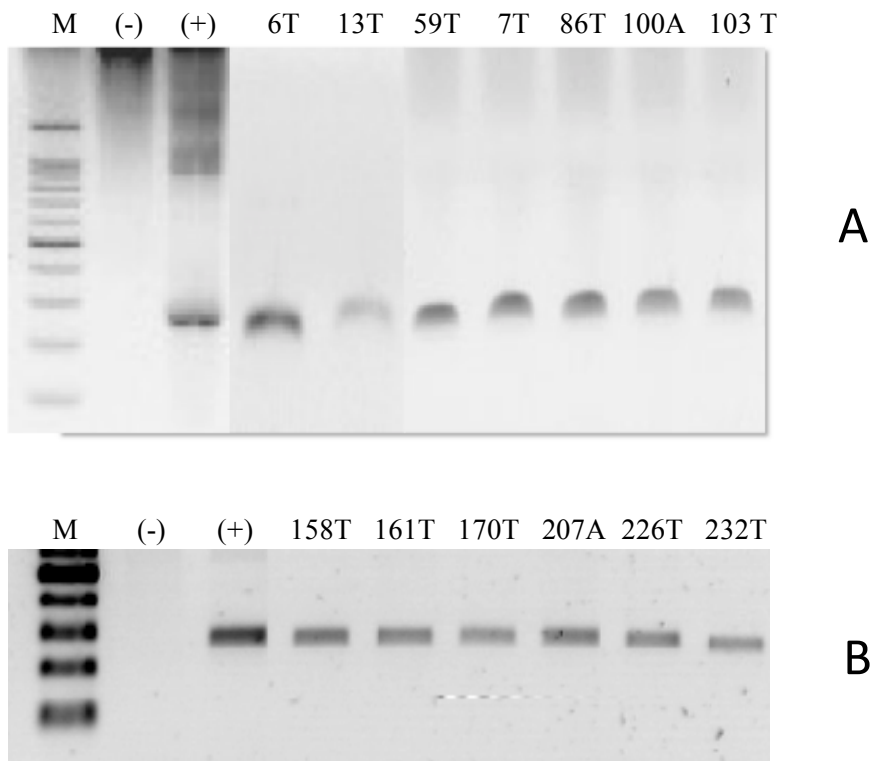


Figura 13. Muestras positivas para MMTV. Segmento de 250 pb de gen env de MMTV en 13 muestras. Se emplearon los oligos 2 y 3 de Wang empleando como molde el producto de PCR con oligos 1 y 4. Parte A; 8 muestras positivas. Parte B; 6 muestras positivas. T: tumor, A: adyacente.

En la tabla 7 se muestran el diagnóstico clínico de acuerdo al tejido de origen del cáncer y edad de las pacientes que fueron positivas para el MMTV-like. El 53% corresponde al tipo infiltrante ductal, un 15% a lobulillar infiltrante y 15% canalicular infiltrante.

Tabla 10. Diagnóstico patológico y edad de las pacientes positivas para MMTV. T: Tumor. A: adyacente.

Paciente	Edad	Diagnóstico
59T	77	Canalicular Infiltrante
103T	57	Ductal Infiltrante
75A	38	Ductal Infiltrante
6T	44	Canalicular Infiltrante
13T	53	Papilar + Ductal
100A	66	Mucinoso Puro
86T	49	Ductal Infiltrante
158T	42	Ductal Infiltrante
161T	44	Lobulillar Infiltrante
170T	88	Lobulillar Infiltrante
207A	69	Ductal Infiltrante
226T	65	Ductal Infiltrante
232T	50	Ductal Infiltrante

ANÁLISIS DE SIMILITUD

Los productos de PCR de las trece muestras positivas fueron secuenciados para comprobar su identidad con MMTV-like. Se realizaron alineamientos de secuencias (Fig. 14) usando como referencia los genes env de 4 cepas MMTV (GenBank AF033807, AF228552, AF228551 y AF228550), de HMTV (GenBank AF243039) y de la familia K de los retrovirus endógenos (GenBank KY18890.1). Los porcentajes de identidad se muestran en la Tabla 8.

Tabla 11. Identidad de fragmentos de gen env encontrados en tumores de mama y tejido adyacente. Se muestra su comparación con gen env del retrovirus MMTV de 4 cepas, HMTV y la familia K de los retrovirus endógenos. Las muestras están ordenadas de mayor a menor identidad. Los datos fueron obtenidos con el programa GeneFisher 2.

Identidad (%)						
	HMTV 1491862	BR6 AF033807	C3H AF228552	HeJ AF228551	Mtv1 AF228550	HERV-K KY18890.1
103T	98.6	97.2	100	97.7	98.1	27.9
13T	98.6	97.2	100	97.7	98.1	27.9
75A	98.1	96.7	99.5	97.2	97.7	27.9
100A	97.7	96.3	99.1	96.7	97.2	27.9
6T	97.7	96.3	99.1	96.7	97.2	27.9
59T	97.7	96.3	99.1	96.7	97.2	27.9
86T	97.2	95.8	98.6	96.3	96.7	27.4
161T	98.6	97.2	100	97.7	98.1	27.9
170T	98.1	96.7	99.5	97.2	97.7	27.9
207A	98.1	96.7	99.5	97.2	97.7	27.9
226A	98.1	96.7	99.5	97.2	97.7	27.9
232A	97.2	95.8	98.6	96.3	96.7	27.9
Promedio	97.98	96.58	99.38	97.05	97.51	27.86

```

207A --AGGAT-ACCTCAGCTAATAGATATAGAGAAA-----AGAGGATCTACTTT--TCATA 49
226T --AGGAT-ACCTCAGCTAATAGATATAGAGAAA-----AGAGGATCTACTTT--TCATA 49
170T --AGGAT-ACCTCAGCTAATAGATATAGAGAAA-----AGAGGATCTACTTT--TCATA 49
161T --AGGATTACCTCAGCTAATAGATATAGAGAAA-----AGAGGATCTACTTT--TCATA 50
13T --AGGATTACCTCAGCTAATAGATATAGAGAAA-----AGAGGATCTACTTT--TCATA 50
103T --AGGATTACCTCAGCTAATAGATATAGAGAAA-----AGAGGATCTACTTT--TCATA 50
MMTV C3H --AGGATTACCTCAGCTAATAGATATAGAGAAA-----AGAGGATCTACTTT--TCATA 50
86T --AGGAT-ACCTCAGCTA-TAGATATAGAGAAA-----GAGGATCTACTTT--TCATA 47
100a --AGGATTACCTCAGCTA-TAGATATAGAGAAA-----AGAGGATCTACTTT--TCATA 49
158T --AGGAT-ACCTCAGCTAATAGATATAGAGAAA-----AGAGGATCTACTTT--TCATA 49
59T --AGGAT-ACCTCAGCTA-TAGATATAGAGAAA-----AGAGGATCTACTTT--TCATA 48
75a --AGGATTACCTCAGCTA-TAGATATAGAGAAA-----AGAGGATCTACTTT--TCATA 49
T6 --AGGATTACCTCAGCTA-TAGATATAGAGAAA-----AGAGGATCTACTTT--TCATA 49
MMTV BR6 --AGGATTACCTCAGTTAATAGATATAGAGAAA-----AGAGGATCTACTTT--TCATA 50
MMTV HeJ --AGGATTACCTCAGCTAATAGATATAGAGAAG-----AGAGGATCTACTTT--TCATA 50
MMTV Mtv1 --AGGATTACCTCAGCTAATAGATATAGAGAAG-----AGAGGATCTACTTT--TCATA 50
HMTV --AGGATTACCTCAATTAATAGATATAGAGAAA-----AGAGGATCTACTTC--TCATA 50
HERV-K CTACAATGAACCCATCAG--AGATGCAAAGAAA-----AGCGCCTCCACGGAGATGGTA 52
HERV-K I ATGCTTTGA-CTCATGT---AAATGCAGCAGGATTAAAAAACAATTTGA-TGTCACATA 55
HERV-K II -TTATATTA-CTCATATT-CGAGCACACACTAATTTACCAGGGCCTTTGACTAAAGCAAA 57
          * * * * * * * *

```

```

207A TTT-C-----CTGTTCTTCTTGAGATTGACTAATTGTTTAGATTCTTCTGCC 96
226T TTT-C-----CTGTTCTTCTTGAGATTGACTAATTGTTTAGATTCTTCTGCC 96
170T TTT-C-----CTGTTCTTCTTGAGATTGACTAATTGTTTAGATTCTTCTGCC 96
161T TTT-C-----CTGTTCTTCTTGAGATTGACTAATTGTTTAGATTCTTCTGCC 97
13T TTT-C-----CTGTTCTTCTTGAGATTGACTAATTGTTTAGATTCTTCTGCC 97
103T TTT-C-----CTGTTCTTCTTGAGATTGACTAATTGTTTAGATTCTTCTGCC 97
MMTV C3H TTT-C-----CTGTTCTTCTTGAGATTGACTAATTGTTTAGATTCTTCTGCC 97
86T TTT-C-----CTGTTCTTCTTGAGATTGACTAATTGTTTAGATTCTTCTGCC 94
100a TTT-C-----CTGTTCTTCTTGAGATTGACTAATTGTTTAGATTCTTCTGCC 96
158T TTTTC-----CTGTTCTTCTTGAGATTGACTAATTGTTTAGATTCTTCTGCC 97
59T TTT-C-----CTGTTCTTCTTGAGATTGACTAATTGTTTAGATTCTTCTGCC 95
75a TTT-C-----CTGTTCTTCTTGAGATTGACTAATTGTTTAGATTCTTCTGCC 96
T6 TTT-C-----CTGTTCTTCTTGAGATTGACTAATTGTTTAGATTCTTCTGCC 96
MMTV BR6 TTT-C-----CTGTTCTTCTTGAGATTGACTAATTGTTTAGACTCTTCTGCC 97
MMTV HeJ TTT-C-----CTGTTCTTCTTGAGATTGACTAATTGTTTAGACTCTTCTGCC 97
MMTV Mtv1 TTT-C-----CTGTTCTTCTTGAGATTGACTAATTGTTTAGACTCTTCTGCC 97
HMTV TTT-C-----CTGTTCTTCTTGAGTTAACTAATTGTTTAGATTCTTCTGCC 97
HERV-K ACA-C-----CAGT----CACATGGATGGA-TAATCCTATAGAAGTATATGTT 94
HERV-K I GAAACAGGCCAAAAGATATTGTACAACAT-TGCACCCA-----GTGTCAA---TCTTACA 106
HERV-K II TGAACAAGCTGACT-TACTG-GTATCATCTGCATTTCATAAAAAGCACAGAAGACTTCTTGCT 115
          * * * * * * * *

