

Cinvestav

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**ASOCIACIÓN ENTRE HAPLOGRUPOS/HAPLOTIPOS
MITOCONDRIALES Y CÁNCER DE MAMA EN POBLACIÓN MEXICANA
Y EVALUACIÓN DE LA PRESENCIA DEL RETROVIRUS MMTV/HMTV**

Tesis que presenta

BQD María Gutiérrez Sánchez

Para obtener el grado de

Maestra en Ciencias

En la especialidad de

Genética y Biología Molecular

Directores de Tesis

Dra. María de Lourdes Muñoz Moreno

Dr. Normand García Hernández

Ciudad de México

Noviembre, 2017

Este trabajo fue realizado en el laboratorio 1 del Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN bajo la dirección de la Dra. María de Lourdes Muñoz Moreno y el Dr. Normand García Hernández y la asesoría de la Dra. Rosa María Bermúdez Cruz y el Dr. Javier Hernández Sánchez.

Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y al PNPC por el otorgamiento de la beca 705245, ya que gracias a ésta se logró el desarrollo y culminación de este proyecto.

DEDICATORIAS

A mi mamá nuevamente, siempre primero cabecita blanca. Aunque sigo sin encontrar las palabras adecuadas para agradecer todo, lo único que me queda es seguir intentando y gritarlo cada vez más fuerte.

A José Luis Meza, por estar presente en cada momento de mi vida y apoyarme incondicionalmente.

A Mamá y Papá, por cuidarme siempre, nunca dejarán de ser los mejores.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. María de Lourdes Muñoz Moreno y al Dr. Normand García Hernández por aceptarme como parte de su equipo de trabajo.

A mis asesores, la Dra. Rosa María Bermúdez Cruz y el Dr. Javier Hernández Sánchez por sus siempre oportunas observaciones.

A Eduardo Domínguez, por ser mi ñoño favorito, por todas las pláticas y tonterías interminables, por todo lo que me enseñaste, por estar dispuesto a apoyarme en todo momento, por hacerme reír cuando más lo necesitaba y por ser de esas personas que deben permanecer a lo largo de la vida.

A Ashael Pérez, por ser mi couch, incluirme en el proyecto y darme la oportunidad de trabajar con el material que con mucho esfuerzo él logró conseguir.

A Manuel Sandoval, por seguir siendo cómplice y compañero de vida y por el apoyo incondicional que siempre me brinda, a pesar de todo.

A mis compañeros del laboratorio 1, Angie, Migue, César, Heriberto, Rosi, Miri, Armando; y de Centro Médico, Alex, Pina y Monse, por brindarme sus sugerencias para la mejora de este trabajo.

A mis compañeros de generación Ulises, Karla, Carlos, Fer, Noé y Rolando, por las pláticas en el café, por las fiestas y aventuras compartidas.

A Hebert Cadena García por el apoyo técnico brindado para la realización de este trabajo, siempre amable, siempre con una sonrisa.

A Guadalupe Aguilar González, responsable de la Unidad de Ácidos Nucleicos, por el apoyo técnico indispensable para la obtención de las secuencias de interés.

**La ciencia es una sola luz, e iluminar con ella cualquier parte,
es iluminar con ella el mundo entero.**

Isaac Asimov

**El aspecto más triste de la vida actual es que la ciencia gana en
conocimiento más rápidamente que la sociedad en sabiduría.**

Isaac Asimov

**Probablemente la única áncora de salvación sea la ciencia...
Pero además hay que vivir.**

Julio Cortázar

IL FAUT TENTER DE VIVRE! – Paul Valéry

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	v
ÍNDICE DE TABLAS	vi
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
MARCO TEÓRICO	3
Cáncer de mama	3
Epidemiología	3
Clasificación	7
Factores de riesgo	9
DNA mitocondrial (mtDNA)	10
Haplogrupos mitocondriales	14
Virus y cáncer	17
MMTV/HMTV	17
Mutagénesis insercional	21
Estudios de prevalencia de MMTV/HMTV en muestras humanas	22
JUSTIFICACIÓN	26
OBJETIVOS	27
Objetivo general	27
Objetivos particulares	27
HIPÓTESIS	27
MATERIALES Y MÉTODOS	28
Diagrama de flujo experimental	28
Material Biológico	29
Criterios de selección para muestras de tejido adyacente y tumoral de pacientes mexicanas diagnosticadas con cáncer de mama	29
Criterios de selección para muestras sanguíneas de mujeres sin antecedentes de cáncer de mama	29
Variables de estudio	30
Cálculo del tamaño de la muestra	30
Extracción de DNA de tejido tumoral y adyacente	32

Cuantificación de DNA total.....	33
Detección del retrovirus MMTV/HMTV	33
Determinación de haplogrupos mitocondriales amerindios mediante PCR en tiempo real	35
Amplificación de la región D-loop mediante PCR punto final.....	35
Electroforesis del producto de PCR punto final.....	36
Purificación del producto de PCR punto final	37
Reacción de Secuenciación	37
Purificación de la reacción de secuenciación	38
Determinación de haplogrupos	38
Análisis estadístico de la asociación de haplogrupos mitocondriales con el desarrollo de cáncer de mama.....	40
RESULTADOS	42
Características de las pacientes con cáncer de mama.....	42
Obtención del DNA de las muestras de tejido tumoral y adyacente	44
Identificación del fragmento del gen <i>Env</i> de MMTV/HMTV en muestras de tejido tumoral y adyacente	44
Determinación de haplogrupos mitocondriales amerindios mediante PCR en tiempo real	46
Amplificación de la región D-loop mediante PCR punto final.....	48
Obtención de las secuencias e identificación de los polimorfismos.....	49
Confirmación del haplogrupo B.....	51
Determinación de haplogrupos y subhaplogrupos de pacientes y controles	52
Asociación entre haplogrupos y/o haplotipos mitocondriales con la presencia del MMTV/HMTV y/o con el desarrollo de cáncer de mama	60
DISCUSIÓN	64
CONCLUSIONES.....	70
PERSPECTIVAS.....	71
BIBLIOGRAFÍA.....	72

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Incidencia de tumor maligno de mama por entidad federativa por 100,000 mujeres mayores de 20 años en 2015.....	4
Figura 2 Mortalidad de tumor maligno de mama por entidad federativa por 100,000 mujeres mayores de 20 años en 2015.....	4
Figura 3 Características de una célula tumoral.....	5
Figura 4 Anatomía de una mama.....	6
Figura 5 DNA mitocondrial.....	11
Figura 6 Migración de poblaciones humanas y haplogrupos principales de mtDNA.....	14
Figura 7 Haplogrupos mitocondriales en población mestizo mexicana.....	15
Figura 8 Genoma característico de un β -retrovirus.....	19
Figura 9 Estructura de un β -retrovirus maduro e inmaduro.....	19
Figura 10 Eventos de mutagénesis insercional.....	21
Figura 11 Prevalencia del retrovirus MMTV/HMTV.....	23
Figura 12 Diagrama de flujo experimental.....	28
Figura 13 PCR anidada del gen Env del MMTV.....	33
Figura 14 Resultado de la primera amplificación de PCR anidada.....	45
Figura 15 Resultado de la segunda amplificación de PCR anidada.....	45
Figura 16 Gráfica de discriminación alélica para el haplogrupo A.....	46
Figura 17 Gráfica de discriminación alélica para el haplogrupo C.....	47
Figura 18 Gráfica de discriminación alélica para el haplogrupo D.....	48
Figura 19 Amplicones del fragmento de 988 pb de la región control de mtDNA de las muestras 75 a 78.....	49
Figura 20 Alineamiento y comparación de secuencia problema con rCRS.....	50
Figura 21 Ejemplo de secuencia de haplogrupo D1 obtenido de la base de datos Mitomap.....	50
Figura 22 Ejemplo de electroferograma.....	51
Figura 23 Ejemplo del producto de PCR punto final para identificar 8281-8289del.....	52
Figura 24 Frecuencias de haplogrupos.....	54
Figura 25 Frecuencias de subhaplogrupos de A.....	54
Figura 26 Frecuencia de subhaplogrupos de B.....	56
Figura 27 Frecuencia de subhaplogrupos de C.....	58
Figura 28 Frecuencia de subhaplogrupos de D.....	59

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Frecuencia de haplogrupos mitocondriales de acuerdo a la región geográfica de nacimiento	15
Tabla 2 Estudios de la prevalencia de MMTV/HMTV en cáncer de mama en humanos.....	24
Tabla 3 Cálculo del tamaño de la muestra para el porcentaje del haplogrupo A	30
Tabla 4 Cálculo del tamaño de la muestra para el porcentaje del haplogrupo B	31
Tabla 5 Cálculo del tamaño de la muestra para el porcentaje del haplogrupo C	31
Tabla 6 Cálculo del tamaño de la muestra para el porcentaje del haplogrupo D	31
Tabla 7 Concentración y volumen necesario de cada reactivo para la PCR anidada del gen Env de MMTV	34
Tabla 8 Concentración y volumen necesario de cada reactivo para la PCR punto final de la región D-loop	36
Tabla 9 Concentración y volumen necesario de cada reactivo para la reacción de secuenciación de la región D-loop.....	38
Tabla 10 Polimorfismos que determinan los haplogrupos y subhaplogrupos de A, B, C y D con respecto a la secuencia de referencia de Cambridge.....	39
Tabla 11 Características de las pacientes con cáncer de mama.....	42
Tabla 12 Frecuencias de haplogrupos y subhaplogrupos	53
Tabla 13 Variantes presentes en pacientes de haplogrupo A.....	55
Tabla 14 Variantes presentes en pacientes de haplogrupo B.....	57
Tabla 15 Variantes presentes en pacientes de haplogrupos C y D	59
Tabla 16 Variantes presentes en pacientes de haplogrupos no amerindios	60
Tabla 14 Análisis de asociación de haplogrupos mitocondriales amerindios con el desarrollo de cáncer de mama	61
Tabla 15 Análisis de asociación de subhaplogrupos A con el desarrollo de cáncer de mama...61	
Tabla 16 Análisis de asociación de subhaplogrupos B con el desarrollo de cáncer de mama...62	
Tabla 17 Análisis de asociación de subhaplogrupos C con el desarrollo de cáncer de mama...62	
Tabla 18 Análisis de asociación de subhaplogrupos D con el desarrollo de cáncer de mama...62	
Tabla 19 Análisis de asociación de SNV's con el desarrollo de cáncer de mama	63

RESUMEN

El cáncer es un término que designa un grupo de enfermedades que pueden afectar cualquier parte del organismo y se caracteriza por el crecimiento descontrolado de células anormales en el cuerpo. Actualmente el cáncer de mama es una prioridad en salud pública a nivel mundial y en México al ser la neoplasia más frecuente en mujeres. Se ha demostrado que variantes en el genoma mitocondrial confieren riesgo, esencialmente SNP's que se relacionan con el origen étnico de la población y se han identificado 297 polimorfismos (haplotipos) asociados, siendo los más frecuentes las de la región D-loop. También se sabe que el Virus de Tumor Mamario Murino (MMTV), contribuye a la generación de tumores mamarios en ratones y de manera similar se han encontrado secuencias virales en tejido mamario canceroso de mujeres de distintas partes del mundo. Se ha descrito que algunos haplogrupos mitocondriales pueden actuar como factor de riesgo y/o protección en cáncer y también pueden favorecer el desarrollo de enfermedades causadas por infecciones virales.

Por lo anterior, en el presente trabajo se determinó el haplogrupo mitocondrial mediante PCR tiempo real y secuenciación del D-loop de 100 pacientes mexicanas diagnosticadas con cáncer de mama. La frecuencia de los haplogrupos amerindios fue la siguiente: haplogrupo A, 36%; B, 26%; C, 17% y D, 12% y 9% de haplogrupos no amerindios. Se identificaron un total de 97 variantes de nucleótido simple (SNV) en la región control, 33 en la Región Hipervariable II y 64 en la Región Hipervariable I. La secuencia del gen de la envoltura del retrovirus MMTV/HMTV no se identificó en ninguna muestra de tejido tumoral o tejido adyacente al tumor.

Del análisis estadístico de asociación se obtuvo que el haplogrupo D representa un factor de riesgo para el desarrollo de cáncer de mama ($P = 0.001$) y en particular el subhaplogrupo D1 es el que confiere el riesgo ($P = 0.02$). El subhaplogrupo B4 representa un factor de protección en el desarrollo de cáncer de mama ($P = 0.01$). Además se identificó que la variante G16274A representa un factor de riesgo para el desarrollo de la neoplasia ($P = 0.002$) y finalmente la variante T16519C también representa un factor de riesgo para el desarrollo de cáncer de mama ($P = 0.01$)

ABSTRACT

Cancer is a term that designates a group of diseases that can affect any part of the organism; it is characterized by the uncontrolled growth of abnormal cells in the body. Currently, breast cancer is a public health priority in the world and in Mexico since it is the most frequent neoplasm among women. It has been shown that variants in the mitochondrial DNA confer risk, essentially SNPs that are related to the ethnic origin of the population and 297 associated polymorphisms (haplotypes) have been identified; the most frequent, those in the D-loop region. It is also known that Murine Mammary Tumor Virus (MMTV) contributes to the generation of mammary tumors in mice and viral sequences have been found in cancerous breast tissue of women from different countries around the world. Some mitochondrial haplogroups have been reported to act as a risk and/or protection factor in cancer and may also favor the development of diseases caused by viral infections.

In the present work the mitochondrial haplogroup was determined by real-time PCR and D-loop sequencing of 100 Mexican patients diagnosed with breast cancer. The frequency of Amerindian haplogroups was as follows: haplogroup A, 36%; B, 26%; C, 17% and D, 12% and 9% of non-Amerindian haplogroups. A total of 97 single nucleotide variants (SNVs) were identified in the control region, 33 in the Hypervariable II Region and 64 in the Hypervariable I Region. The MMTV/HMTV retrovirus envelope gene sequence was not identified in any sample of tumor tissue or adjacent tissue.

From the statistical analysis of association it was obtained that haplogroup D represents a risk factor for the development of breast cancer ($P = 0.001$), in particular subhaplogroup D1 is the one that confers the risk ($P = 0.02$). Subhaplogroup B4 represents a protective factor in the development of breast cancer ($P = 0.01$). In addition, G16274A represents a risk factor for the development of the neoplasia ($P = 0.002$) and finally the T16519C variant also represents a risk factor for the development of breast cancer ($P = 0.01$).

MARCO TEÓRICO

Cáncer de mama

Epidemiología

El cáncer es un término que designa un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar cualquier parte del organismo. Estas enfermedades se caracterizan por el crecimiento descontrolado de células anormales en el cuerpo (Organización Mundial de la Salud, 2015). El cáncer de mama, constituye una prioridad de salud pública a nivel mundial, ya que a pesar de ser el segundo tipo de cáncer más común, es por mucho el más frecuente entre las mujeres ya que se diagnosticaron aproximadamente 1.67 millones de casos nuevos en 2012, lo que representó un 25% de todos los casos de cáncer diagnosticados ese año (GLOBOCAN, 2012).

Existe una gran variación en la prevalencia dependiendo de la zona geográfica, lo que se atribuye a la exposición a diferentes factores relacionados al estilo de vida o medio ambiente (GLOBOCAN, 2012). En la población mexicana de más de 20 años, en 2014, del total de casos de cáncer diagnosticados, el de mama es el de mayor presencia, con 19.4%. Por sexo, en los hombres representa el 1% del total de casos; tres de cada diez mujeres mayores de 20 años, tiene cáncer de mama. En 2015 se reportó que la incidencia de tumor maligno de mama en la población mayor de 20 años fue de 28.75 casos nuevos por cada 100,000 personas, además de que alcanza su punto máximo en mujeres de entre 60 y 64 años de edad (68.05 casos por cada 100,000 mujeres de ese grupo de edad). (INEGI, 2016).

En cuanto a la mortalidad, el cáncer de mama es la quinta causa de muerte por cáncer en el mundo, siendo la más frecuente en mujeres de países en desarrollo, donde representa el 14.3% (324,000 muertes) del total de muertes por cáncer y en países desarrollados ocupa el segundo puesto después del cáncer de pulmón, con 15.4% (198,000 muertes) del total de muertes por cáncer (GLOBOCAN, 2012). La tasa de mortalidad que se reportó en 2014 por cáncer de mama en el país fue de 15 defunciones por cada 100,000 mujeres mayores de 20 años (INEGI, 2016).

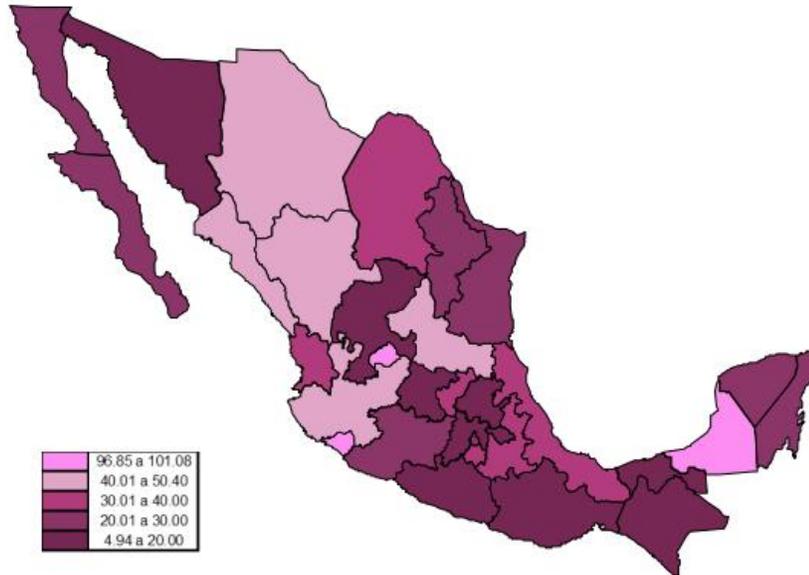


Figura 1 Incidencia de tumor maligno de mama por entidad federativa por 100,000 mujeres mayores de 20 años en 2015 (INEGI, 2016)

Por entidad federativa, en 2015 se observó que el cáncer de mama tiene mayor incidencia en los estados de Colima, Campeche y Aguascalientes (101.08, 97.6 y 96.85 casos nuevos por cada 100,000 mujeres mayores de 20 años, respectivamente), mientras que en los que tienen menor incidencia son los estados de Tlaxcala (8.41), Guerrero (6.82) y Chiapas (4.94) como se observa en la Figura 1.

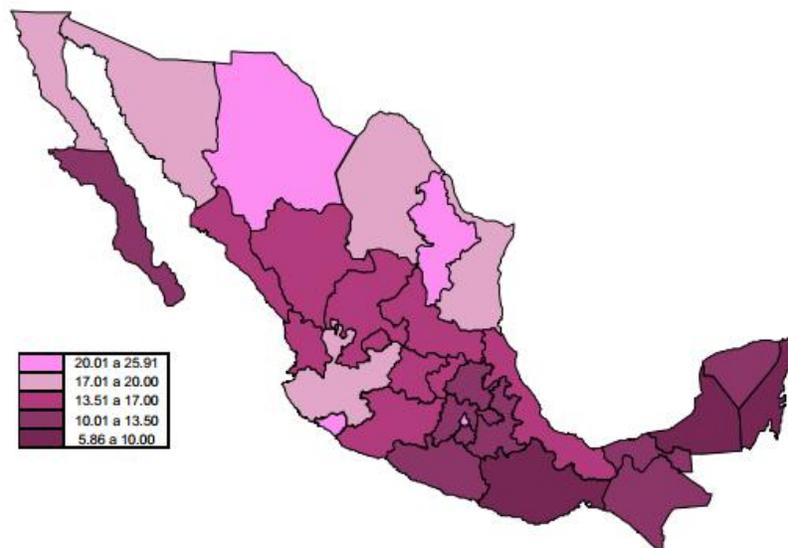


Figura 2 Mortalidad de tumor maligno de mama por entidad federativa por 100,000 mujeres mayores de 20 años en 2015 (INEGI, 2016)

En cuanto a la mortalidad por cáncer de mama por entidad federativa, para el mismo año se encuentra que los estados de Chihuahua, Nuevo León y la Ciudad de México tienen más de 20 fallecimientos por cada 100,000 mujeres mayores de 20 años (25.91, 22.4 y 21.41, respectivamente), siendo Campeche el estado con la tasa más baja (5.86 muertes por cada 100,000 mujeres mayores de 20 años), al cual le siguen los estados de Oaxaca y Quintana Roo con menos de 10 muertes como se observa en la Figura 2 (INEGI, 2016).

Etiología

El cáncer de mama es el crecimiento descontrolado de las células mamarias. En general, el cáncer es el resultado de mutaciones en genes que regulan el crecimiento y la proliferación celular. Las características del cáncer comprenden capacidades biológicas adquiridas por la célula durante el desarrollo de los tumores en múltiples pasos, que incluyen: señalización sostenida de proliferación, evasión de supresores de crecimiento, resistencia a la apoptosis, inmortalidad, inducción de angiogénesis, activación de la invasión y metástasis, la reprogramación del metabolismo energético y la evasión de la destrucción por el sistema inmune, como se muestra en la Figura 3 (Hanahan & Weinberg, 2011).



Figura 3 Características de una célula tumoral (Modificado de Hanahan & Weinberg, 2011)

En el cáncer de mama suceden algunas características mencionadas anteriormente dando origen a la formación de células malignas en el tejido mamario. La mama está conformada por 15 a 20 lóbulos, que a su vez están conformados por lobulillos, los cuales poseen docenas de glándulas que producen leche y que se encuentran conectados por tubos muy delgados llamados conductos, los cuales transportan la leche desde los lobulillos hasta el pezón. Cada mama tiene vasos sanguíneos y vasos linfáticos; estos últimos transportan un líquido casi incoloro que se llama linfa entre los ganglios linfáticos, los cuales son estructuras pequeñas con forma de frijol que se encuentran en todo el cuerpo cuya función es filtrar sustancias en la linfa y ayudan a combatir infecciones y enfermedades. Hay racimos de ganglios linfáticos cerca de la mama en las axilas (debajo de los brazos), por encima de la clavícula y en el pecho, como se muestra en la Figura 4 (National Cancer Institute, 2017).