```

207A TACGACTATGCAGCGAT-CATAGTCA-AGAGGCCGCCATACGTGCTGCTA--CCTGTAGA 152
 226T TACGACTATGCAGCGAT-CATAGTCA-AGAGGCCGCCATACGTGCTGCTA--CCTGTAGA 152
 170T TACGACTATGCAGCGAT-CATAGTCA-AGAGGCCGCCATACGTGCTGCTA--CCTGTAGA 152
 161T TACGACTATGCAGCGAT-CATAGTCA-AGAGGCCGCCATACGTGCTGCTA--CCTGTAGA 153
 13T TACGACTATGCAGCGAT-CATAGTCA-AGAGGCCGCCATACGTGCTGCTA--CCTGTAGA 153
 103T TACGACTATGCAGCGAT-CATAGTCA-AGAGGCCGCCATACGTGCTGCTA--CCTGTAGA 153
 MMTV C3H TACGACTATGCAGCGAT-CATAGTCA-AGAGGCCGCCATACGTGCTGCTA--CCTGTAGA 153
 86T TACGACTATGCAGCGAT-CATAGTCA-AGAGGCCGCCATACGTGCTGCTA--CCTGTAGA 150
 100^a TACGACTATGCAGCGAT-CATAGTCA-AGAGGCCGCCATACGTGCTGCTA--CCTGTAGA 152
 158T TACGACTATGCAGCGAT-CATAGTCA-AGAGGCCGCCATACGTGCTGCTA--CCTGTAGA 153
 59T TACGACTATGCAGCGAT-CATAGTCA-AGAGGCCGCCATACGTGCTGCTA--CCTGTAGA 151
 75^a TACGACTATGCAGCGAT-CATAGTCA-AGAGGCCGCCATACGTGCTGCTA--CCTGTAGA 152
 T6 TACGACTATGCAGCGAT-CTTAGTCA-AGAGGCCGCCATACGTGCTGCTA--CCTGTAGA 152
 MMTV BR6 TACGACTATGCAGCGAT-CATAGTCA-AGAGGCCGCCATATGTGCTGCTA--CCTGTAGA 153
 MMTV HeJ TACGACTATGCAGCGAT-CATGGTCA-AGAGGCCGCCATATGTGCTGCTA--CCTGTAGA 153
 MMTV Mtv1 TACGACTATGCAGCGAT-CATAGTCA-AGAGGCCGCCATATGTGCTGCTA--CCTGTAGA 153
 HMTV TACGACTATGCAGCGAT-CATAGTCA-AGAGGCCGCCATACGTGCTGCTA--CCTGTAGA 153
 HERV-K AATGATAGTGTATGGGTACCTGGCCCCACAGATGATCGC-TGCCCTGCCAAACCTGAGGA 153
 HERV-K I CCTGCCACCCAAGAG-----GCAG--GAGTTAATCCAGAAGTCTGTGT-CCTAATGC 157
 HERV-K II TTGACTCATGTAAATGC----AGCAG--GATTAATAAACA-AATTGATGT-CACATGGA 167
 * * * * *

207A TAT-----TGGTGATGAA-----CCAT--GGTTTGATG-AT--TCTGCCATTCAAAA---C 194
 226T TAT-----TGGTGATGAA-----CCAT--GGTTTGATG-AT--TCTGCCATTCAAAA---C 194
 170T TAT-----TGGTGATGAA-----CCAT--GGTTTGATG-AT--TCTGCCATTCAAAA---C 194
 161T TAT-----TGGTGATGAA-----CCAT--GGTTTGATG-AT--TCTGCCATTCAAAA---C 195
 13T TAT-----TGGTGATGAA-----CCAT--GGTTTGATG-AT--TCTGCCATTCAAAA---C 195
 103T TAT-----TGGTGATGAA-----CCAT--GGTTTGATG-AT--TCTGCCATTCAAAA---C 195
 MMTV C3H TAT-----TGGTGATGAA-----CCAT--GGTTTGATG-AT--TCTGCCATTCAAAA---C 195
 86T TAT-----TGGTGATGAA-----CCAT--GGTTTGATG-AT--TCTGCCATTCAAAA---C 192
 100^a TAT-----TGGTGATGAA-----CCAT--GGTTTGATG-AT--TCTGCTATTCAAAA---C 194
 158T TAT-----TGGTGATGAA-----CCAT--GGTTTGATG-AT--TCTGCTATTCAAAA---C 195
 59T TAT-----TGGTGATGAA-----CCAT--GGTTTGATG-AT--TCTGCCATTCAAAA---C 193
 75^a TAT-----TGGTGATGAA-----CCAT--GGTTTGATG-AT--TCTGCCATTCAAAA---C 194
 T6 TAT-----TGGTGATGAA-----CCAT--GGTTTGATG-AT--TCTGCCATTCAAAA---C 194
 MMTV BR6 TAT-----TGGTGATGAA-----CCAT--GGTTTGATG-AT--TCTGCCATTCAAAA---C 195
 MMTV HeJ TAT-----TGGTGATGAA-----CCAT--GGTTTGATG-AT--TCTGCCATTCAAAA---C 195
 MMTV Mtv1 TAT-----TGGTGATGAA-----CCAT--GGTTTGATG-AT--TCTGCCATTCAAAA---C 195
 HMTV TAT-----TGGTGATGAA-----CCAT--GGTTTGATG-AT--TCTGCCATTCAAAA---C 195
 HERV-K AGAAGGGATGATGATAAATATTTCCATTGGGTATCATT-AT--CCTCCTATTTG----- 204
 HERV-K I ATT-----ATGGCAAAT-----GGATGTCACGCATGTTCTTCATTTGGAAGAT 201
 HERV-K II AAC-----A-GGCAAA-----AGATATTGTACAA--CATTGCACCCAG----- 202
 * ** * * * *

207A	CTTTAGGTATGCCACAGAT	213
226T	CTTTAGGTATGCCACAGAT	213
170T	CTTTAGGTATGCCACAGAT	213
161T	CTTTAGGTATGCCACAGAT	214
13T	CTTTAGGTATGCCACAGAT	214
103T	CTTTAGGTATGCCACAGAT	214
MMTV C3H	CTTTAGGTATGCCACAGAT	214
86T	CTTTAGGTATGCCACAGAT	211
100 ^a	CTTTAGGTATGCCACAGAT	213
158T	CTTTAGGTATGCCACAGAT	214
59T	CTTTAGGTATGCCACAGAT	212
75 ^a	CTTTAGGTATGCCACAGAT	213
T6	CTTTAGGTATGCCACAGAT	213
MMTV BR6	CTTTAGGTATGCCACAGAT	214
MMTV HeJ	TTTTAGGTATGCCACAGAT	214
MMTV Mtv1	TTTTAGGTATGCCACAGAT	214
HMTV	CTTTAGGTATGCCACAGAT	214
HERV-K	-CCTAGG-----GAGAG--	215
HERV-K I	TATCATATGT-TCAT----	215
HERV-K II	TGTC AAGT-C-TTAC----	215

Figura 14. Alineamiento múltiple de secuencias. Se obtuvo la secuencia de los amplicones del PCR anidado para todas las muestras positivas de MMTV-like, y se realizó un alineamiento múltiple con secuencias de referencia de 4 cepas de MMTV, HMTV y tres HERV-K. T: tumor, A: adyacente.

Se obtuvo un cladograma que muestra como se agrupan las secuencias de acuerdo a su identidad (Fig. 15). Se observan tres grupos, el primero representado por las 3 secuencias de MMTV y una de HMTV; el segundo grupo consta de 6 muestras de tumores; y el tercer grupo consta de la secuencia MMTV C3H, 4 muestras de tumores y 2 de tejido adyacente.

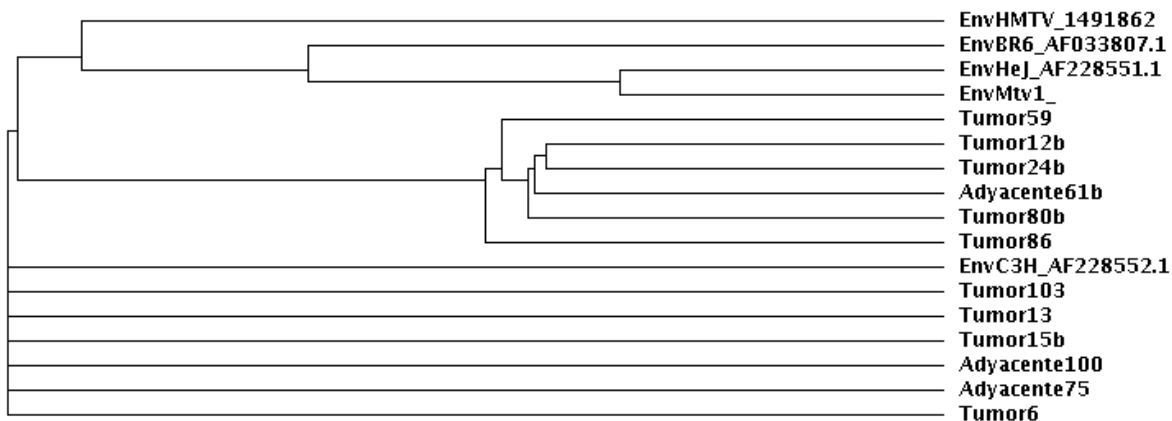


Figura 15. Cladograma de secuencias del gen env encontradas en muestras de tumores de mama y tejido adyacente. Después de realizar un alineamiento múltiple con ClustalW 1.83. Se agruparon las muestras de acuerdo a su identidad.

OBTENCIÓN DE RNA

Después de extraer, se cuantificó el RNA de las muestras positivas para MMTV. La pureza y concentración del RNA son óptimas para el ensayo posterior de síntesis de cDNA (Tabla 9). La integridad del RNA se muestra en la Fig. 16. Donde se puede apreciar un corrimiento discreto de las bandas ribosomales 28S y 18S. Teniendo en cuenta este patrón es muy probable que los RNAs mensajeros también tengan la misma integridad.

Tabla 12. Cuantificación de RNA de muestras positivas para MMTV. El coeficiente de pureza 260/280 es idóneo para sintetizar cDNA.

Muestra	ng/ul	260/280	ng totales
Tumor 6	14.56	1.89	500
Tumor 13	593.7	2.17	2000
Tumor 59	325.99	2.17	2000
Adyacente 75	15.04	2.13	500
Tumor 86	128.59	2.13	2000
Adyacente 100	6.97	2.53	300
Tumor 103	14.23	1.89	500

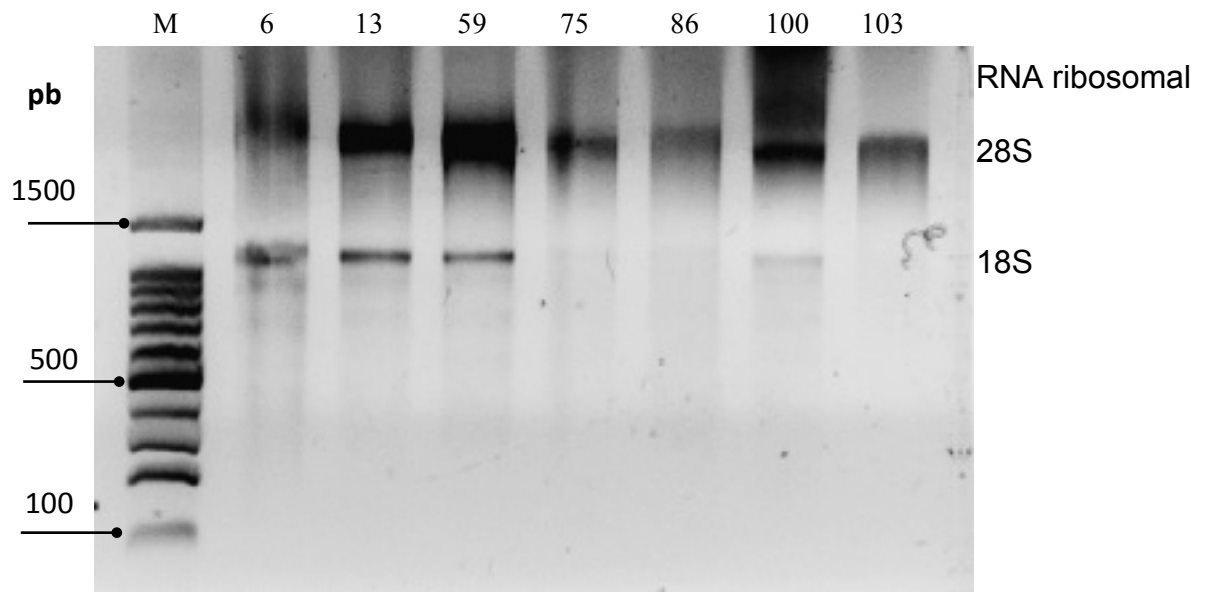


Figura 16. Integridad de RNA total en muestras de tumores de mama. Se separaron en agarosa al 1.5% las muestras de RNA positivas para MMTV. Todos los carriles tienen 20ng. Las muestras 75 y 100 corresponden a tejido adyacente y las muestras 6, 13, 59 y 103 a tumor. La integridad es evidenciada por el patrón de migración de los RNAs ribosomales 28S y 18S.