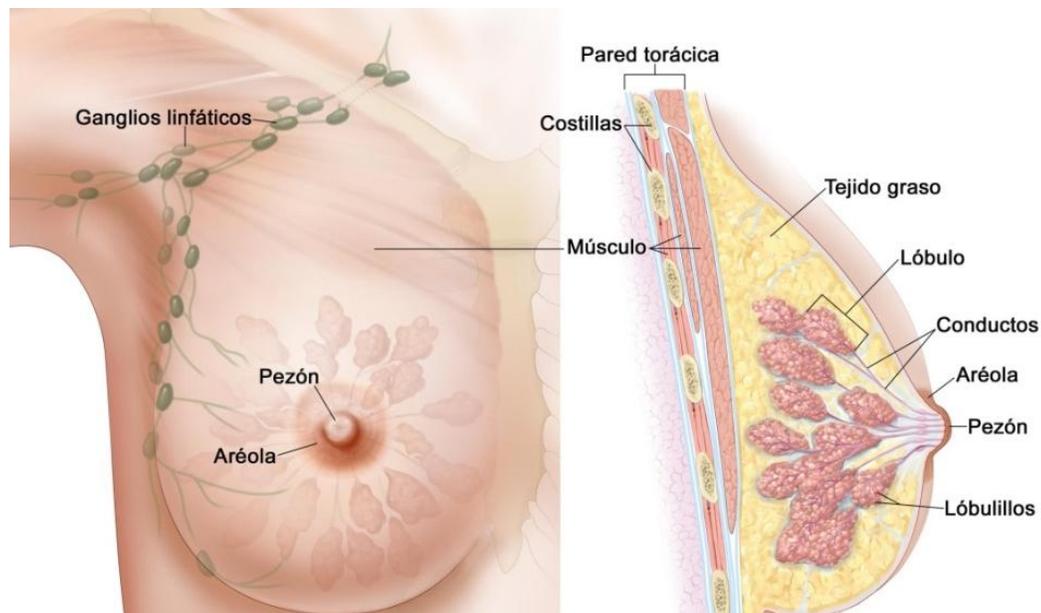


Figura 4 Anatomía de una mama (National Cancer Institute, 2017)

Generalmente, el cáncer de mama se origina en las células de los lobulillos o en los conductos pero puede originarse con menos frecuencia en los tejidos estromales, que incluyen a los tejidos conjuntivos grasos y fibrosos de la mama. Con el paso del tiempo, las células cancerígenas pueden invadir el tejido mamario sano circundante y llegar a los ganglios linfáticos de las axilas. Si las células cancerígenas llegan a los ganglios linfáticos pueden llegar hasta otras partes del cuerpo. Los estadios del cáncer de mama

hacen referencia al tamaño del tumor, a su invasividad hacia ganglios linfáticos y a qué tan lejos se han propagado las células cancerígenas más allá del tumor original (Breast Cancer Organization, 2016).

Clasificación

El cáncer de mama puede ser clasificado de diversas formas, incluyendo las características clínicas, la expresión de marcadores tumorales y el tipo histológico, entre otros. La mayoría de casos de cáncer de mama se trata de carcinomas, es decir, que se originan en células epiteliales, más específicamente adenocarcinomas, en los cuales las células malignas pertenecen al tejido glandular (C. I. Li, Uribe, & Daling, 2005).

Existen dos tipos histológicos principales de cáncer de mama, clasificados por el lugar donde se origina: el carcinoma ductal, el cual se inicia en las células de los conductos, y el carcinoma lobular, el cual comienza en los lóbulos o lobulillos. Estos a su vez pueden clasificarse en carcinoma ductal/lobular *in situ* (que no se ha propagado) o invasivo/infiltrante (que ha invadido al tejido circundante) (American Cancer Society, 2016).

El sistema **TNM**, desarrollado por la American Joint Committee on Cancer (AJCC), es el más utilizado clínicamente para asignar un estadio a cada paciente. El sistema TNM se basa en tres factores:

La categoría **T** describe el tamaño del tumor primario y si ya existe infiltración del mismo. Esta categoría se clasifica en:

- **TX**: no es posible medir o hallar el tumor
- **T0**: no hay indicio alguno del tumor primario
- **Tis**: el cáncer se encuentra *in situ*, es decir, que el tumor no ha empezado a crecer en el tejido mamario sano

- **T1, T2, T3, T4:** los números se basan en el tamaño del tumor y en qué medida éste ha afectado tejido mamario circundante; cuanto más alto es el número T, más grande es el tumor o más tejido mamario circundante está afectado

La categoría **N** indica si el cáncer ha afectado a los ganglios linfáticos cercanos:

- **NX:** no es posible medir o hallar los ganglios linfáticos cercanos
- **N0:** los ganglios linfáticos cercanos no presentan cáncer
- **N1, N2, N3:** los números se basan en la cantidad de ganglios linfáticos afectados y qué nivel de cáncer presentan

La categoría **M** (metástasis) indica que el cáncer se ha propagado a otras partes del cuerpo.

- **MX:** no es posible medir o hallar metástasis
- **M0:** no hay metástasis distante
- **M1:** se ha detectado metástasis distante

La información obtenida mediante la determinación de las categorías T, N y M da lugar a un proceso llamado estadificación, donde cada estadio generalmente tiene un pronóstico similar y de esta forma puede también decidirse el tratamiento al que debe someterse la paciente. El estadio suele expresarse con un número entre 0 y IV, donde el estadio 0 corresponde a cáncer no invasivo y el estadio IV es cáncer invasivo que se propaga hacia otras partes del cuerpo (American Joint Committee on Cancer, 2009).

Otro aspecto que también es tomado en cuenta para el pronóstico y tratamiento de la enfermedad es la presencia de receptores. Los receptores de estrógenos y de progesterona actúan directamente en el crecimiento, diferenciación y supervivencia del epitelio mamario. Por otra parte, el receptor Her2/neu afecta la proliferación y supervivencia celular y se encuentra sobreexpresado en el 15 a 20% de los casos de cáncer de mama (Krishnamurti & Silverman, 2014; Taneja *et al.*, 2010).

Factores de riesgo

Existen múltiples factores de riesgo que promueven el desarrollo del cáncer de mama, los cuales pueden ser divididos en dos grupos. El primer grupo incluye factores inherentes como: edad, género, etnicidad, factores genéticos que promuevan un historial familiar con cáncer de mama y tejido mamario denso, entre otros. En el segundo grupo se incluyen factores extrínsecos dados por el estilo de vida, como la dieta, el consumo de fármacos anticonceptivos, la terapia hormonal con estrógenos después de la menopausia, el consumo de alcohol, sobrepeso y obesidad, entre otros (Kamińska, Ciszewski, Łopacka-szatan, Miotła, & Starosławska, 2015).

Entre el 5 y el 10% de todos los casos de cáncer son causados por mutaciones de línea germinal con alta penetrancia en genes como *BRCA1*, *BRCA2*, *p53* y *PTEN*, los cuales confieren un alto riesgo de desarrollar cáncer de mama hereditario. Los individuos con mutaciones en dichos genes presentan un 80% de probabilidad de desarrollar cáncer de mama. El gen *BRCA2* tiene la función de Rad52 y está relacionado con la reparación del DNA en la recombinación homóloga y el gen *BRCA1* interviene en la reparación del DNA, siendo un punto de control en el ciclo celular al participar como regulador transcripcional al ubiquitinar proteínas y actuar en la remodelación de la cromatina (Abdulkareem & Zurmi, 2012; Fackenthal & Olopade, 2007).

Actualmente se conocen más de 1900 alteraciones en el DNA mitocondrial que contribuyen al desarrollo de neoplasias. En cáncer de mama se han identificado 297 mutaciones o polimorfismos (haplotipos) asociados, siendo los más frecuentes de la región D-loop tales como: T489C, D310, A263G, T226C, G225A, T195C, A153G, T16519C, C16278T, A16183G; en el gen ND5: G13708A; en el gen ND4: G11719A; en el gen ND3: A10398G; en ATPasa8: G9055A y en el gen 16s del rRNA: A3197C (Bai, Leal, Covarrubias, Liu, & Wong, 2007; Czarnecka et al., 2010; Xu *et al.*, 2012).

Los efectos de algunos polimorfismos del DNA mitocondrial han sido relacionados con algunos eventos de la dinámica mitocondrial, tales como la producción de ATP, el

consumo de oxígeno, la producción de ROS, la regulación del pH de la matriz mitocondrial y la apoptosis (Guardado-Estrada et al., 2012)

DNA mitocondrial (mtDNA)

Como se mencionó anteriormente, las mitocondrias juegan un papel importante en el desarrollo y/o progresión del cáncer de mama. Por este motivo, para comprender mejor los efectos de las alteraciones mitocondriales, es importante conocer algunos de sus aspectos básicos.

Las mitocondrias son organelos citoplasmáticos pequeños de doble membrana que producen la energía celular en forma de moléculas de ATP mediante la fosforilación oxidativa (OXPHOS), además de actuar en otras funciones celulares como la oxidación de ácidos grasos, biosíntesis de aminoácidos y grupos hemo, apoptosis y transducción de señales.

La mitocondria posee su propio genoma mitocondrial, el cual es una molécula de DNA circular de 16,569 pb; la cadena interna se denomina “ligera” (L) y la cadena externa “pesada” (H) por el contenido de guaninas en éstas, que afecta su peso molecular. El mtDNA codifica para 37 genes: 2 RNAs ribosomales (rRNAs), 22 RNAs de transferencia (tRNAs) y 13 genes que codifican proteínas (PCGs) como se observa en la Figura 5 (Bonawitz, Clayton, & Shadel, 2006; Yadav & Chandra, 2013).

La única región de control no codificante presenta un tamaño de 1.1 Kb y es conocido como “displacement-loop” (D-loop). El D-loop es una estructura de DNA donde la doble cadena de la molécula de mtDNA es separada por una tercera hebra de DNA conocida como 7S. Esta tercera hebra tiene una secuencia que es complementaria a una de las cadenas principales y se aparea con ella, desplazando así a la otra cadena principal (Li, Liu, Lu, & Bai, 2012).

El D-loop contiene dos regiones hipervariables, la HVR1 y la HVR2, en las posiciones 16024-16383 y 57-372, respectivamente. Se estima que el rango de mutación en estas regiones hipervariables es de 100 a 200 veces mayor que en el DNA nuclear, específicamente en un tracto de poli-C llamada región D310, la cual es más susceptible a daño oxidativo y ataque nucleofílico. A pesar de que el D-loop no codifica para ninguna proteína, es responsable del control de la replicación ya que ahí se encuentra el origen de la hebra líder y también de la transcripción del genoma mitocondrial, al contener el principal promotor de la transcripción. Es por ello que las mutaciones en esta región, modifican la expresión genómica mitocondrial y pueden desregular el metabolismo (Bonawitz *et al.*, 2006; Cai *et al.*, 2011; Weigl, Paradiso, & Tommasi, 2013).