SÍNTESIS DE cDNA

Se analizó la integridad de RNA de muestras de tumores de mama no positivas para MMTV (Fig. 17). La muestra del carril 3 tuvo la mayor integridad y pureza, por tal motivo se seleccionó para estandarizar las condiciones.

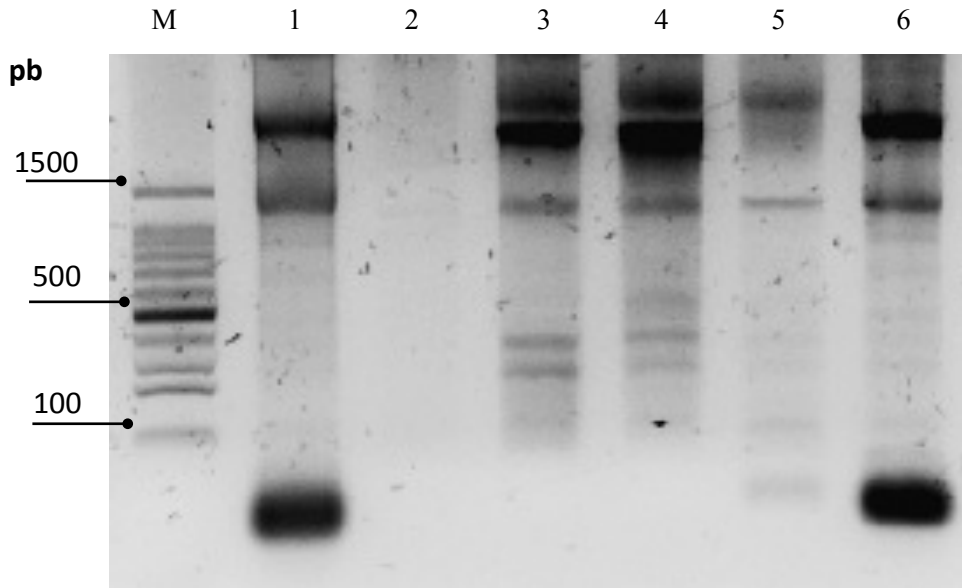


Figura 17. Integridad de RNA total en tumores de mama. Se extrajo RNA de 6 muestras de tumores de mama no positivas para MMTV y se determinó su integridad, en base al patrón de migración del RNA ribosomal 28S y 18S.

Se usaron 10, 25, 50, 100 y 200ng de RNA para la síntesis de la primera cadena de cDNA, empleando oligos dT. Para la síntesis de la segunda cadena de cDNA se emplearon oligos para el gen constitutivo HPRT. Como se observa en la figura 18, a partir de 50ng de RNA es posible observar un amplificado del gen HPRT.

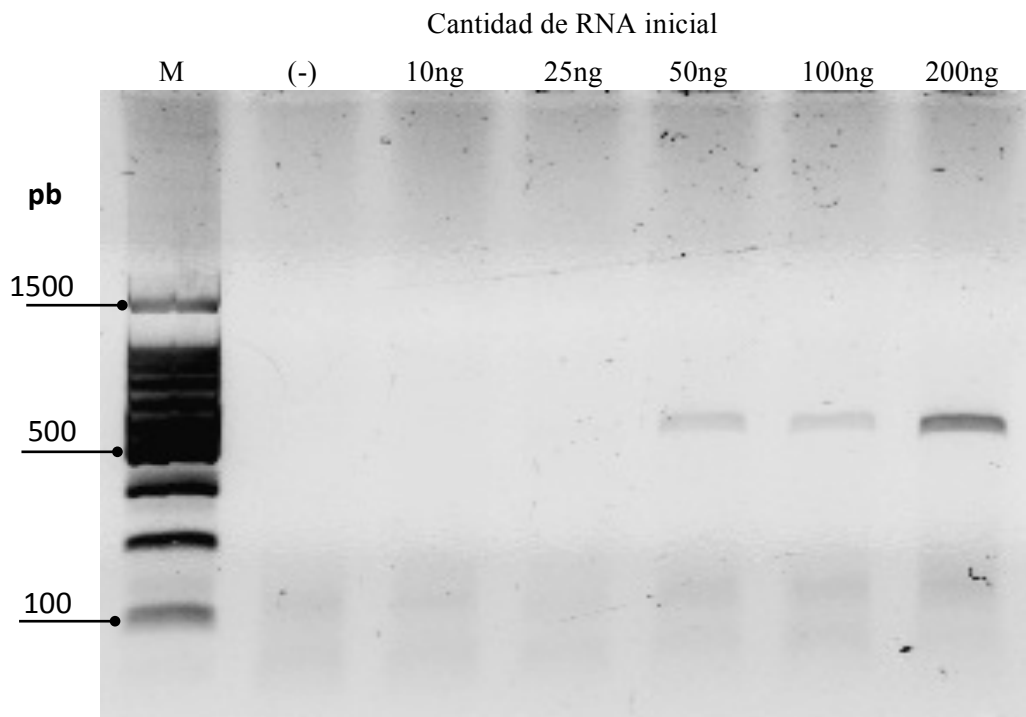


Figura 18. PCR de constitutivo HPRT amplificado a partir de cDNA. Se muestra la cantidad de RNA inicial usado para síntesis de primera cadena. El fragmento esperado del gen *HPRT* obtenido con síntesis de segunda cadena es de 650pb.

Se emplearon entonces 50ng de RNA total (libre de DNA) para la síntesis de cDNA se realizó según la metodología empleando oligo dT₁₆ para seleccionar únicamente la retrotranscripción de los mensajeros con cola PoliA, incluyendo a los mensajeros del MMTV-like.

Se realizó PCR con oligos GAPDH que se unen a intrones. Se observó un amplicón de 700pb cuando se usó como molde DNA y no se observó cuando se usó cDNA como molde (Fig. 19).

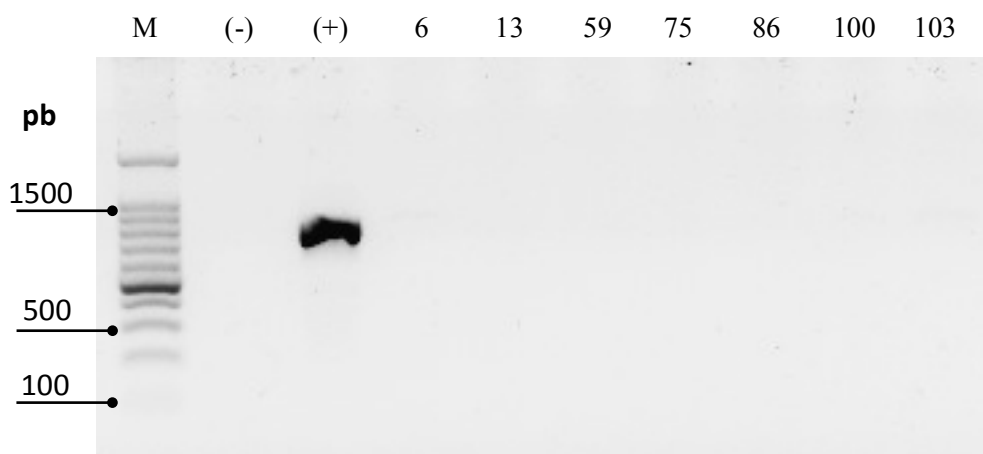


Figura 19. PCR de segmento gen *GADPH*. Los oligos que están diseñados para intrones son capaces de sintetizar un producto de 700pb, como en el carril (+) donde se uso DNA integro. En todas las muestras 6 a 103 no se observo amplicón del gen *GADPH*, ya que la muestra se encontró libre de DNA.

Para las tres muestras de cDNA de las que se disponía mayor cantidad, se realizó una segunda prueba confirmatoria. Se emplearon otro par de oligos diseñados para el gen GAPDH, los cuales se unen en exones que flanquean a un intrón de 104pb. En la PCR cuando se usa como molde cDNA, el fragmento esperado es de 240pb y cuando se usa DNA como molde es de 344pb. En las muestras de RNA que son tratadas con DNAsa antes de la síntesis de cDNA, solo se observa una banda de 240pb que corresponde a los exones unidos, mientras que cuando se usa DNA como molde se observa una banda de 344pb que incluye al intrón. En la figura 20 se observa que las muestras de cDNA no están contaminadas con DNA.

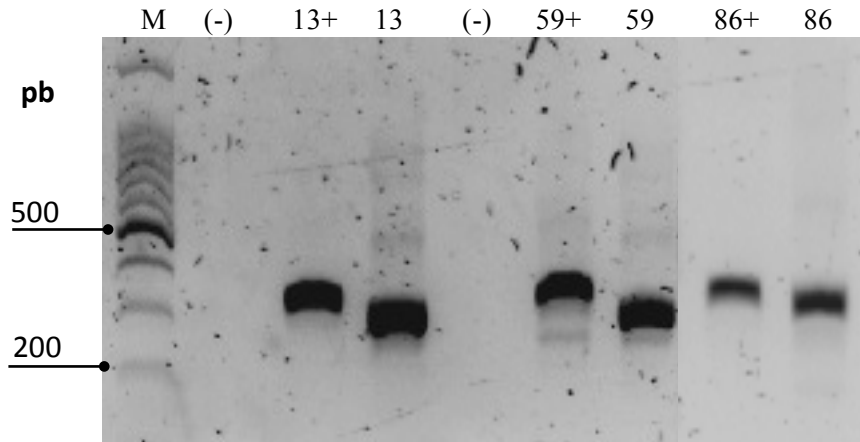


Figura 20. Confirmación de cDNA libre de DNA. Los oligos empleados en esta PCR se unen a exones. Fragmentos de mayor tamaño (344pb) indican amplificación a partir de DNA y fragmentos de menor tamaño (204pb) indican amplificación a partir de cDNA. Muestra con signo +, significa que se uso DNA como templado.

CUANTIFICACIÓN ABSOLUTA (NUMERO DE COPIAS)

En este estudio se logró diseñar la sonda TaqMan y oligos para el gen env de MMTV-like, cuando se alinearon las secuencias de este gen con las del gen env de varios representantes de la familia K de los retrovirus, se obtuvieron dos regiones con una homología menor al 17%. La primera región localizada de nucleotido 569 al 657; y la segunda región del 1388 al 1640. Esta ultima región fue usada por Wang en 1995 para el diseño de los oligos de PCR anidada, por lo que optamos por usar la primera región para diseñar un par de oligos y sonda TaqMan.

Se realizaron ensayos en muestras de DNA para determinar la presencia del gen env de MMTV, esto con el fin de validar los datos obtenidos con PCR anidada. También, con este ensayo fué posible cuantificar el numero de copias de MMTV-like en el DNA. Para este calculo se usa una curva estándar con concentraciones conocidas del gen env (Fig. 20) y se obtienen las C_T para cada una (Tabla 10).