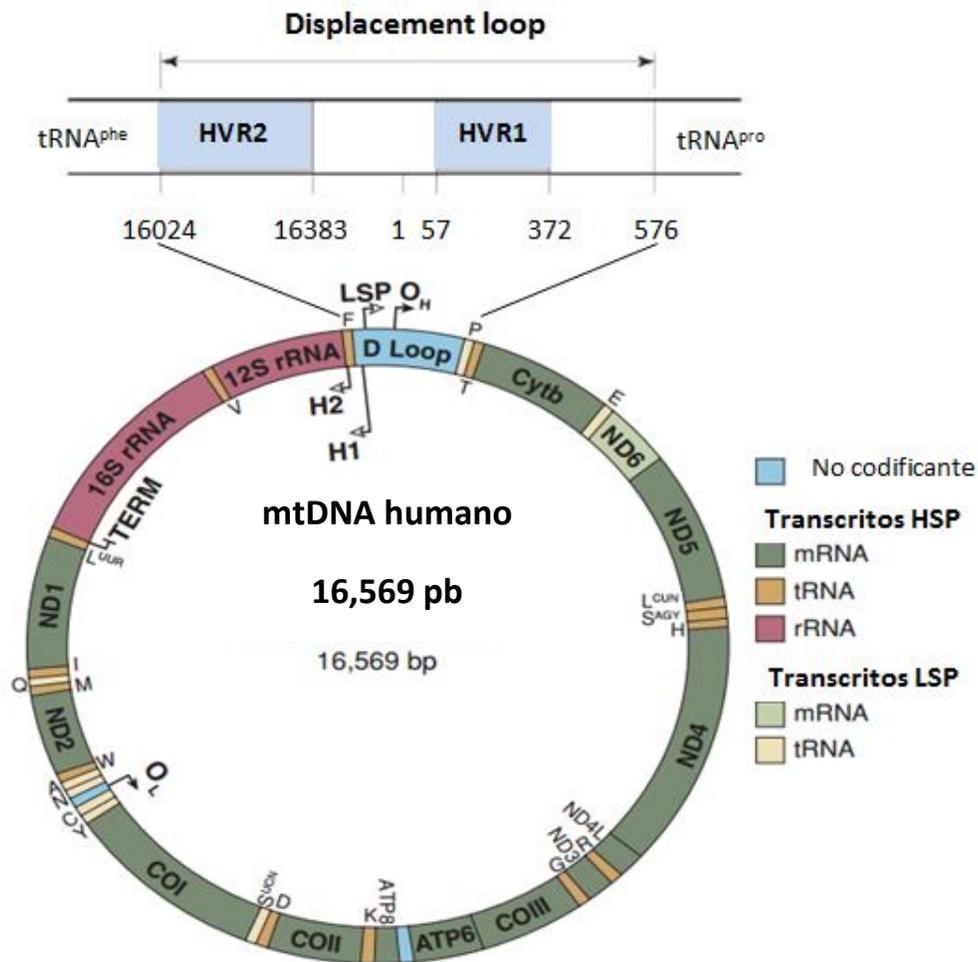


Figura 5 DNA mitocondrial (Tomada y modificada de Falkenberg, 2007)

La replicación del mtDNA es llevada a cabo por un complejo multiproteico llamado replisoma que está compuesto por la polimerasa- γ (Pol γ), la helicasa (Twinkle, también conocida como PEO1), la topoisomerasa I, proteínas de unión a mtDNA de cadena simple, entre otros. Se han propuesto dos modelos para la replicación del mtDNA. En el modelo “asincrónico” o “desplazamiento de hebra”, la replicación se inicia junto con la transcripción en el D-loop y procede conforme las manecillas del reloj desde el origen de replicación de la cadena pesada (O_H , también conocido como OriH) hasta que el origen de replicación de la cadena ligera (O_L) es expuesto, permitiendo que la síntesis de la cadena ligera proceda también conforme las manecillas del reloj hasta que la molécula entera es copiada. Alternativamente, la replicación “simétrica” se inicia desde múltiples orígenes distribuidos a lo largo de un fragmento de 4Kb a partir del extremo 3' del D-loop y procede en ambas direcciones de la burbuja de replicación que se forma; la replicación es arrestada en el O_H , permitiendo que el resto de la molécula se copie en una sola dirección (Stewart & Chinnery, 2015).

En cuanto a la transcripción, el mtDNA posee tres promotores de la transcripción: el promotor de cadena pesada 1 (HSP1) permite la transcripción de los dos RNAs ribosomales; el promotor HSP2 promueve la transcripción del resto de la cadena pesada como un transcrito policistrónico largo, el cual es procesado subsecuentemente en tRNA, rRNA y mRNAs funcionales; por último, el promotor de cadena ligera (LSP) permite la transcripción de una gran cantidad de pequeños oligos mediante la RNasa mitocondrial de procesamiento. Estos oligos permiten la unión de la transcripción y la replicación del DNA. El inicio de la transcripción incluye diversas proteínas, incluyendo la RNA polimerasa mitocondrial y los factores de transcripción mitocondrial A y B2 (Stewart & Chinnery, 2015).

Para mantener la integridad de su genoma, la mitocondria cuenta con mecanismos antioxidantes propios, donde se incluyen superoxidodismutasas, glutatión peroxidasa, tioredoxina y peroxiredoxina. Sin embargo, el estrés celular puede ser el resultado de perturbar el equilibrio entre los sistemas antioxidantes y la producción de ROS, generando modificaciones en las bases por oxidación, alquilación, formación de

aductos y desaminación. Para combatir este daño al DNA, la mitocondria posee vías de reparación similares al núcleo, donde se encuentran envueltas proteínas codificadas por genes nucleares que son transportadas a la mitocondria. La vía de reparación por escisión de base (BER) se considera como la mejor vía de eliminación de daño oxidativo inducido por ROS en la mitocondria (Saki & Prakash, 2017).

Hay que considerar que el rango de mutación del mtDNA es de 19 a 22 veces mayor que el del DNA nuclear debido a la ausencia de histonas y a su capacidad limitada de reparación. Por esta razón, existen mutaciones patógenas en el mtDNA que provocan una actividad defectuosa de la OXPHOS y la disrupción en el metabolismo energético celular, lo que puede generar un incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), estrés oxidativo y muerte celular, lo que resulta en enfermedades que son heredadas de manera matrilineal (Bonawitz *et al.*, 2006; Cheng *et al.*, 2014).

Las mutaciones pueden afectar a todas las moléculas de mtDNA (llamado homoplasma) o a una proporción de ellas (llamado heteroplasma) ya que las copias de mtDNA por mitocondria y el número de mitocondrias por célula varían según el tipo celular; cada mitocondria contiene de 2 a 10 copias y cada célula puede contener cientos o miles de mitocondrias. Por ello, el nivel de heteroplasma puede variar entre células en el mismo tejido y órgano, entre órgano y órgano de la misma persona y entre individuos de la misma familia. Sin embargo, si la mutación es patogénica, todas las moléculas de mtDNA tendrán la misma mutación y estará en homoplasma, generando un defecto en la cadena respiratoria, estas mutaciones se presentan generalmente en la región codificante del mtDNA (Stewart & Chinnery, 2015).

Como el mtDNA es heredado de manera matrilineal, éste se somete a una mínima recombinación a nivel poblacional y por ello los linajes de mtDNA se consideran como clonales. De esta manera, las mutaciones que adquiere a través del tiempo subdividen a las poblaciones humanas en múltiples haplogrupos (Stewart & Chinnery, 2015).

Haplogrupos mitocondriales

Un haplogrupo humano de mtDNA, es un grupo de haplotipos similares que comparten un ancestro en común y polimorfismos en todos los haplotipos. A su vez, un haplotipo es un conjunto de variaciones en el DNA que se heredan como un bloque y que reflejan mutaciones acumuladas en el linaje materno. Los haplogrupos se encuentran asociados con una variación en la secuencia de una región específica de mtDNA como resultado de la deriva genética y de selección adaptativa para una función mitocondrial favorecida por el ambiente (Fang *et al.*, 2010; Wallace, Brown, & Lott, 1999).

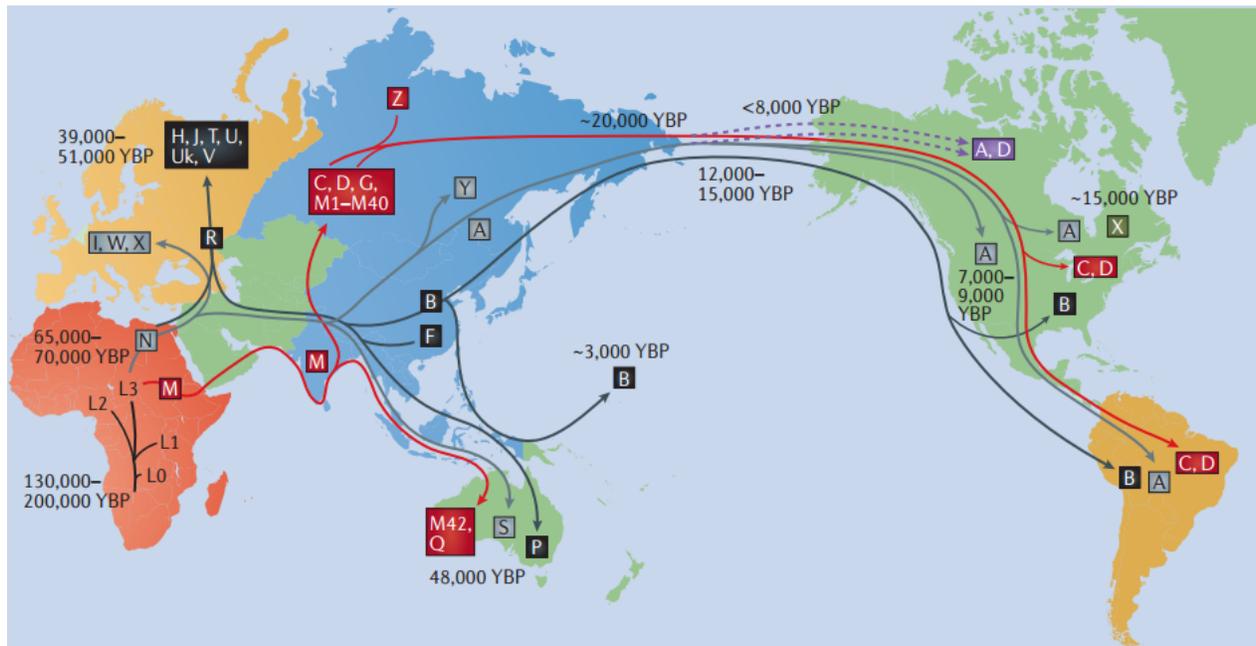


Figura 6 Migración de poblaciones humanas y haplogrupos principales de mtDNA (Stewart & Chinnery, 2015)

Como se muestra en la Figura 6, el haplogrupo principal surgió hace 40,000-150,000 años y ha definido diferentes poblaciones humanas desde que éstas migraron fuera de África y han poblado el mundo. De África surgieron cuatro linajes específicos: L0, L1, L2 y L3 (hace 130,000 y 200,000 años atrás). Posteriormente, los haplogrupos M y N, surgieron del haplogrupo africano L3, hace 65,000-70,000 años para poblar el resto del mundo. Cuando los humanos migraron, el haplogrupo N se dirigió a Eurasia y el haplogrupo M se movió a Asia, dando lugar a los haplogrupos A, B, C, D, G y F. En Europa, el haplogrupo N llevó al haplogrupo R, el cual es la raíz de los haplogrupos europeos H, J, T, U y V, que emergieron hace 39,000-51,000 años. Los haplogrupos S, P y Q se encontraron en Australasia y fueron formados hace aproximadamente 48,000

años, y los haplogrupos A, B, C y D surgieron hace más de 20,000 años, poblando el este de Asia y América (Stewart & Chinnery, 2015).

En 2009, Guardado-Estrada *et al.*, examinaron la diversidad genética y la ancestría matrilineal de diferentes regiones de México. En el estudio predominaron los haplotipos amerindios, con una proporción del 93.3%, seguido de los europeos con 6.0% y africanos con 0.7%. La frecuencia de los haplogrupos amerindios se muestra en la Figura 7 y las variaciones en su frecuencia de acuerdo con la ubicación geográfica de origen se muestran en la Tabla 1.

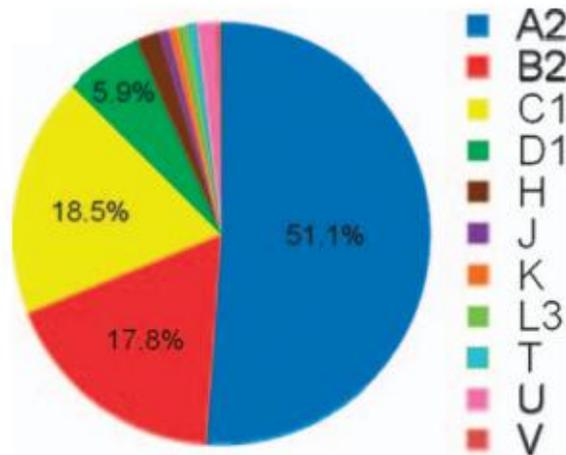


Figura 7 Haplogrupos mitocondriales en población mestizo mexicana (Tomada de Guardado-Estrada *et al.*, 2009)

Tabla 1 Frecuencia de haplogrupos mitocondriales de acuerdo a la región geográfica de nacimiento (Tomada de Guardado-Estrada *et al.*, 2009)

Region	n	Amer % (n)	Eur % (n)	Afr % (n)	Haplogrupos amerindios			
					A2 % (n)	B2 % (n)	C1 % (n)	D1 % (n)
Cd. Mx.	100	91.0 (91)	9.0 (9)	0.0 (0)	52.0 (52)	12.0 (12)	21.0 (21)	6.0 (6)
Centro ^a	115	95.7 (110)	3.5 (4)	0.8 (1)	49.5 (57)	23.5 (27)*	15.6 (18)	7.0 (8)
Costa ^b	47	91.5 (43)	6.4 (3)	2.1 (1)	55.3 (26)	17.0 (8)	14.9 (7)	4.2 (2)
Norte ^c	8	100.0 (8)	0.0 (0)	0.0 (0)	37.5 (3)	12.5 (1)	50.0 (4)	0.0 (0)
Todo	270	93.3 (252)	5.9 (16)	0.7 (2)	51.1 (138)	17.8 (48)	18.5 (50)	5.9 (16)

*P<0.01 Prueba de χ^2 : Centro vs Cd.Mx., Centro vs Sur, Centro vs Norte

^aEstado de México, Hidalgo, Puebla, Tlaxcala, Morelos, Querétaro y Guanajuato

^bOaxaca, Chiapas, Guerrero, Veracruz y Michoacán

^cJalisco, San Luis Potosí, Zacatecas, Durango y Sinaloa

La frecuencia de haplogrupos amerindios fue mayor en la región central que en la Ciudad de México, mientras que para los haplogrupos europeos se observó lo contrario y de igual manera, la principal diferencia en frecuencias es para los haplotipos B2 en la región central (Guardado-Estrada *et al.*, 2009).

Por otra parte, existen estudios de asociación de haplogrupos en los cuales se ha investigado el efecto de las variantes del mtDNA en condiciones complejas como el envejecimiento, enfermedades metabólicas, enfermedades neurodegenerativas, cáncer e infecciones virales ya que se ha sugerido que los haplogrupos individuales tienen distintas respuestas a la exposición ambiental (Fang *et al.*, 2010; Guardado-Estrada *et al.*, 2012).

En algunos de estos estudios se ha descrito que algunos haplogrupos mitocondriales (Hg) pueden actuar como factor de riesgo y/o protección en diversos tipos de cáncer. Haplogrupos como HgK, el HgN en población Hindú (Darvishi, Sharma, Bhat, Rai, & Bamezai, 2006; Gochhait *et al.*, 2008), el HgI en población polaca (Czarnecka *et al.*, 2010) y el HgM en población china incrementan el riesgo de padecer cáncer de mama (Shen *et al.*, 2011), en tanto que el HgU actúa como factor de protección en población euro-americana (Bai *et al.*, 2007).

También se ha observado que determinados haplogrupos mitocondriales incrementan el riesgo de infección con virus como: Virus de la Inmunodeficiencia Humana, Virus de Hepatitis B y Virus del Papiloma Humano; además de incrementar el riesgo de las enfermedades subsecuentes: SIDA, cáncer hepatocelular y cáncer cervicouterino, respectivamente (Guardado-Estrada *et al.*, 2012; Hendrickson *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2010). Esto sugiere que existen interacciones entre las infecciones virales y la mitocondria, por lo que la variación de mtDNA puede tener un papel muy importante en la progresión de la enfermedad viral, ya que la mitocondria es un regulador clave de la apoptosis y un factor importante durante la respuesta inmune en una infección viral (Hendrickson *et al.*, 2008).

Virus y cáncer

Además de los factores de riesgo antes mencionados y los daños provocados a las células por la exposición a agentes químicos y físicos, cerca del 20% de todos los casos de cáncer en humanos a nivel mundial son causados por agentes infecciosos como los virus. Estos agentes pueden actuar en distintos momentos del proceso complejo de carcinogénesis. En etapas tempranas, pueden actuar en eventos mutagénicos asociados con la iniciación del tumor, como en el caso de los retrovirus, la integración viral y la mutagénesis insercional. También pueden actuar en la progresión del tumor a través de la desregulación de procesos celulares mediante las proteínas virales (White, Pagano, & Khalili, 2014).

Aproximadamente el 12% de los casos de cáncer se han relacionado con la presencia de siete virus diferentes: virus de Epstein-Barr, virus de la hepatitis B, virus del papiloma humano, virus linfotrófico de células T humano, virus de la hepatitis C, virus de sarcoma de Kaposi y el poliomavirus de células de Merkel (White *et al.*, 2014). Además, se sabe que el Virus de Tumor Mamario Murino (MMTV, por sus siglas en inglés), contribuye a la generación de tumores mamarios en ratones y en diversos estudios se ha encontrado evidencia de la presencia de secuencias virales en tejido mamario de mujeres con cáncer de mama de distintas partes del mundo (Abbadessa, Bagella, & Giordano, 2007).

MMTV/HMTV

Bittner en 1936, descubrió la presencia de un agente en la leche capaz de causar tumores de mama en ratones, el cual en años posteriores, se identificó como un betaretrovirus, al que nombraron Virus de Tumor de Mama Murino (Bittner, 1936). A partir de este descubrimiento se planteó la posibilidad de que este virus o un homólogo podría causar cáncer de mama en humanos.

En las décadas posteriores se identificaron partículas virales en leche materna humana mediante microscopía electrónica y se detectó a la glicoproteína 52 como antígeno del virus en tumores de mama (Moore, Charney, Kramarsky, Lasfargues, & Sarkar, 1971). Se reportaron reacciones cruzadas positivas de antígenos de MMTV y anticuerpos en suero de pacientes con cáncer de mama (Holder & Wells, 1983; Levint, Hsia, Geller, & Good, 1981).

Posteriormente se realizaron pruebas de biología molecular donde se observó que había secuencias de DNA de MMTV que hibridaban con DNA de tejido canceroso de mama humano, sin embargo, la secuencia era similar a secuencias del genoma humano normal conocidos como Retrovirus Endógenos Humanos (HERVs), por sus siglas en inglés). Se estima que el 8% de nuestro genoma está compuesto por HERVs, correspondientes a infecciones virales ancestrales que se inactivaron durante la evolución, dando lugar a la idea de que son “DNA basura” (Hughes & Coffin, 2004; May & Westley, 1989).

Fue hasta 1995 que se detectó la presencia de una secuencia de 250 pb en el 38% de pacientes con cáncer de mama de una población de EUA, dicha secuencia presentaba una similitud de entre el 95 y 99% con el gen de la envoltura (*env*) de MMTV y una similitud menor al 18% con HERVs y otros genes humanos o virales (Wang *et al.*, 1995).

Posteriormente, se reportó una estructura proviral completa con un tamaño de 9.9 Kb, la cual fue obtenida de dos muestras de tumor de mama que resultaron positivas a la prueba de Wang *et al.*; dicha secuencia presentaba un 95% de similitud con la secuencia reportada para MMTV, mostrada en la Figura 8, y tan sólo 57% de similitud, principalmente en los genes *gag* y *pol*, con los HERVs. A esta secuencia se le dio por primera vez el nombre de Virus del Tumor de Mama Humano (HMTV, por sus siglas en inglés) (Liu *et al.*, 2001).

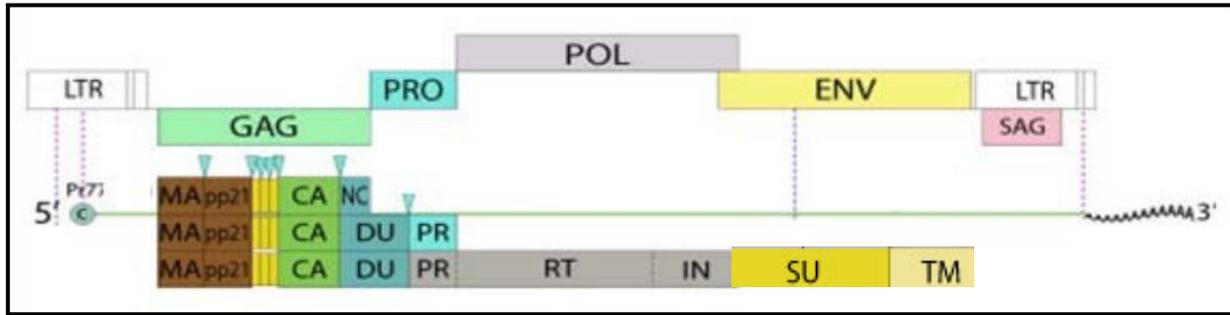


Figura 8 Genoma característico de un β -retrovirus. Se muestran los distintos genes que conforman el genoma viral (Modificado de ViralZoneExpASy, 2017)

Después de obtener la secuencia, se logró observar la producción de partículas virales en cultivos primarios de tejido mamario de pacientes con cáncer. Estas partículas poseían las características morfológicas de los β -retrovirus, los cuales son esféricos, presentan un diámetro de 80 a 100 nm y son envueltos como se muestra en la Figura 9; además, presentaban una actividad de transcriptasa reversa. Adicionalmente, en este trabajo se secuenció el 70% del virión, se identificaron todos sus genes y se demostró que la secuencia presentaba un 85% de similitud con la reportada para MMTV y un 95% de similitud con la reportada para HMTV (Melana et al., 2007).

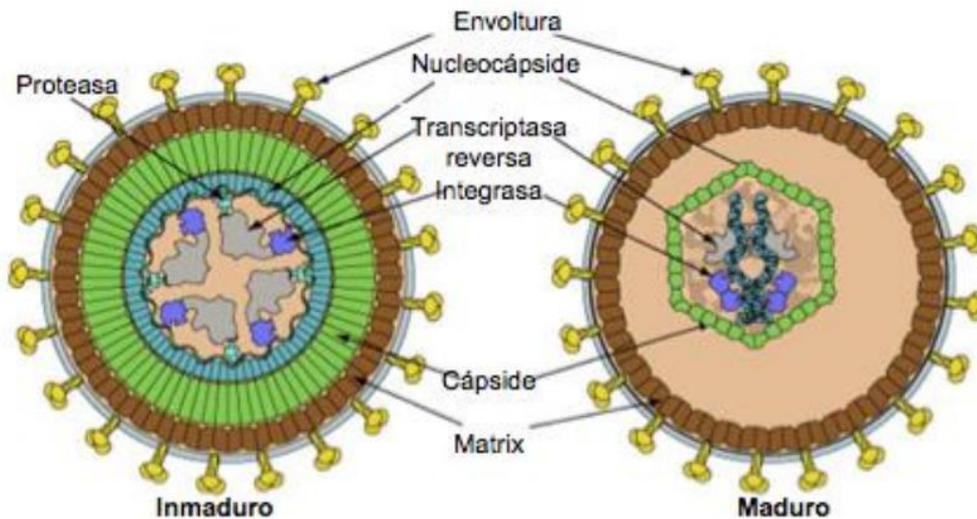


Figura 9 Estructura de un β -retrovirus maduro e inmaduro (Modificado de ViralZoneExpASy, 2017)

La presencia de secuencias homólogas a MMTV ha sido confirmada por diversos grupos de investigadores, algunos de estos grupos han preferido llamar a las

secuencias MMTV-like (Etkind, Du, Khan, Pillitteri, & Wiernik, 2000; Wang *et al.*, 1995), que aparentemente se trata del mismo virus que HMTV; por ello, en el presente trabajo esta secuencia se manejará como MMTV/HMTV.