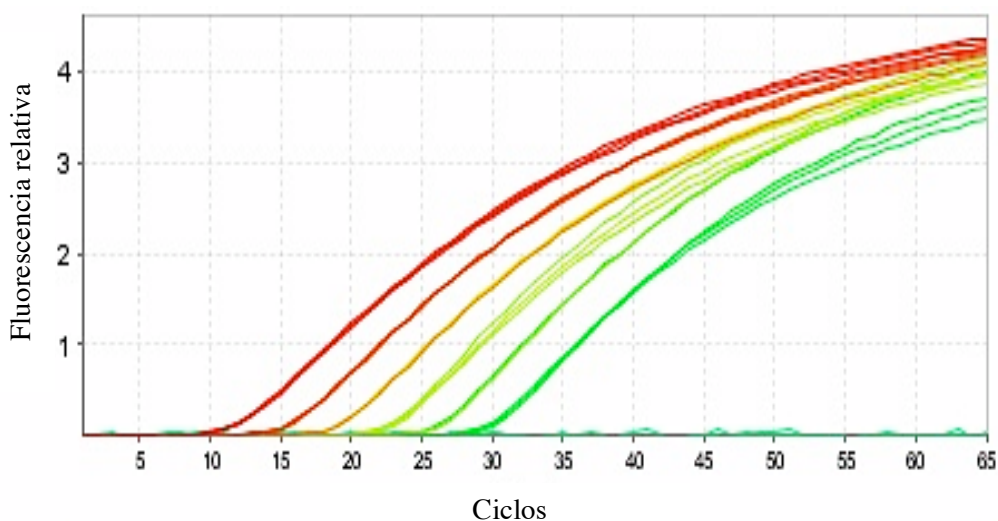


Figura 21. Curvas de amplificación. Se hicieron diluciones (10^{-1}) del plásmido con el gen *env* de MMTV-like, se utilizaron como templado para PCR en tiempo real. Cada curva de amplificación representa una dilución del plásmido con un valor único de C_T . A mayor número de copias el valor de C_T disminuye.

Tabla 13. Datos de curva estándar para cuantificación absoluta. Se calculó la C_T y el número de copias de cada dilución de plásmido con el programa URI Genomics. Basándose en el número de moléculas por mol de DNA y la longitud del plásmido con el gen *env*.

ng plásmido (<i>env</i>)	C_T	Copias
10^0	12.7865	1.41×10^8
10^{-1}	16.4807	1.41×10^7
10^{-2}	19.9824	1.41×10^6
10^{-3}	23.7764	1.41×10^5
10^{-4}	27.2835	1.41×10^4
10^{-5}	30.8040	1.41×10^3

Para conocer el número de copias de las muestras problema, cada C_T de las muestras positivas son interpoladas en la curva estándar para obtener el número de copias de las muestras problema. Como se muestra en la tabla 11 el número de copias es variable para cada tipo de tejido.

Tabla 14. Número de copias del gen env en muestras positivas. Se realizó interpolando los valores de C_T en la curva estándar.

Muestra	Copias de env
6T	13,000
13T	8,770
59T	7,500
75A	11,400
86T	6,990
100A	30,000
103T	28,300
158T	5,650
161T	8,550
170T	12,600
207A	3,240
226T	4,900
232T	7,400

EXPRESIÓN DE GEN ENV

Se empleó cDNA de cada muestra positiva para determinar la expresión del gen env. Cuatro de ellas mostraron transcripción activa (Fig. 22): 6 y 103 que son muestras de tumor; 75 y 100 que son tejido adyacente.

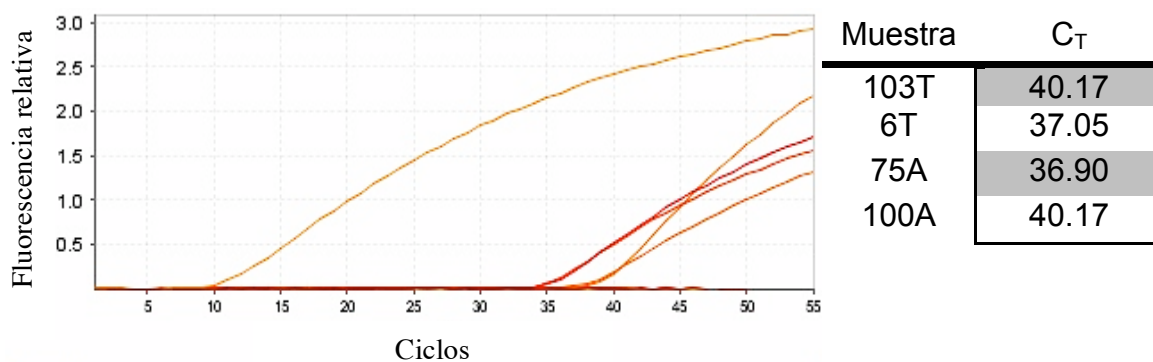


Figura 22. Gráfica de amplificación de qPCR para gen env de MMTV. Las líneas exponenciales de amplificación representan la presencia del gen diana en cuatro muestras. Como control positivo (C_T de 10) se empleó plásmido pBR322 con gen env.

ANÁLISIS INSERCIONAL

Se usaron las muestras de DNA 6, 13, 59, 86, y 103 con sus tejidos controles adyacentes, es decir 10 muestras en total. Se realizó digestión con enzima Xho II según el protocolo usando diferentes controles (Fig. 23).

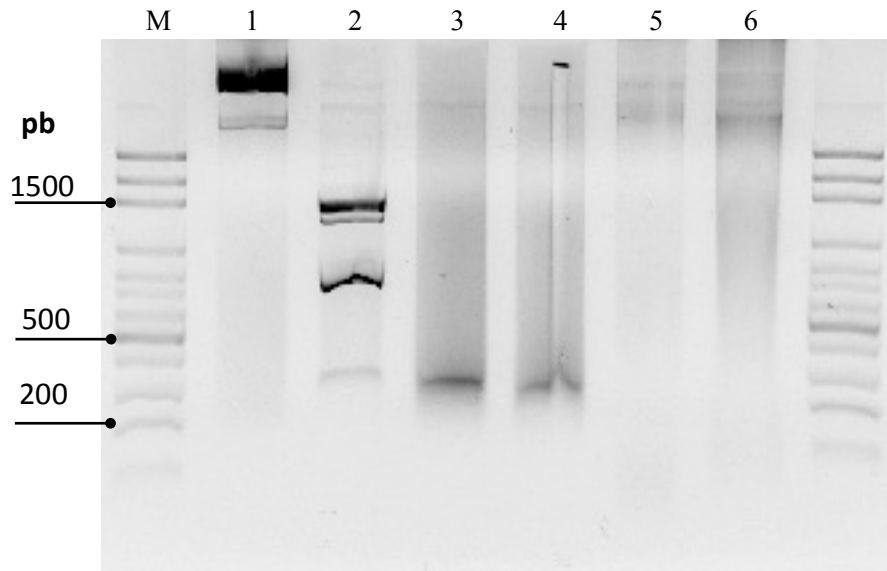


Figura 23. Electroforesis de productos de digestión con Xho II. Se digirieron 100ng de pBR322 (carril 2); 2ug de DNA amplificado con GenomePlex (Carril 4) y 1ug de DNA sin tratamiento (carril 6). Se incluyen muestras de DNA no digerido de pBR322, DNA Genomplex y DNA sin tratamiento (Carriles 1, 3 y 5, respectivamente).

Se construyeron los adaptadores splinkerette y se ligaron a los sitios de corte romos de la enzima Xho II. Posteriormente se digirió con Dra I para evitar amplificaciones internas de MMTV.

Se realizó una PCR con un par de oligos, uno que se une al adaptador splinkerette y el otro a la LTR viral, amplificando entonces todo el DNA del huésped que se encuentre flanqueado por dichos oligos. Se realizó una segunda PCR anidada para enriquecer los fragmentos de DNA del huésped. Estos productos de PCR se separaron en un gel de poliacrilamida al 3.5% (Fig. 24).

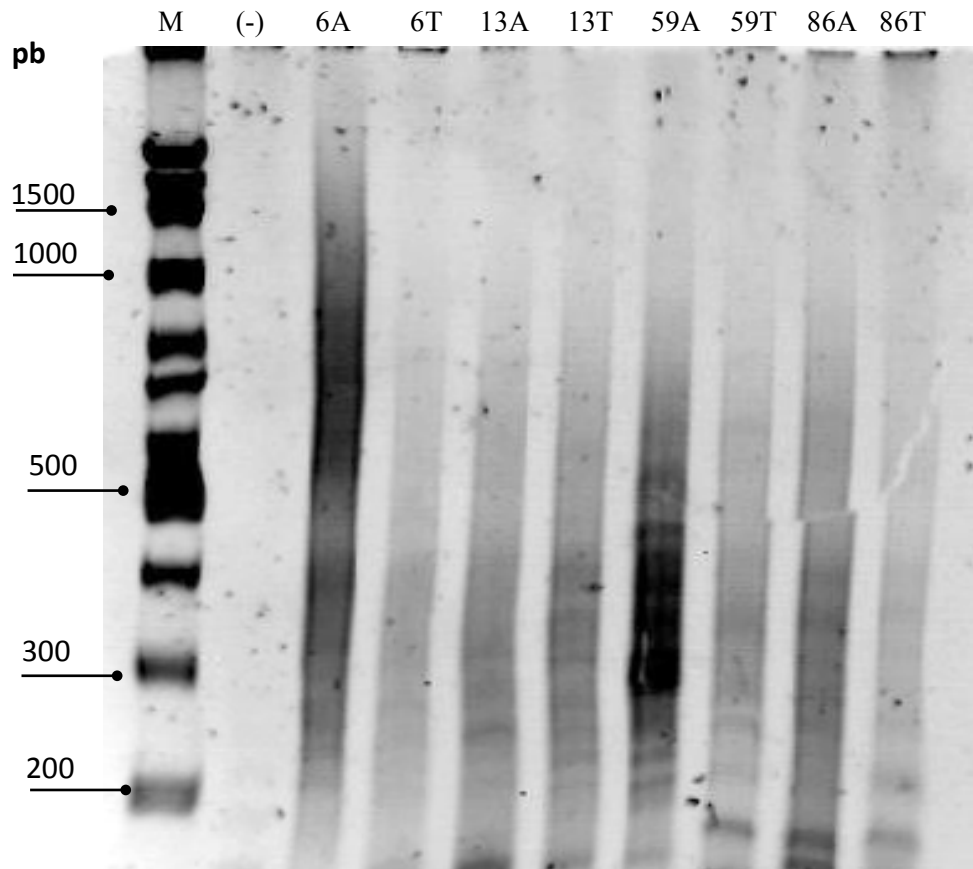
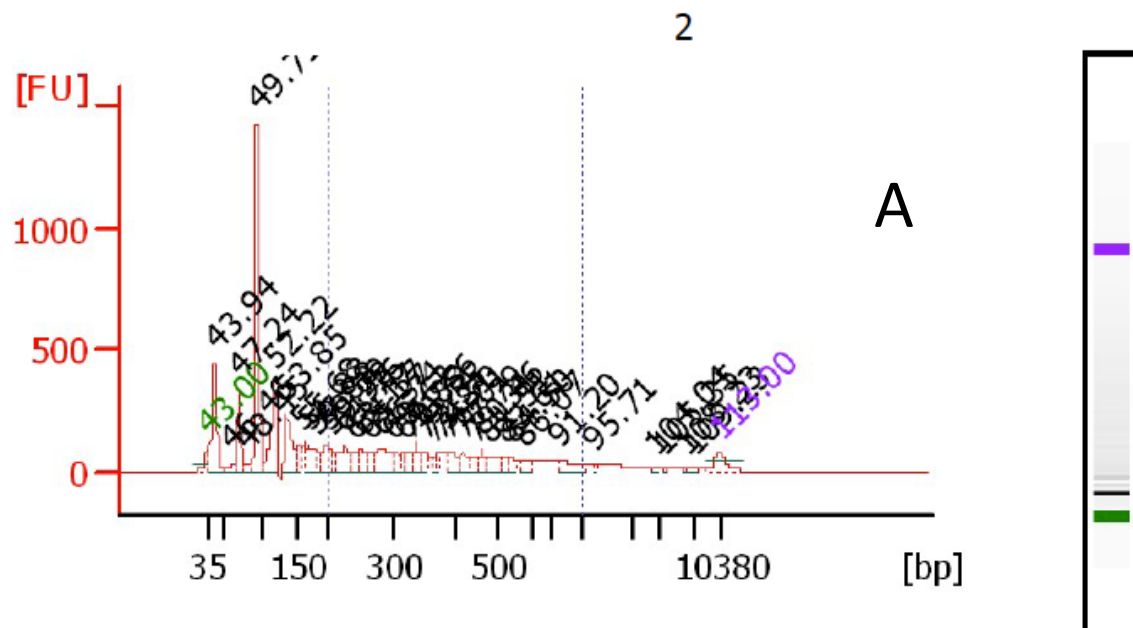


Figura 24. Amplicones de inserciones virales amplificadas por PCR anidada. Patrón de productos de PCR de diferentes tamaños. Aquí estar representadas las inserciones virales. Se observa enriquecimiento de 200 a 600pb.