Se han detectado secuencias del gen *Env* de MMTV/HMTV en muestras de leche de mujeres lactantes. En dicho trabajo, se tomaron a dos grupos de estudio: mujeres con riesgo a desarrollar cáncer de mama, quienes habían sido sometidas a biopsia anteriormente y un grupo de referencia, mujeres que no habían sido sometidas a biopsia, consideradas sin riesgo. Como resultado, se identificó la secuencia en el 7% de 92 mujeres del grupo de referencia y en el 20.5% de 73 mujeres del grupo de biopsia, concluyendo así que la secuencia viral podía encontrarse también en mujeres sanas (Nartey *et al.*, 2014).

Los resultados anteriores fueron confirmados en un estudio realizado recientemente en el que se identificó la presencia de la secuencia del gen *Env* en tejido de mama humano antes del desarrollo del cáncer. La secuencia fue encontrada en 9 de 25 muestras de tejido canceroso de mama (36%); de las 25 pacientes se tenían muestras de biopsias realizadas entre 1 y 11 años antes del desarrollo del cáncer y seis de ellas ya presentaban la secuencia (24%) (Nartey *et al.*, 2017).

Actualmente, gracias al modelo murino y a los trabajos realizados en donde se ha identificado la presencia de secuencias de MMTV/HMTV en pacientes con cáncer de mama, puede sugerirse su participación en el desarrollo de esta neoplasia. Una característica importante del MMTV es su tropismo por la glándula mamaria, ya que aunque el virus puede ser detectado en tejido linfoide, sólo las células de la glándula mamaria son transformadas. Asimismo, en el proceso de transformación participan hormonas glucocorticoides que activan al elemento de respuesta GRE que se localiza en el “Long Tandem Repeat” (LTR) del virus (Pogo & Holland, 1997).

El MMTV es un β -retrovirus que posee una cadena sencilla de RNA y tiene un tamaño de 9 Kb, flanqueado en sus extremos 5' y 3' de LTRs de aproximadamente 1.3 Kb, en

el modelo murino se ha observado que puede afectar la expresión de oncogenes al integrar su material genético al genoma celular de su hospedero, por lo que se le considera un mutágeno insercional (Theodorou et al., 2004).

Mutagénesis insercional

Los HERVs se transmiten de modo vertical (mendeliano) a la descendencia y no poseen la capacidad de producir partículas virales como los retrovirus, los cuales se transmiten de modo horizontal (infectivo) entre los individuos de una población.

A diferencia de los HERVs que son inactivos, el mecanismo de transformación de MMTV es por mutagénesis insercional. La inserción proviral en el genoma de las células epiteliales mamarias puede conducir a la activación transcripcional inapropiada de genes adyacentes u otros eventos mutagénicos que causan transformación oncogénica en células infectadas y en consecuencia, la tumorigénesis se da por la activación de oncogenes o por la inactivación de genes supresores de tumor (Nawijn, Alendar, & Berns, 2011).

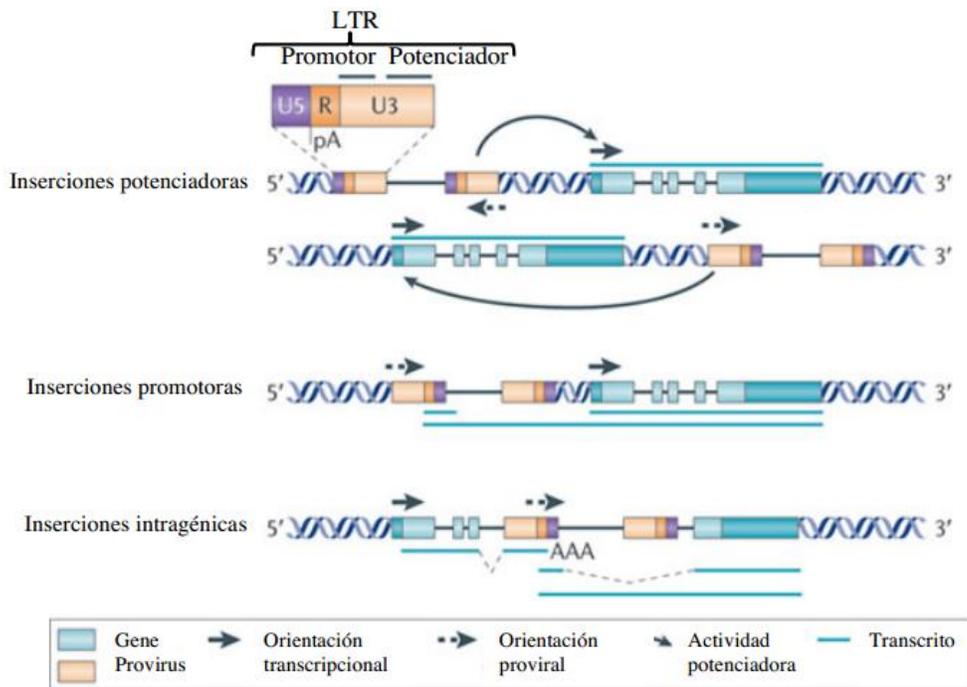


Figura 10 Eventos de mutagénesis insercional. Se muestran los sitios de inserción en los que un retrovirus puede ocasionar daños al hospedero (Modificada de Nawijn et al., 2011)

Las integraciones retrovirales pueden alterar la expresión génica de tres diferentes maneras: mediante su integración en regiones potenciadoras de la transcripción que conduce a un incremento en la tasa de transcripción; integrándose en la región promotora, lo que genera el silenciamiento de la expresión génica por la inactivación del promotor y mediante integración intragénica, produciendo transcritos no funcionales por la interrupción de la secuencia por el fragmento viral (Ranzani, Annunziato, Adams, & Montini, 2013). Dichos mecanismos se muestran en la Figura 10.

Los loci que contienen inserciones provirales con frecuencias superiores a las esperadas por casualidad en células tumorales, se denominan Sitios Comunes de Integración (CIS, por sus siglas en inglés) y es probable que sean genes implicados en el desarrollo tumoral. 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 (Faschinger *et al.*, 2008).

El gen *WNT1* no está implicado en cáncer de mama humano, pero otros miembros de esta familia sí, así como blancos de esta vía, como la β -catenina, E-cadherina o la ciclina D1 que son conocidos por estar mutados o no regulados en distintos tipos de cáncer humanos. La mayoría de los genes de la familia *WNT* no están expresados en glándulas mamarias, pero algunos están expresados en momentos específicos durante el desarrollo embrionario y la diferenciación de la glándula mamaria (*WNT1* y *WNT3*).

Se sabe que, algunos miembros de la familia *FGF* están implicados en cáncer de mama humano, entre ellos *FGF3*, *FGF4* y *FGF8* que se expresan durante las primeras fases del desarrollo embrionario y tienen actividad en la mitosis, como quimioatrayentes y mediadores de la diferenciación celular, además de ser potentes factores angiogénicos (Theodorou *et al.*, 2004).

Estudios de prevalencia de MMTV/HMTV en muestras humanas

Se ha identificado material genético viral a través de la presencia de secuencias del gen *Env*, en diversos estudios de diferentes laboratorios, en tejidos de mujeres

diagnosticadas con cáncer de mama. En estos trabajos se utilizaron los oligos diseñados por Wang en 1995, los cuales poseen una baja similitud con los HERVs. El porcentaje de muestras positivas es variable como se observa en la Figura 11, donde se puede observar que la mayor prevalencia se encontró en Australia con un 78% y otros países indicados en color negro, pero también hubo estudios en donde la prevalencia fue de 0% como el caso de Austria y otros países marcados en gris claro. En la Tabla 2 sólo se muestran los resultados que han sido positivos.

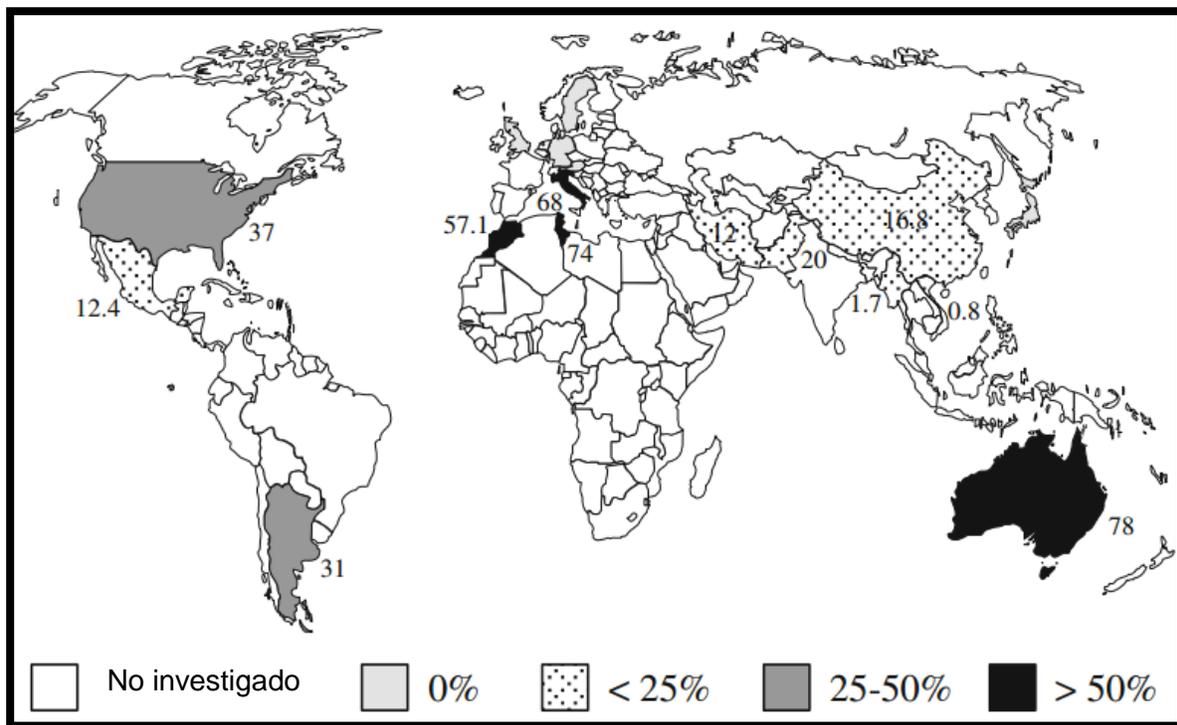


Figura 11 Prevalencia del retrovirus MMTV/HMTV. Se muestran porcentajes de prevalencia en países donde se ha detectado la secuencia del gen *Env* del retrovirus (Tomada de San et al., 2017)

Estos estudios han demostrado que la presencia del gen *Env* del retrovirus MMTV/HMTV en muestras de pacientes con cáncer de mama varía en diferentes poblaciones. Estas diferentes prevalencias podrían estar relacionadas con la distribución geográfica de las poblaciones (Luo, Wu, Zhang, & Qian, 2006). Wang et al., en 2014 realizaron un meta-análisis sobre el riesgo de la infección con MMTV/HMTV y el desarrollo de cáncer de mama humano, observando una mayor prevalencia en el riesgo de desarrollar este tipo de cáncer después de la infección con virus

MMTV/HMTV en pacientes de países occidentales que en países asiáticos (*Wang et al.*, 2014).

Tabla 2 Estudios de la prevalencia de MMTV/HMTV en cáncer de mama en humanos

País	% MMTV/HMTV (+)	Referencia
Argentina	23/74 31%	(Melana <i>et al.</i> , 2002)
Australia	19/45 42.2%	(Ford <i>et al.</i> , 2003)
Australia	44/136 32%	(Ford, <i>et al.</i> , 2004)
Estados Unidos	27/73 37%	(Etkind <i>et al.</i> , 2000)
Estados Unidos	18/29 62%	(Wang <i>et al.</i> , 2003)
Estados Unidos	121/314 38.5%	(Wang <i>et al.</i> , 1995)
Estados Unidos	6/12 50%	(Fukuoka <i>et al.</i> , 2008)
Italia	32/106 30.1%	(Melana <i>et al.</i> , 2001)
México	57/458 12.4%	(Cedro-Tanda <i>et al.</i> , 2014)
Túnez	28/38 73.7%	(Levine <i>et al.</i> , 2004)
China	22/131 16.8%	(Luo <i>et al.</i> , 2006)

En 2014 Cedro-Tanda *et al.* encontraron que 12.4% de 458 muestras de pacientes mexicanas con cáncer de mama presentaban el MMTV/HMTV, con una prevalencia mayor en mujeres de entre 46 y 55 años. Así mismo, determinaron la presencia del virus en tejido mamario sano y observaron una prevalencia de 15.7%, la cual es mayor en mujeres de 56 a 65 años de edad, algo no observado en estudios previos. También reportaron que en un 8.3% de las pacientes, el virus estuvo presente en ambos tipos de tejido (Cedro-Tanda *et al.*, 2014).

La variación del virus de acuerdo a la distribución geográfica podría estar relacionada con variantes polimórficas en el mtDNA, ya que se sabe que algunos de estos polimorfismos tienen consecuencias funcionales. Diversos estudios han demostrado que las mitocondrias se encuentran relacionadas en una gran variedad de procesos metabólicos y su función se encuentra regulada por estímulos extrínsecos e intrínsecos, incluyendo a los virus. A través de los años se ha demostrado que la

mitocondria tiene un papel central en los mecanismos de defensa contra infecciones virales y que un gran número de proteínas mitocondriales interactúan con proteínas virales y dicha interacción genera un efecto en la regulación de respuestas celulares (Ohta & Nishiyama, 2011).

JUSTIFICACIÓN

En México, el cáncer de mama ocupa el primer lugar en incidencia de neoplasias malignas en mujeres y representa un grave problema de salud pública. Se ha demostrado que el DNA mitocondrial juega un papel importante, ya que distintas variantes en el genoma mitocondrial confieren riesgo y se relacionan con el origen étnico de la población; actualmente se conocen más de 1900 alteraciones en el mtDNA, de las cuales 297 mutaciones o polimorfismos (haplotipos) se han asociado a cáncer de mama, siendo las más frecuentes en la región D-loop. Se conocen haplogrupos mitocondriales que pueden actuar como factor de riesgo y/o protección en cáncer, se desconoce si algunos haplogrupos podrían actuar como factor de riesgo y/o protección en cáncer de mama para la población mexicana. Ya que algunos haplogrupos mitocondriales pueden favorecer el desarrollo de las neoplasias, como un efecto en el riesgo conferido por la presencia de infecciones virales; en el caso del cáncer de mama se desconoce si alguno de los haplogrupos/haplotipos mitocondriales puede incrementar el riesgo de que el retrovirus MMTV/HMTV esté presente y contribuya con el desarrollo de la neoplasia. Por lo tanto, es importante investigar si los haplogrupos mitocondriales de la población mexicana confieren riesgo o protección contra el cáncer de mama y si las variantes en el mtDNA se asocian con la presencia del retrovirus MMTV/HMTV el cual podría contribuir con el progreso del tumor mamario, este conocimiento podría ayudar para la prevención y el diagnóstico temprano del cáncer de mama

OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar los haplogrupos mitocondriales de mujeres mexicanas diagnosticadas con cáncer de mama y evaluar su asociación con el desarrollo del cáncer, así como identificar la presencia de MMTV/HMTV.

Objetivos particulares

- Identificar la presencia de MMTV/HMTV en muestras de pacientes mexicanas diagnosticadas con cáncer de mama
- Determinar haplogrupos/haplotipos de mtDNA en muestras de pacientes mexicanas diagnosticadas con cáncer de mama
- Evaluar la asociación de haplogrupos y haplotipos mitocondriales con el desarrollo del cáncer en muestras de pacientes mexicanas diagnosticadas con cáncer de mama y su posible relación con la presencia de MMTV/HMTV.

HIPÓTESIS

Si las variantes en el mtDNA influyen en el riesgo o protección contra el cáncer, así como en la progresión de infecciones virales, entonces los haplogrupos o haplotipos podrían proteger o favorecer el desarrollo de cáncer de mama y estar asociados con la presencia e infección del retrovirus MMTV/HMTV.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diagrama de flujo experimental

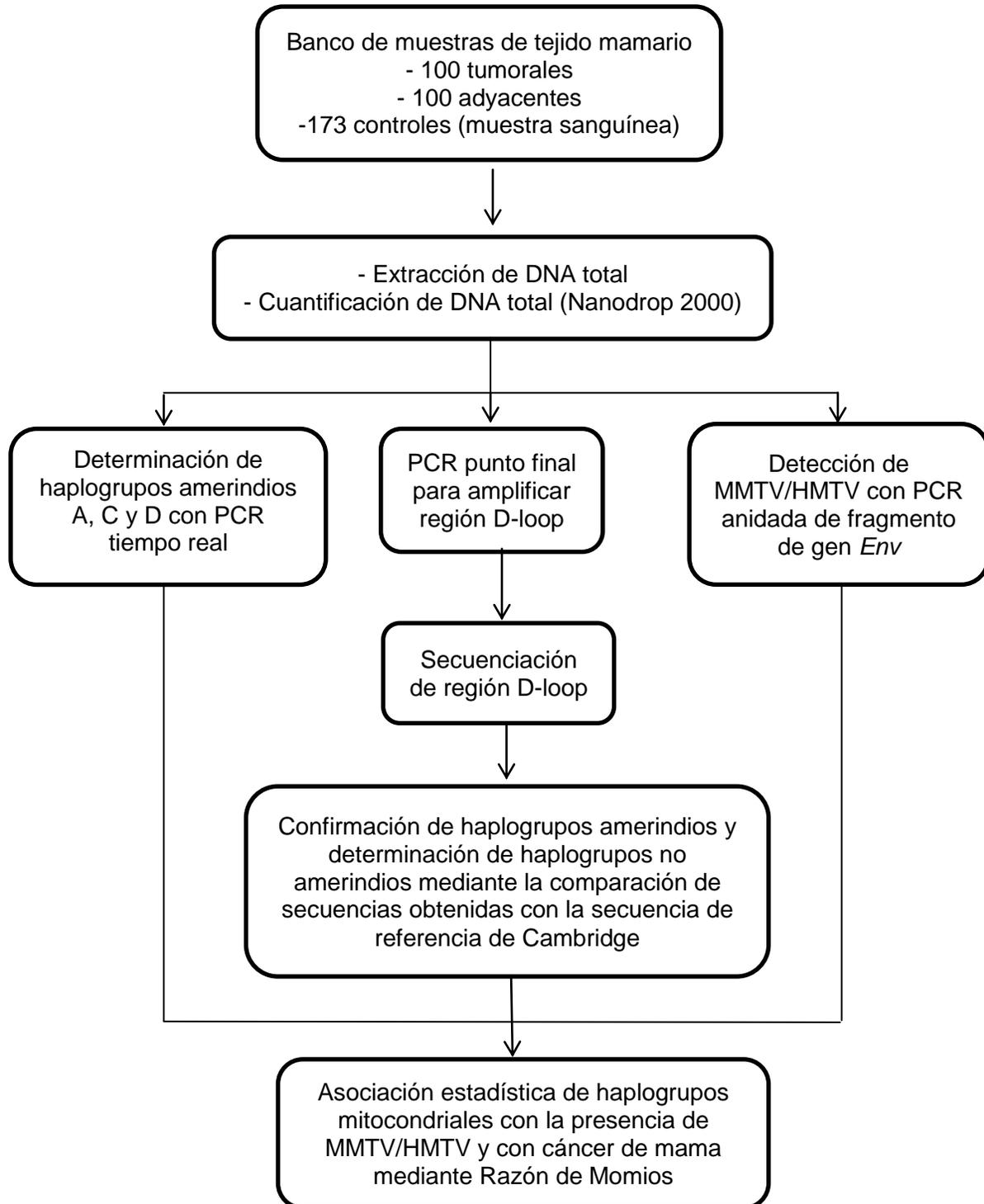


Figura 12 Diagrama de flujo experimental

Material Biológico

Se obtuvieron muestras de tejido mamario tumoral con su respectivo tejido adyacente no afectado de 100 pacientes que acudían al Hospital de Ginecología y Obstetricia No. 3, Centro Médico Nacional La Raza, IMSS. Además, se trabajó con 173 muestras sanguíneas controles previamente obtenidas en el grupo de trabajo.

Criterios de selección para muestras de tejido adyacente y tumoral de pacientes mexicanas diagnosticadas con cáncer de mama

- Inclusión
 - Mujeres mayores de 30 años de edad con diagnóstico de cáncer de mama
 - Mujeres mexicanas con al menos tres generaciones en México y sin antecedentes de cáncer de mama hereditario
 - Presencia de tejido o ácidos nucleicos suficiente para el análisis
 - Evaluación histológica por dos patólogos que demuestren que las muestras contienen al menos 70% de células tumorales.
- Eliminación
 - Cantidad de tejido insuficiente para extraer DNA para las pruebas.

Criterios de selección para muestras sanguíneas de mujeres sin antecedentes de cáncer de mama

- Inclusión
 - Mujeres mexicanas con al menos tres generaciones en México
 - Cantidad de sangre suficiente para obtener DNA para las pruebas a realizar
- Eliminación

Cantidad de sangre insuficiente para extraer DNA para las pruebas.

Variables de estudio

Tipo histológico

Estadio del cáncer

Índice de Masa Corporal

Consumo de tabaco y/o alcohol

Haplogrupos/haplotipo

Presencia del retrovirus MMTV/HMTV

Cálculo del tamaño de la muestra

Se realizó el cálculo del tamaño de la muestra utilizando el programa Epidat 4.0, tomando en cuenta la referencia de Guardado-Estrada *et al.*, donde se examinó la diversidad genética y la ancestría matrilineal de diferentes regiones de México. En el estudio predominaron los haplotipos amerindios, con una proporción del 93.3%, con variaciones en su frecuencia de acuerdo con la ubicación geográfica de origen (Guardado-Estrada *et al.*, 2009). El cálculo se hizo tomando en cuenta los diferentes porcentajes de cada uno de los haplogrupos amerindios, los cuales son los más frecuentes en la población mexicana, con un poder estadístico de entre 80 y 99%, donde se obtuvo lo siguiente:

Tabla 3 Cálculo del tamaño de la muestra para el porcentaje del haplogrupo A de 51%

Potencia (%)	Tamaño de la muestra		
	Casos	Controles	Total
80.0	138	138	276
85.0	157	157	314
90.0	184	184	368
95.0	227	227	454

Tabla 4 . Cálculo del tamaño de la muestra para el porcentaje del haplogrupo B de 17.8%

Potencia (%)	Tamaño de la muestra		
	Casos	Controles	Total
80.0	185	185	370
85.0	211	211	422
90.0	247	247	494
95.0	305	305	610

Tabla 5 Cálculo del tamaño de la muestra para el porcentaje del haplogrupo C de 18.5%

Potencia (%)	Tamaño de la muestra		
	Casos	Controles	Total
80.0	180	180	360
85.0	206	206	412
90.0	241	241	482
95.0	297	297	594

Tabla 6 Cálculo del tamaño de la muestra para el porcentaje del haplogrupo D de 6%

Potencia (%)	Tamaño de la muestra		
	Casos	Controles	Total
80.0	438	438	876
85.0	501	501	1,002
90.0	586	586	1,172
95.0	724	724	1,448

Con este cálculo la n sería de 438 casos y 438 controles tomando en cuenta el porcentaje del haplogrupo menos frecuente en la población y un poder estadístico del 80%, para el presente trabajo decidimos realizar un estudio piloto como una herramienta científica estándar para una investigación inicial, lo que nos permitirá llevar a cabo un análisis preliminar antes de iniciar un estudio a gran escala, con un total de

100 casos (tumor y tejido adyacente). Los datos de las 173 muestras sanguíneas controles se habían obtenido previamente en el grupo de trabajo del laboratorio.