La muestra 6T se sometió a un análisis electroforético en bioanalizador Agilent 2100, (Fig. 25) donde se observa que los fragmentos de inserciones virales y DNA genómico se encuentran enriquecidos desde los 40 a 450pb, y que la cantidad de amplicones es suficiente para continuar el protocolo de secuenciación.



Size [bp]	Conc. [pg/μl]	Size [bp]	Conc. [pg/μl]
35	125.00		
		240	99.23
41	1,037.62	251	153.16
62	80.39	265	129.60
69	458.97	280	280.27
80	86.36	302	103.49
92	1,801.90	316	75.14
118	691.37	327	94.34
136	460.54	337	105.27
156	157.48	349	102.14
168	197.23	365	53.56
180	146.93	375	58.66
196	191.53	391	137.33
203	101.37	418	111.69
224	271.94	445	66.74

Figura 25. Calidad de amplicones de inserciones virales. A. Ferograma obtenido de la muestra 6T tras su migración en bioanalizador Agilent 2100. B. Tamaño de amplicones obtenidos y concentración. El tamaño de los productos de PCR es heterogéneo, se observa un pico mayor a 49.7, lo que podría corresponder a amplificaciones del adaptador splinkerette, los fragmentos de interés van de 100 a 450pb.

Se fragmentó mecánicamente la muestra 6T para obtener productos de 100pb; y se realizó una reparación para conseguir extremos romos. Posteriormente se adiciono un nucleótido adenina sencillo al extremo 3' de todas las cadenas para poder hacer la ligación de los adaptadores mostrados en la Fig. 26.

5'CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCGTGATGTGACTGGAGTTCAGACGTGT
 GCTCTTCCGATCTCCACAAAGTGTGACCATATTTTGCAAATTTTGCATGCTGA
 AAAATGCCGCAGCTATAGTCAGTCAGTCGTCGTCGCCCTGCAGCAGAAATGGTT
 GAACTCCCGAGAGTGTCTACACCTAGGGAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGG
 AAAGAGTGTAGATCTCGGTGGTCGCCGTATCATT3'

Figura 26. Ligación de adaptadores. Diseño de producto final de ligación de regiones de interés con adaptadores. En verde se muestra el adaptador A y en rojo el adaptador B. Los cuales servirán como sitios de unión en el flowcell de Illumina durante la secuenciación.

Cuando la región de interés (genoma humano y LTR viral) está siendo flanqueada por los adaptadores A y B, observamos amplicones con PCR usando los siguientes oligos: B2-2 y New que se unen a los adaptadores de secuencia Illumina, y B2-2 y iSPK que se une a LTR viral, a este último le llamamos construcción SPK (Fig. 27).

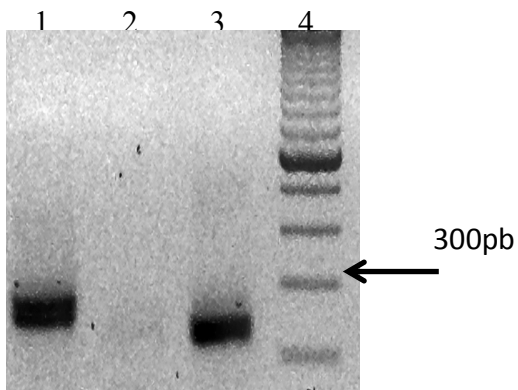


Figura 27. Productos de PCR para comprobar presencia de inserción viral y adaptadores de secuencia Illumina. En el carril 1 se usaron oligos B2-2 y New que se unen a adaptadores, obteniendo un amplicon de 250pb. En el carril 3 (construcción SPK) se uso el oligo B2-2 que se une al adaptador B y iSPK el cual se une rio abajo del adaptador A, por lo que se obtiene un producto de PCR menor al del carril 1. Como control se usaron oligos New y iSPK, ambos en sentido reverso.

Se hizo un análisis electroforético del PCR del carril 3 (oligos B2-2 y iSPK) en bioanalizador Agilent 2100 (Fig. 28) donde se observa un enriquecimiento de regiones de tamaños, que van de 200 a 500pb. Esto nos indica que fueron favorecidas las amplificaciones de regiones de interés. Posteriormente se realizó una segunda amplificación con oligo B2-2 y oligo Universal UF, usando como molde la construcción SPK (Fig. 29). De esta manera se obtiene la construcción final la cual será secuenciada.

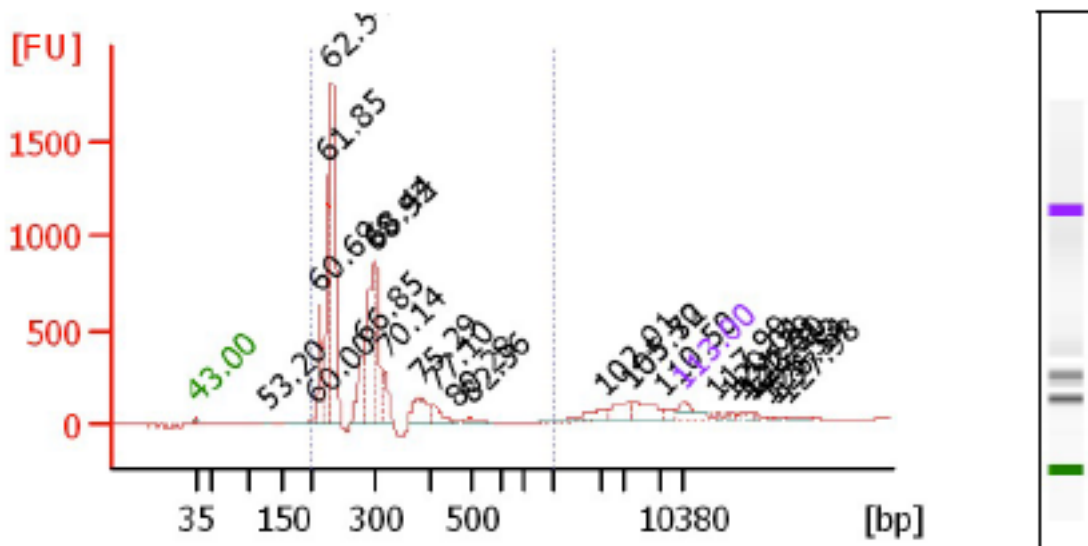


Figura 28. Ferograma obtenido de la amplificación de muestra 6T (construcción SPK) usando oligos B2-2 y iSPK tras su migración en bioanalizador Agilent 2100. Se favoreció la amplificación de productos mayores a 100pb, esta construcción es útil para los posteriores pasos de secuenciación.

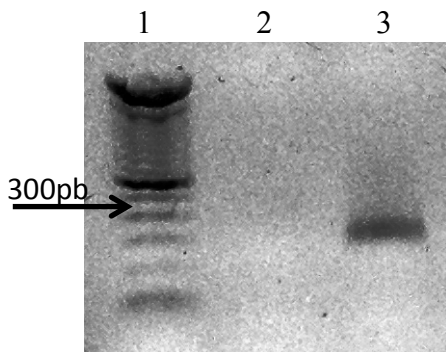


Figura 29. Extensión de construcción iSPK con oligo universal de secuencia. Para poder secuenciar las regiones de interés debe realizarse amplificación con oligo universal forward que extiende el oligo iSPK. En el carril 3 se muestra el producto de amplificación que será usado para secuenciar en MiSeq de Illumina. Como control negativo se uso oligo de secuencia reverse y oligo B2-2 (carril 2).

En un análisis preliminar usando el secuenciador Genome Analyzer IIx de Illumina, que permite obtener secuencias de una longitud de aprox. 100pb de cada extremo, se lograron identificar las secuencias de los adaptadores splinkerette y la LTR de MMTV-like, lo que demuestra que la metodología para clonar y secuenciar inserciones virales es eficiente.

Lo anterior permitirá obtener eventualmente las secuencias completa de genes humanos flanqueantes por el virus MMTV-like, empleando el sistema de secuenciación MySeq de Illumina que admite secuenciar fragmentos de hasta 200pb, longitud suficiente para determinar los genes humanos adyacentes a las zonas de inserción viral.

ANÁLISIS DE RESULTADOS

En este trabajo se replicó in vitro DNA genómico de tumores de mama y tejido no afectado empleando el paquete comercial (GenomePlex), a partir de cantidades muy bajas de DNA (5-10ng), hasta obtener de 5 a 17µg finales, lo cual fue suficiente para los ensayos posteriores.

El DNA aislado de cualquier fuente, tiende a fragmentarse durante el proceso de extracción. En este trabajo el tratamiento del DNA con Genomplex esta fundamentado en una fragmentación parcial del material genético. Por lo que es necesario asegurar que tiene la calidad suficiente para usarlo en ensayos como PCR, por lo que con un par de iniciadores que flanquean un segmento de 700pb del gen GAPDH. En las 254 muestras, se observó la amplificación de este segmento de 700pb, estos resultados son satisfactorios teniendo en cuenta los antecedentes de las muestras procesadas, revelando así su potencial para ser incluidos en los ensayos posteriores de PCR.

La ATCC comercializa el plásmido pBR322 con el gen env en la cepa HB101 de E. coli, la cual tiene la desventaja que durante su crecimiento el cultivo produce abundantes carbohidratos que interfieren en el proceso de purificación por column. Por tal motivo se opto por introducir el plásmido en la cepa XL1 Blue de E. coli. La transformación bacteriana fue exitosa, demostrando que el cloruro de calcio sigue siendo un buen método para generar células competentes.

La PCR anidada usada para la detección del gen env de MMTV es una técnica que posee la sensibilidad y especificidad necesaria para reducir la posibilidad de falsos positivos. Se considera una muestra positiva a partir de la presencia del segmento de 250pb en la segunda PCR. La ausencia del segmento de 660pb en todas las muestras las positivas, se debe al bajo número de copias del gen env en el DNA del huésped, de ahí la importancia de realizar PCR anidada para enriquecer y hacer mas especifica la detección.

La búsqueda del MMTV-like se ha realizado por PCR convencional; en nuestro estudio con el fin de incrementar la sensibilidad y especificidad, empleamos la tecnología de PCR en tiempo real usando sondas de hidrólisis TaqMan, que tienen la ventaja de hibridar específicamente al gen estudiado. La sonda TaqMan fue diseñada sobre una secuencia de DNA no homóloga entre el retrovirus MMTV y los retrovirus endógenos humanos (HERVs), cerciorándonos que la detección es únicamente para el gen env del MMTV. Estamos analizando la posibilidad de validar esta técnica para en un futuro emplear PCR en tiempo real para la detección viral.

Durante la extracción de RNA total es posible arrastrar DNA contaminante, que podría interferir en los ensayos posteriores de PCR en tiempo real. Por tal motivo 300ng de RNA de cada muestra se trataron con DNAsa, según la metodología. Se observó que la retención del RNA en la columna es solo de 50ng a partir de 300ng. Debido a esto, se determinó que 50ng es la cantidad mínima requerida para sintetizar cDNA.

Se pudo determinar que la muestra de cDNA esta libre de DNA, esto gracias al diseño de oligos GAPDH que permite obtener amplicones de diferentes tamaños, ya que los oligos se unen a exones que a su vez flanquean a un intrón. Una banda de 344pb corresponde a un amplificado a partir de DNA y una banda de 240pb a un amplificado a a partir de cDNA. En las muestras evaluadas, todas las bandas fueron de 240pb indicando que los productos de PCR no contenían intrones y provenían solo de cDNA.

El uso de oligo dT tiene la gran ventaja de aumentar la retrotranscripción in vitro de mRNA viral, que son los de interés en este trabajo, evitando así las amplificaciones inesperadas durante la PCR. La retrotranscripción inicia en el extremo 3' y generalmente no progresa hasta el extremo 5', el gen env se encuentra cercano al extremo 3' del mRNA, con lo cual en teoría se asegura sea

transcrito a cDNA, logrando medirlo en la PCR en tiempo real (Liang, Zhu et al. 1994).

Los tumores generados usando ya sea transposones o retrovirus son en su mayoría oligoclonales. Además las células dentro de cada tumor contienen múltiples eventos de inserción, por lo que la amplificación de los sitios de inserción de un tumor requiere una reacción múltiple como la PCR splinkerette. Para el análisis de secuencia es necesario conocer la secuencia de cada PCR splinkerette, de modo que la secuencia de los sitios de inserción individuales puede ser recuperada. La tecnología MiSeq de Illumina permite esto, empleando códigos de barras para cada muestra (Uren, Mikkers et al. 2009).

En lo que se refiere a la detección de las inserciones virales, se usaron cinco tumores positivos para MMTV-like y sus respectivos tejidos adyacentes negativos. Cabe mencionar que los oligos empleados para unirse con la LTR del MMTV-like puede también unirse con pseudo LTRs presentes en el genoma humano.. Por tal motivo los tejidos sanos se emplearon como controles para detectar solo las inserciones retrovirales nuevas en los tumores. La secuenciación de un producto de PCR splinkerette es la única manera segura de garantizar que represente fielmente el verdadero lugar de la inserción.

En la segunda PCR splinkerette, en teoría se obtienen las amplificaciones de todas las inserciones virales, se observó que al purificar estos productos de PCR, se presentaron mas cantidad de amplicones en los tumores que en los tejidos adyacentes.

DISCUSIÓN

El cáncer de mama se desarrolla a partir de la hiperplasia ductal atípica, carcinoma in situ, a continuación carcinoma invasivo y finalmente metástasis a distancia, que es por lo general la causa de la muerte. La etiología del carcinoma de mama esporádico es desconocida, es posible que muchos factores puedan dar origen a diferentes mecanismos de transformación (Weigelt, Baehner et al. 2010).

Una posible etiología viral está recibiendo hoy más consideración debido a las evidencias experimentales que demuestran la presencia de secuencias de MMTV exógeno en tumores de mama humanos. La cantidad de esta información acumulada durante décadas es impresionante y apunta hacia la existencia de un MMTV-like en humanos (Wiernik and Etkind 2006). No hay ningún elemento claro en contra de esta hipótesis y los trabajos aumentan en cantidad y calidad para explorar la posibilidad de un agente etiológico viral en cáncer de mama de humanos.

MMTV-like podría comportarse como un agente transformador, cofactor etiológico y agente patogénico implicado en la carcinogénesis mamaria, desempeñando un papel temprano, intermediario o tardío.

En este trabajo realizado en mujeres mexicanas, el 10.2% (n=254) de las muestras fue positivo para el gen env de MMTV. En México un estudio analizó la presencia de MMTV en tumores de mama (Zapata-Benavides, Saavedra-Alonso et al. 2007), encontraron un 4.2% de muestras positivas, sin embargo, los oligos empleados en la PCR no son los específicos para MMTV reportados por Wang en 1995, y debido a esto el grupo del Dr. Zapata encontró que las secuencias amplificadas eran muy similares a secuencias del cromosoma 3 humano. Hasta este momento no hay trabajos en México que reporten la presencia del retrovirus MMTV-like en tumores de mama.

En relación con los tejidos adyacentes con presencia de MMTV-like, en este trabajo hay tres tejidos positivos (2.36%), las reacciones de PCR fueron repetidas obteniendo los mismos resultados. En dos estudios el gen env de MMTV fue encontrado en 1.8% de tejido normales de mama (Wang, Holland et al. 1995, Ford, Tran et al. 2003), en 0.9% en mujeres de Italia (Melana, Holland et al. 2001) y en un 10% en mujeres argentinas (Melana, Picconi et al. 2002). La presencia del retrovirus en tejido adyacente no necesariamente puede inducir un proceso maligno, ya que esto depende el sitio de inserción del virus en el genoma huésped y el tiempo que lleva presente (Levine, Pogo et al. 2004).

La secuenciación fue necesaria para confirmar la identidad del gen env. Al comparar los porcentajes de identidad se encontró una similitud de 93.8% con el provirus HMTV aislado de tumores de mama de humano, mientras que para el MMTV aislado de ratones la similitud fue mas alta (94.8%), sugiriendo el origen exógeno y la posibilidad de que la infección viral sea a partir de ratones. La similitud con retrovirus endógenos humanos de la familia K, fue menor a 25%. Respecto al cladograma se observaron 3 agrupamientos, dos de los cuales están representados por las muestras positivas para el retrovirus y un grupo esta representado solo por las secuencias aisladas de ratones. Lo cual podría indicar que se trata de grupos diferentes a nivel de su secuencia de DNA.

En lo que se refiere a las copias provirales del gen env de MMTV en los tejidos de mama, el numero es variable, encontrándose un mayor número (30,000) en un tejido adyacente y 28,300 copias en uno tumoral de diferentes pacientes. Indicando que la frecuencia con la que se inserta el retrovirus en los tumores es variable.

La estrategia de PCR en tiempo real representa el mayor aporte al estudio de la expresión génica, ya que se tiene la posibilidad de detectar con gran sensibilidad un mRNA. En lo que se refiere a la expresión encontramos que 4 muestras (30%) presentan transcripción activa del gen env, 2 son tumores y 2 tejido adyacente de

pacientes diferentes. Estas muestras fueron las que tuvieron mayor número de copias, pudiendo indicar que existe una correlación de alto número de copias del gen env y expresión de su mensajero. En otro trabajo se encontró que el 66% de las muestras positivas expresaban el gen env (Wang, Go et al. 1998).

En el resto de las muestras, no se observó expresión del gen env esto puede deberse a que el MMTV en ratones a veces solo expresa regiones LTR, y quizá lo mismo pueda estar sucediendo en los tumores humanos (Sarkar 1995). Aunque el modelo de activación por inserción viral, menciona que el MMTV no necesita expresarse para inducir un fenotipo maligno, se piensa que una transcripción activa puede indicar mayor infección a las células vecinas e inserciones provirales nuevas (Fan and Johnson 2011).

Es importante conocer la expresión de un gen pues ayuda a comprender la importancia de su mensajero en el contexto celular, env es un gen que codifica proteínas de reconocimiento en la cápside viral, la detección de mRNA de este gen, es indicativo de una posible tasa de replicación activa al momento de la colecta de la muestra, ya que se producen mensajeros necesarios para finalizar el ensamblaje del virus maduro.

La evidencia experimental indica que los LTR del genoma huésped son sitios importantes para la integración del virus, la familia K de los HERVs (la más parecida al MMTV-like) tiene cerca de 10,000 LTRs solitarias por genoma y muchas de ellas podrían ser sitios de integración candidatos para el MMTV-like (Balakrishnan and Jonsson 1997).

Se realizó validación de la librería para secuenciar, donde se observó que la región de interés (genoma humano) tuviera una LTR viral en el extremo 3'. La tecnología de secuenciación MiSeq de Illumina se adapta al diseño experimental de la PCR splinkerette, para dilucidar la secuencia de las regiones génicas afectadas por las inserciones virales.

En el momento de la redacción de este trabajo, se están secuenciando las inserciones virales de muestras de tumores, para ser recibidas y analizadas computacionalmente, y determinar los sitios comunes de inserción. Es probable que encontremos mayor número de inserciones en muestras con transcripción activa y alto número de copias. Se espera en primera instancia encontrar genes afectados de la familia Wnt involucrados en codificar proteínas de señalización, y de la familia Fgf que codifican potentes factores angiogénicos. La expectativa es reportar genes nuevos asociados al cáncer en general y al cáncer de mama de humanos.

Este trabajo brinda un panorama general de las inserciones provirales, sin embargo para poder concluir que están asociadas al cáncer de mama hay que tomar en cuenta el estado transcripcional de cada uno, ya que de esto depende la actividad celular que domine en el tejido tumoral. Por lo que en trabajos posteriores se recomienda obtener un perfil de expresión de los genes candidatos afectados por la mutagénesis insercional.

La importancia biológica de la presencia de secuencias de MMTV-like en cáncer de mama humano aún no está claro, y la posibilidad de que estas secuencias contribuyen a la etiología del cáncer no se descarta. La detección de DNA viral en tumores, sugiere que el MMTV-like puede ser un factor que contribuye a la carcinogénesis de mama.

El cáncer es un proceso de múltiples pasos y es interesante averiguar que genes cooperan en la tumorigénesis. Una infección retroviral como el MMTV que causa mutagénesis insercional es una excelente estrategia para identificar genes asociados a cáncer de mama humano.

CONCLUSIONES

Nuestros resultados muestran que la prevalencia de secuencias de MMTV en tumores de mama de mujeres mexicanas es del 10.2%. Dichas secuencias tuvieron una mayor identidad con el retrovirus MMTV que con HMTV o HERVs. El 30% de las muestras positivas presentan expresión del gen env. Se observaron regiones del genoma humano afectadas por inserciones de MMTV. Este estudio aporta datos que contribuyen a describir molecularmente la mutagénesis insercional del retrovirus MMTV en cáncer de mama de mujeres mexicanas.

LITERATURA CITADA

Acha-Orbea, H., D. Finke, A. Attinger, S. Schmid, N. Wehrli, S. Vacheron, I. Xenarios, L. Scarpellino, K. M. Toellner, I. C. MacLennan and S. A. Luther (1999). "Interplays between mouse mammary tumor virus and the cellular and humoral immune response." Immunol Rev **168**: 287-303.

Altundag, K., F. J. Esteva and B. Arun (2005). "Monoclonal antibody-based targeted therapy in breast cancer." Curr Med Chem Anticancer Agents **5**(2): 99-106.

Balakrishnan, M. and C. B. Jonsson (1997). "Functional identification of nucleotides conferring substrate specificity to retroviral integrase reactions." J Virol **71**(2): 1025-1035.

Banerji, S., K. Cibulskis, C. Rangel-Escareno, K. K. Brown, S. L. Carter, A. M. Frederick, M. S. Lawrence, A. Y. Sivachenko, C. Sougnez, L. Zou, M. L. Cortes, J. C. Fernandez-Lopez, S. Peng, K. G. Ardlie, D. Auclair, V. Bautista-Pina, F. Duke, J. Francis, J. Jung, A. Maffuz-Aziz, R. C. Onofrio, M. Parkin, N. H. Pho, V. Quintanar-Jurado, A. H. Ramos, R. Rebollar-Vega, S. Rodriguez-Cuevas, S. L. Romero-Cordoba, S. E. Schumacher, N. Stransky, K. M. Thompson, L. Uribe-Figueroa, J. Baselga, R. Beroukhim, K. Polyak, D. C. Sgroi, A. L. Richardson, G. Jimenez-Sanchez, E. S. Lander, S. B. Gabriel, L. A. Garraway, T. R. Golub, J. Melendez-Zajgla, A. Toker, G. Getz, A. Hidalgo-Miranda and M. Meyerson (2012). "Sequence analysis of mutations and translocations across breast cancer subtypes." Nature **486**(7403): 405-409.

Bedard, P. L., S. Mook, M. J. Piccart-Gebhart, E. T. Rutgers, L. J. Van't Veer and F. Cardoso (2009). "MammaPrint 70-gene profile quantifies the likelihood of recurrence for early breast cancer." Expert Opin Med Diagn **3**(2): 193-205.

Bera, T. K., T. Tsukamoto, D. K. Panda, T. Huang, R. C. Guzman, S. I. Hwang and S. Nandi (1998). "Defective retrovirus insertion activates c-Ha-ras protooncogene in an MNU-induced rat mammary carcinoma." Biochem Biophys Res Commun **248**(3): 835-840.

Bittner, J. (1936). "Some possible effects of nursing on the mammary gland tumor incidence in mice." Science **14**(84).

Bland, K. and E. Copeland (2007). La mama: manejo multidisciplinario de las enfermedades benignas y malignas.

Bland, K. and C. M (2005). The breast: comprehensive management of benign and malignant disorders. New York USA, Elsevier.

Bray, F., J. S. Ren, E. Masuyer and J. Ferlay (2013). "Global estimates of cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008." Int J Cancer **132**(5): 1133-1145.

Brock, A., S. Krause, H. Li, M. Kowalski, M. S. Goldberg, J. J. Collins and D. E. Ingber (2014). "Silencing HoxA1 by Intraductal Injection of siRNA Lipidoid Nanoparticles Prevents Mammary Tumor Progression in Mice." Sci Transl Med **6**(217): 217ra212.

Burger, A. M., X. Zhang and A. Seth (1998). "Detection of novel genes that are up-regulated (Di12) or down-regulated (T1A12) with disease progression in breast cancer." Eur J Cancer Prev **7 Suppl 1**: S29-35.

Burmeister, T. (2001). "Oncogenic retroviruses in animals and humans." Rev Med Virol **11**(6): 369-380.

Buscher, K., U. Trefzer, M. Hofmann, W. Sterry, R. Kurth and J. Denner (2005). "Expression of human endogenous retrovirus K in melanomas and melanoma cell lines." Cancer Res **65**(10): 4172-4180.

Callahan, R., W. Drohan, S. Tronick and J. Schlom (1982). "Detection and cloning of human DNA sequences related to the mouse mammary tumor virus genome." Proc Natl Acad Sci U S A **79**(18): 5503-5507.

Chang, Y. and P. S. Moore (2012). "Merkel cell carcinoma: a virus-induced human cancer." Annu Rev Pathol **7**: 123-144.

CONAPO (2006). Proyecciones de la población de México 2005-2050. México DF.

Curtis, C., S. P. Shah, S. F. Chin, G. Turashvili, O. M. Rueda, M. J. Dunning, D. Speed, A. G. Lynch, S. Samarajiwa, Y. Yuan, S. Graf, G. Ha, G. Haffari, A. Bashashati, R. Russell, S. McKinney, M. Group, A. Langerod, A. Green, E. Provenzano, G. Wishart, S. Pinder, P. Watson, F. Markowitz, L. Murphy, I. Ellis, A. Purushotham, A. L. Borresen-Dale, J. D. Brenton, S. Tavaré, C. Caldas and S. Aparicio (2012). "The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups." Nature **486**(7403): 346-352.

Danaei, G., S. Vander Hoorn, A. D. Lopez, C. J. Murray, M. Ezzati and g. Comparative Risk Assessment collaborating (2005). "Causes of cancer in the world: comparative risk assessment of nine behavioural and environmental risk factors." Lancet **366**(9499): 1784-1793.

DeBerardinis, R. J., J. J. Lum, G. Hatzivassiliou and C. B. Thompson (2008). "The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation." Cell Metab **7**(1): 11-20.

Delbue, S., D. V. Matei, C. Carloni, V. Pecchenini, S. Carluccio, S. Villani, V. Tringali, A. Brescia and P. Ferrante (2013). "Evidence supporting the association of

polyomavirus BK genome with prostate cancer." Med Microbiol Immunol **202**(6): 425-430.

Diamond, J. R., V. F. Borges, S. G. Eckhardt and A. Jimeno (2009). "BRCA in breast cancer: from risk assessment to therapeutic prediction." Drug News Perspect **22**(10): 603-608.

Eifel, P., J. A. Axelson, J. Costa, J. Crowley, W. J. Curran, Jr., A. Deshler, S. Fulton, C. B. Hendricks, M. Kemeny, A. B. Kornblith, T. A. Louis, M. Markman, R. Mayer and D. Roter (2001). "National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement: adjuvant therapy for breast cancer, November 1-3, 2000." J Natl Cancer Inst **93**(13): 979-989.

Etkind, P., J. Du, A. Khan, J. Pillitteri and P. H. Wiernik (2000). "Mouse mammary tumor virus-like ENV gene sequences in human breast tumors and in a lymphoma of a breast cancer patient." Clin Cancer Res **6**(4): 1273-1278.

Etkind, P. R., A. F. Stewart, T. Dorai, D. J. Purcell and P. H. Wiernik (2004). "Clonal isolation of different strains of mouse mammary tumor virus-like DNA sequences from both the breast tumors and non-Hodgkin's lymphomas of individual patients diagnosed with both malignancies." Clin Cancer Res **10**(17): 5656-5664.

Etkind, P. R., A. F. Stewart and P. H. Wiernik (2008). "Mouse mammary tumor virus (MMTV)-like DNA sequences in the breast tumors of father, mother, and daughter." Infect Agent Cancer **3**: 2.

Fan, H. and C. Johnson (2011). "Insertional oncogenesis by non-acute retroviruses: implications for gene therapy." Viruses **3**(4): 398-422.

Farias de Carvalho, S. M., M. S. Pombo de Oliveira, L. C. Thuler, M. Rios, R. C. Coelho, L. C. Rubim, E. M. Silva, A. M. Reis and D. Catovsky (1997). "HTLV-I and HTLV-II infections in hematologic disorder patients, cancer patients, and healthy individuals from Rio de Janeiro, Brazil." J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol **15**(3): 238-242.

Faschinger, A., F. Rouault, J. Sollner, A. Lukas, B. Salmons, W. H. Gunzburg and S. Indik (2008). "Mouse mammary tumor virus integration site selection in human and mouse genomes." J Virol **82**(3): 1360-1367.

Ferlay J, S. I., Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F. (2012). "Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]." Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013, from <http://globocan.iarc.fr>.

Ford, C. E., M. Faedo, R. Crouch, J. S. Lawson and W. D. Rawlinson (2004). "Progression from normal breast pathology to breast cancer is associated with

increasing prevalence of mouse mammary tumor virus-like sequences in men and women." Cancer Res **64**(14): 4755-4759.

Ford, C. E., D. Tran, Y. Deng, V. T. Ta, W. D. Rawlinson and J. S. Lawson (2003). "Mouse mammary tumor virus-like gene sequences in breast tumors of Australian and Vietnamese women." Clin Cancer Res **9**(3): 1118-1120.

Fukuoka, H., M. Moriuchi, H. Yano, T. Nagayasu and H. Moriuchi (2008). "No association of mouse mammary tumor virus-related retrovirus with Japanese cases of breast cancer." J Med Virol **80**(8): 1447-1451.

Goldhirsch, A., W. C. Wood, R. D. Gelber, A. S. Coates, B. Thurlimann, H. J. Senn and c. th St. Gallen (2007). "Progress and promise: highlights of the international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2007." Ann Oncol **18**(7): 1133-1144.

Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." Cell **144**(5): 646-674.

Holder, W. D., Jr. and S. A. Wells, Jr. (1983). "Antibody reacting with the murine mammary tumor virus in the serum of patients with breast carcinoma: a possible serological detection method for breast carcinoma." Cancer Res **43**(1): 239-244.

Holland, J. F. and B. G. Pogo (2004). "Mouse mammary tumor virus-like viral infection and human breast cancer." Clin Cancer Res **10**(17): 5647-5649.

Hughes, J. F. and J. M. Coffin (2001). "Evidence for genomic rearrangements mediated by human endogenous retroviruses during primate evolution." Nat Genet **29**(4): 487-489.

Hughes, J. F. and J. M. Coffin (2004). "Human endogenous retrovirus K solo-LTR formation and insertional polymorphisms: implications for human and viral evolution." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(6): 1668-1672.

Hulo, C., E. de Castro, P. Masson, L. Bougueleret, A. Bairoch, I. Xenarios and P. Le Mercier (2011). "ViralZone: a knowledge resource to understand virus diversity." Nucleic Acids Res **39**(Database issue): D576-582.

Indik, S., W. H. Gunzburg, B. Salmons and F. Rouault (2005). "Mouse mammary tumor virus infects human cells." Cancer Res **65**(15): 6651-6659.

INEGI. (2013). "Estadísticas a propósito del día Mundial contra el Cáncer." 2013.

Institute, N. C. (2014). "General Information About Breast Cancer." Retrieved 12/12/2013, from <http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/breast/Patient/page1>.

Iscovich, J., P. Boffetta, S. Franceschi, E. Azizi and R. Sarid (2000). "Classic kaposi sarcoma: epidemiology and risk factors." Cancer **88**(3): 500-517.

Isola, J., T. Visakorpi, K. Holli and O. P. Kallioniemi (1992). "Association of overexpression of tumor suppressor protein p53 with rapid cell proliferation and poor prognosis in node-negative breast cancer patients." J Natl Cancer Inst **84**(14): 1109-1114.

Jemal, A., F. Bray, M. M. Center, J. Ferlay, E. Ward and D. Forman (2011). "Global cancer statistics." CA Cancer J Clin **61**(2): 69-90.

Johal, H., C. Ford, W. Glenn, J. Heads, J. Lawson and W. Rawlinson (2011). "Mouse mammary tumor like virus sequences in breast milk from healthy lactating women." Breast Cancer Res Treat **129**(1): 149-155.

Kelly, C. M., S. Krishnamurthy, G. Bianchini, J. K. Litton, A. M. Gonzalez-Angulo, G. N. Hortobagyi and L. Pusztai (2010). "Utility of oncotype DX risk estimates in clinically intermediate risk hormone receptor-positive, HER2-normal, grade II, lymph node-negative breast cancers." Cancer **116**(22): 5161-5167.

Lacey, J. V., Jr., A. R. Kreimer, S. S. Buys, P. M. Marcus, S. C. Chang, M. F. Leitzmann, R. N. Hoover, P. C. Prorok, C. D. Berg, P. Hartge, L. C. Prostate and T. Ovarian Cancer Screening Trial Project (2009). "Breast cancer epidemiology according to recognized breast cancer risk factors in the Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian (PLCO) Cancer Screening Trial Cohort." BMC Cancer **9**: 84.

Latarjet, M. and A. Ruiz (2008). Anatomía Humana.

Levine, A. J. and A. M. Puzio-Kuter (2010). "The control of the metabolic switch in cancers by oncogenes and tumor suppressor genes." Science **330**(6009): 1340-1344.

Levine, P. H., B. G. Pogo, A. Klouj, S. Coronel, K. Woodson, S. M. Melana, N. Mourali and J. F. Holland (2004). "Increasing evidence for a human breast carcinoma virus with geographic differences." Cancer **101**(4): 721-726.

Liang, P., W. Zhu, X. Zhang, Z. Guo, R. P. O'Connell, L. Averboukh, F. Wang and A. B. Pardee (1994). "Differential display using one-base anchored oligo-dT primers." Nucleic Acids Res **22**(25): 5763-5764.

Liu, B., Y. Wang, S. M. Melana, I. Pelisson, V. Najfeld, J. F. Holland and B. G. Pogo (2001). "Identification of a proviral structure in human breast cancer." Cancer Res **61**(4): 1754-1759.

Luo, T., X. T. Wu, M. M. Zhang and K. Qian (2006). "[Study of mouse mammary tumor virus-like gene sequences expressing in breast tumors of Chinese women]." Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban **37**(6): 844-846, 851.

Lynch, H. T., E. Silva, C. Snyder and J. F. Lynch (2008). "Hereditary breast cancer: part I. Diagnosing hereditary breast cancer syndromes." Breast J **14**(1): 3-13.

Maginnis, M. S. and W. J. Atwood (2009). "JC virus: an oncogenic virus in animals and humans?" Semin Cancer Biol **19**(4): 261-269.

Mant, C., C. Gillett, C. D'Arrigo and J. Cason (2004). "Human murine mammary tumour virus-like agents are genetically distinct from endogenous retroviruses and are not detectable in breast cancer cell lines or biopsies." Virology **318**(1): 393-404.

Marta Lloret Sáez Bravo, David Aguiar Bujanda, Beatriz Pinar Sedeño and P. C. L. Jimenez (2004). "Cáncer de Mama." Biocancer **1**.

May, F. E., B. R. Westley, H. Rochefort, E. Buetti and H. Diggelmann (1983). "Mouse mammary tumour virus related sequences are present in human DNA." Nucleic Acids Res **11**(12): 4127-4139.

McLaughlin-Drubin, M. E. and K. Munger (2008). "Viruses associated with human cancer." Biochim Biophys Acta **1782**(3): 127-150.

Melana, S. M., J. F. Holland and B. G. Pogo (2001). "Search for mouse mammary tumor virus-like env sequences in cancer and normal breast from the same individuals." Clin Cancer Res **7**(2): 283-284.

Melana, S. M., I. Nepomnaschy, M. Sakalian, A. Abbott, J. Hasa, J. F. Holland and B. G. Pogo (2007). "Characterization of viral particles isolated from primary cultures of human breast cancer cells." Cancer Res **67**(18): 8960-8965.

Melana, S. M., M. A. Picconi, C. Rossi, J. Mural, L. V. Alonio, A. Teyssie, J. F. Holland and B. G. Pogo (2002). "[Detection of murine mammary tumor virus (MMTV) env gene-like sequences in breast cancer from Argentine patients]." Medicina (B Aires) **62**(4): 323-327.

Merlo, L. M., J. W. Pepper, B. J. Reid and C. C. Maley (2006). "Cancer as an evolutionary and ecological process." Nat Rev Cancer **6**(12): 924-935.

Miller, L. D., J. Smeds, J. George, V. B. Vega, L. Vergara, A. Ploner, Y. Pawitan, P. Hall, S. Klaar, E. T. Liu and J. Bergh (2005). "An expression signature for p53 status in human breast cancer predicts mutation status, transcriptional effects, and patient survival." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(38): 13550-13555.

Moore, D. H., J. Charney, B. Kramarsky, E. Y. Lasfargues, N. H. Sarkar, M. J. Brennan, J. H. Burrows, S. M. Sirsat, J. C. Paymaster and A. B. Vaidya (1971). "Search for a human breast cancer virus." Nature **229**(5287): 611-614.

Nawijn, M. C., A. Alendar and A. Berns (2011). "For better or for worse: the role of Pim oncogenes in tumorigenesis." Nat Rev Cancer **11**(1): 23-34.

Ono, M. (1986). "Molecular cloning and long terminal repeat sequences of human endogenous retrovirus genes related to types A and B retrovirus genes." J Virol **58**(3): 937-944.

Ono, M., T. Yasunaga, T. Miyata and H. Ushikubo (1986). "Nucleotide sequence of human endogenous retrovirus genome related to the mouse mammary tumor virus genome." J Virol **60**(2): 589-598.

Perez Tamayo, R. and E. López Corella (2007). Principios de Patología.

Ramsay, D. T., J. C. Kent, R. A. Hartmann and P. E. Hartmann (2005). "Anatomy of the lactating human breast redefined with ultrasound imaging." J Anat **206**(6): 525-534.

Reece, D. E., K. A. Foon, M. Bhattacharya-Chatterjee, D. Adkins, E. R. Broun, D. G. Connaghan, J. F. Dipersio, H. K. Holland, D. A. Howard, G. A. Hale, H. G. Klingemann, R. K. Munn, A. Raptis and G. L. Phillips (2003). "Use of the anti-idiotypic breast cancer vaccine 11D10 in conjunction with autologous stem cell transplantation in patients with metastatic breast cancer." Clin Breast Cancer **3 Suppl 4**: S152-157.

Rodriguez-Cuevas, S., C. G. Macias, D. Franceschi and S. Labastida (2001). "Breast carcinoma presents a decade earlier in Mexican women than in women in the United States or European countries." Cancer **91**(4): 863-868.

Russell, S. J., K. W. Peng and J. C. Bell (2012). "Oncolytic virotherapy." Nat Biotechnol **30**(7): 658-670.

Sambrook, J. and D. W. Russell (2006). "Preparation and Transformation of Competent E. coli Using Calcium Chloride." CSH Protoc **2006**(1).

Sarkar, N. H. (1995). "Clonal variations among multiple primary mammary tumors and within a tumor of individual mice: insertion mutations of int oncogenes." Virology **212**(2): 490-499.

Sauter, M., S. Schommer, E. Kremmer, K. Remberger, G. Dolken, I. Lemm, M. Buck, B. Best, D. Neumann-Haefelin and N. Mueller-Lantsch (1995). "Human endogenous retrovirus K10: expression of Gag protein and detection of antibodies in patients with seminomas." J Virol **69**(1): 414-421.

Schweiger, M. R., M. Kerick, B. Timmermann and M. Isau (2011). "The power of NGS technologies to delineate the genome organization in cancer: from mutations to structural variations and epigenetic alterations." Cancer Metastasis Rev **30**(2): 199-210.

Shah, K. V. (2007). "SV40 and human cancer: a review of recent data." Int J Cancer **120**(2): 215-223.

Silliman, R. A. (2006). "Whither quality of breast cancer care?" Med Care **44**(7): 607-608.

Singletary, S. E., C. Allred, P. Ashley, L. W. Bassett, D. Berry, K. I. Bland, P. I. Borgen, G. Clark, S. B. Edge, D. F. Hayes, L. L. Hughes, R. V. Hutter, M. Morrow, D. L. Page, A. Recht, R. L. Theriault, A. Thor, D. L. Weaver, H. S. Wieand and F. L. Greene (2002). "Revision of the American Joint Committee on Cancer staging system for breast cancer." J Clin Oncol **20**(17): 3628-3636.

Stewart, T. H., R. D. Sage, A. F. Stewart and D. W. Cameron (2000). "Breast cancer incidence highest in the range of one species of house mouse, *Mus domesticus*." Br J Cancer **82**(2): 446-451.

Stuver, S. O., C. Boschi-Pinto and D. Trichopoulos (1997). "Infection with hepatitis B and C viruses, social class and cancer." IARC Sci Publ(138): 319-324.

Tanaka, H., Y. Dong, Q. Li, S. Okret and J. A. Gustafsson (1991). "Identification and characterization of a cis-acting element that interferes with glucocorticoid-inducible activation of the mouse mammary tumor virus promoter." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(12): 5393-5397.

Theodorou, V., M. A. Kimm, M. Boer, L. Wessels, W. Theelen, J. Jonkers and J. Hilkens (2007). "MMTV insertional mutagenesis identifies genes, gene families and pathways involved in mammary cancer." Nat Genet **39**(6): 759-769.

Titus-Ernstoff L, Egan KM, Newcomb PA, Baron JA, Stampfer, M, Greenberg ER, Cole BF, Ding J, T. Willett W and C. D'Arrigo (1998). "Exposure to breast milk in infancy and adult breast cancer risk." J Natl Cancer Inst **90**(1): 5.

Tomlins, S. A., B. Laxman, S. M. Dhanasekaran, B. E. Helgeson, X. Cao, D. S. Morris, A. Menon, X. Jing, Q. Cao, B. Han, J. Yu, L. Wang, J. E. Montie, M. A. Rubin, K. J. Pienta, D. Roulston, R. B. Shah, S. Varambally, R. Mehra and A. M. Chinnaiyan (2007). "Distinct classes of chromosomal rearrangements create oncogenic ETS gene fusions in prostate cancer." Nature **448**(7153): 595-599.

Umekita, Y., Y. Ohi, Y. Sagara and H. Yoshida (2002). "Expression of maspin predicts poor prognosis in breast-cancer patients." Int J Cancer **100**(4): 452-455.

Uren, A. G., H. Mikkers, J. Kool, L. van der Weyden, A. H. Lund, C. H. Wilson, R. Rance, J. Jonkers, M. van Lohuizen, A. Berns and D. J. Adams (2009). "A high-throughput splinkerette-PCR method for the isolation and sequencing of retroviral insertion sites." Nat Protoc **4**(5): 789-798.

van Beers, E. H., S. A. Joosse, M. J. Ligtenberg, R. Fles, F. B. Hogervorst, S. Verhoef and P. M. Nederlof (2006). "A multiplex PCR predictor for aCGH success of FFPE samples." Br J Cancer **94**(2): 333-337.

Vanderhaegen, J., R. Paridaens and P. Neven (2012). "Adjuvant trastuzumab in HER2-positive breast cancer." N Engl J Med **366**(7): 664; author reply 664-666.

Walsh, T. and M. C. King (2007). "Ten genes for inherited breast cancer." Cancer Cell **11**(2): 103-105.

Wang, Y., V. Go, J. F. Holland, S. M. Melana and B. G. Pogo (1998). "Expression of mouse mammary tumor virus-like env gene sequences in human breast cancer." Clin Cancer Res **4**(10): 2565-2568.

Wang, Y., J. F. Holland, I. J. Bleiweiss, S. Melana, X. Liu, I. Pelisson, A. Cantarella, K. Stellrecht, S. Mani and B. G. Pogo (1995). "Detection of mammary tumor virus env gene-like sequences in human breast cancer." Cancer Res **55**(22): 5173-5179.

Wang, Y., J. D. Jiang, D. Xu, Y. Li, C. Qu, J. F. Holland and B. G. Pogo (2004). "A mouse mammary tumor virus-like long terminal repeat superantigen in human breast cancer." Cancer Res **64**(12): 4105-4111.

Wang, Y., S. M. Melana, B. Baker, I. Bleiweiss, M. Fernandez-Cobo, J. F. Mandeli, J. F. Holland and B. G. Pogo (2003). "High prevalence of MMTV-like env gene sequences in gestational breast cancer." Med Oncol **20**(3): 233-236.

Weigelt, B., F. L. Baehner and J. S. Reis-Filho (2010). "The contribution of gene expression profiling to breast cancer classification, prognostication and prediction: a retrospective of the last decade." J Pathol **220**(2): 263-280.

Wiernik, P. H. and P. R. Etkind (2006). "Is mouse mammary tumor virus an etiologic agent of human breast cancer and lymphoma?" South Med J **99**(2): 108-110.

Witkin, S. S., N. H. Sarkar, D. W. Kinne, R. A. Good and N. K. Day (1980). "Antibodies reactive with the mouse mammary tumor virus in sera of breast cancer patients." Int J Cancer **25**(6): 721-725.

Witt, A., B. Hartmann, E. Marton, R. Zeillinger, M. Schreiber and E. Kubista (2003). "The mouse mammary tumor virus-like env gene sequence is not detectable in breast cancer tissue of Austrian patients." Oncol Rep **10**(4): 1025-1029.

Yates, L. R. and P. J. Campbell (2012). "Evolution of the cancer genome." Nat Rev Genet **13**(11): 795-806.

Young, L. S. and A. B. Rickinson (2004). "Epstein-Barr virus: 40 years on." Nat Rev Cancer **4**(10): 757-768.

Zammarchi, F., M. Pistello, A. Piersigilli, R. Murr, C. Di Cristofano, A. G. Naccarato and G. Bevilacqua (2006). "MMTV-like sequences in human breast cancer: a fluorescent PCR/laser microdissection approach." J Pathol **209**(4): 436-444.

Zapata-Benavides, P., S. Saavedra-Alonso, D. Zamora-Avila, C. Vargas-Rodarte, R. Barrera-Rodriguez, J. Salinas-Silva, C. Rodriguez-Padilla, R. Tamez-Guerra and L. Trejo-Avila (2007). "Mouse mammary tumor virus-like gene sequences in breast cancer samples of Mexican women." Intervirology **50**(6): 402-407.

zur Hausen, H. (2009). "Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account." Virology **384**(2): 260-265.

zur Hausen, H. and E. M. de Villiers (2009). "TT viruses: oncogenic or tumor-suppressive properties?" Curr Top Microbiol Immunol **331**: 109-116.