Extracción de DNA de tejido tumoral y adyacente

La extracción de DNA total de las muestras de tejido tumoral y adyacente se realizó empleando el paquete Puregene Blood Core de la marca Qiagen. Se utilizaron 40 mg de tejido para la extracción y se realizaron algunas modificaciones al protocolo específico para purificación de DNA de tejido recomendado por el proveedor.

Se colocó el tejido en un tubo tipo Eppendorf de 1.5 ml y se agregaron 500 µl de la Solución de Lisis Celular y 15 µl de Proteinasa K. Se dejó incubando toda la noche a 56°C con agitación constante para lisar el tejido.

Se agregaron 200 µl de la Solución de Precipitación de Proteínas y se agitó durante 20 segundos en el vórtex. Se centrifugó a 16,000 g durante 4 minutos a 4°C y se separó el sobrenadante, pasándolo a otro tubo; el pellet se desechó. Se agregaron 700 µl de isopropanol, se mezcló por inversión 50 veces y se centrifugó a 16,000 g por 2 min a 4°C.

Se descartó cuidadosamente el sobrenadante por decantación y se secó el tubo de manera invertida sobre un papel absorbente limpio, teniendo cuidado de que el pellet permaneciera en el tubo. Posteriormente se agregaron 300 µl de etanol al 70% y se mezcló por inversión varias veces para lavar el pellet de DNA. Se centrifugó a 16,000 g por dos minutos, se descartó cuidadosamente el sobrenadante, el tubo se secó de manera invertida sobre un papel absorbente limpio, se dejó que se secase la pastilla entre 5 y 10 min.

Se agregaron 100 µl de la Solución de Hidratación del DNA y se almacenó a -20 °C.

Cuantificación de DNA total

La determinación de la concentración y pureza del DNA extraído se llevó a cabo en el equipo de espectrofotometría Nanodrop 2000 (Thermo Scientific). Una vez conectado el Nanodrop al equipo de cómputo, se inició el software para cuantificación de ácidos nucleicos. Se levantó el brazo del espectrofotómetro y se colocaron 2 µl de agua libre de nucleasas y RNAsas para su lavado, se pulsó “enter” para iniciar el equipo. Se limpió con papel absorbente y se colocaron 2 µl de Solución de Hidratación de DNA como blanco y se seleccionó en el software “Blank”. Se limpió nuevamente con papel absorbente y se colocaron 2 µl de la muestra problema, se dio clic en “Measure” y se registró la lectura de la muestra.

Detección del retrovirus MMTV/HMTV

Se determinó la presencia del retrovirus MMTV/HMTV en biopsias de tejido tumoral y tejido mamario adyacente a través de los métodos descritos por Wang *et al.* en 1995, lo que consiste en la amplificación de un fragmento del gen Env (entre las posiciones 7152 a 7810) mediante una PCR anidada. Se amplificó un primer fragmento de 660 pb que es utilizado como DNA molde para una segunda reacción con iniciadores que flanquean una región de 260 pb dentro del primer fragmento como se observa en la Figura 13.

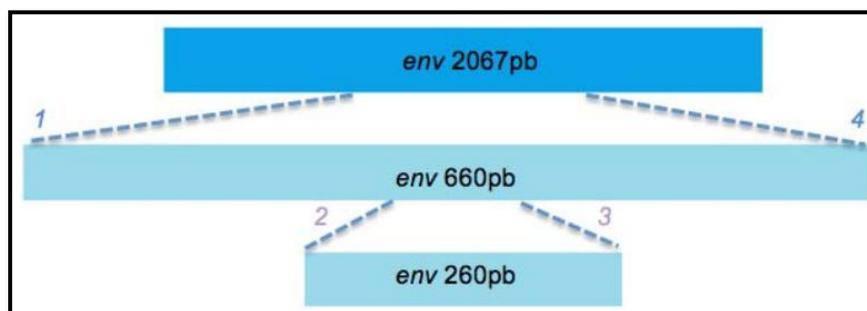


Figura 13 PCR anidada del gen Env del MMTV. Fragmentos que se obtienen de la PCR anidada (Tomada de Pina-Jiménez, 2017)

Para cada reacción se añadieron 100 ng de DNA extraído de las muestras de tejido tumoral y adyacente. Se utilizó como control positivo al vector pBR322 (Cat 45006, ATCC), que contiene al gen *Env* de MMTV obtenido de la cepa C3H (GenBank AF228552), transformado en *E. coli* XL1 Blue con una concentración de 3 ng/μl. Como control negativo se utilizó agua libre de nucleasas. En la Tabla 7 se muestra el volumen necesario de cada reactivo para un volumen final de 20 μl.

La primera reacción de PCR amplifica una región de 660 pb, la cual es flanqueada por los iniciadores Env 1 (5'-CCTCACTGCCAGATC-3) y Env 4 (5'-GAATCGCTTGGCTCG-3'). Las condiciones en el termociclador fueron: 1 ciclo a 95 °C durante 5 minutos; 35 ciclos a 95 °C durante 1 minuto, 51.6°C durante 1 minuto, 68°C durante 1 minuto y una extensión final a 68°C durante 5 minutos.

Tabla 7 Concentración y volumen necesario de cada reactivo para la PCR anidada del gen *Env* de MMTV

Reactivo	[Inicial]	[Final]	Volumen
Buffer	10X	1X	2.0 μl
dNTPs	10 mM	200 μM	0.4μl
Oligos	20 pM/μl	10 pM	0.5 μl
Taq Polimerasa	5 U/μl	1 U	0.2 μl
DNA molde		100 ng	3-5 μl
H2O	La necesaria para completar 20 μl		

Posteriormente se tomaron 3 μl de la primera amplificación como molde para realizar una segunda reacción con los iniciadores Env 2 (5'-CCTACATCTGCCTGTGTTAC-3') y Env 3 (5'-ATCTGTGGCATACTAAAGG-3'). Las condiciones del termociclador fueron: 95°C durante 5 min; 35 ciclos a 95°C durante 1 minuto, 49.8°C durante 1 min, 68°C durante 1 minuto y una extensión final de 68°C durante 5 minutos. La concentración y volumen necesario para la reacción fueron las mismas que para la primera reacción y

como lo indica la Tabla 7. Todos los procedimientos fueron llevados a cabo en una campaña exclusiva para reacciones de PCR con DNA humano.

Los productos fueron analizados mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2%.

Determinación de haplogrupos mitocondriales amerindios mediante PCR en tiempo real

La determinación de los haplogrupos A, C y D, se llevó a cabo mediante PCR en tiempo real, utilizando sondas taqman (Applied Biosystems) específicas para cada uno de los haplogrupos y el equipo StepOne Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Para el haplogrupo A se identificó el cambio de A por G en la posición 663 (A663G) utilizando las secuencias Reportero 1 (Vic) 5'-TGTTAGTCATGTTAG**G**CTTGTT-3' y Reportero 2 (Fam) 5'-TGTTAGTCATGTTAT**C**TTGTT-3; para el haplogrupo C, fue el cambio de A por G en la posición 13263 (A13263G) utilizando las secuencias Reportero 1 (Vic) 5'-CACTTCAAGTCA**A**CTAGGAC-3' y Reportero 2 (Fam) 5'-ACTTCAAGTCA**G**CTAGGAC-3'; para el haplogrupo D, el cambio de T por G en posición 5178 (T5178G) utilizando las secuencias Reportero 1 (Vic) 5'-TGTTAGTCATGTTA**G**CTTGTT-3' y Reportero 2 (Fam) 5'-TGTTAGTCATGTTAT**C**TTGTT-3. Los haplogrupos no amerindios fueron determinados amplificando y secuenciando la región D-loop del mtDNA.

Amplificación de la región D-loop mediante PCR punto final

Se amplificó una región de 988 pb de la región control del mtDNA utilizando los iniciadores L15989 (5'-CCCAAAGCTAAGATTCTAAT-3') y H408 (5'-CTGTTAAAAGTGCATACCGCCA-3') ya descritos anteriormente (Vigilant, Pennington, Harpending, Kocher, & Wilson, 1989). En la Tabla 8 se muestra el volumen necesario de cada reactivo para un volumen final de 30 µl, la reacción se coloca en un tubo de 0.2 ml. Las condiciones en el termociclador fueron: 1 ciclo a 95 °C durante 3 minutos; 35

ciclos a 95 °C durante 50 segundos, 59°C durante 50 segundos, 68°C durante 1 minuto y una extensión final a 68°C durante 3 minutos.

Tabla 8 Concentración y volumen necesario de cada reactivo para la PCR punto final de la región D-loop

Reactivo	[Inicial]	[Final]	Volumen
Buffer	10X	1X	3.0 µl
dNTPs	10 mM	200 µM	0.5 µl
Oligos	20 pM/µl	10 pM	0.5 µl
Taq Polimerasa	5 U/µl	1 U	0.3 µl
DNA molde		50-80 ng	3-5 µl
H2O	La necesaria para completar 30 µl		

Electroforesis del producto de PCR punto final

Para separar e identificar las moléculas de DNA amplificadas en la PCR punto final, se preparó un gel de agarosa al 1.5%. Para preparar el gel de agarosa se colocaron 0.5 g de agarosa en un matraz Erlenmeyer y se agregaron 50 ml de TAE 1X; esta mezcla se colocó en un horno de microondas a potencia baja hasta que la agarosa se disolvió, se le agregó una gota de bromuro de etidio (BrEt 0.5 µg/µl) y se mezcló.

Se preparó el soporte del gel colocando los peines y se vertió la mezcla evitando la formación de burbujas. El gel se dejó solidificar en una zona nivelada libre de corrientes de aire. Posteriormente, los peines se retiraron y el gel se colocó en la cámara de electroforesis, orientando los pozos hacia el cátodo de la cámara y se agregó buffer TAE 1X hasta sumergir completamente el gel.

En un trozo de parafilm se colocó 1 µl de colorante (amortiguador de carga azul/naranja) por cada muestra a cargar. Con una micropipeta se tomaron 5 µl de muestra a cargar y se mezcló con el colorante. Se depositó cada muestra en el pozo correspondiente y de igual manera se colocó el marcador de peso molecular.

La cámara de electroforesis se cerró y se conectó a la fuente de poder a 90 Volts y se dejó separar durante 30-40 minutos aproximadamente, hasta que el colorante se observó cerca del extremo contrario al de la carga de las muestras. Finalmente, se capturó la imagen del DNA en el gel en el fotodocumentador.

Purificación del producto de PCR punto final

Para limpiar los productos de PCR punto final, se agregaron 2 µl del reactivo SAP-Exo Kit por cada 5 µl de reacción. El kit contiene dos enzimas hidrolíticas, fosfatasa y exonucleasa, que asegura la desfosforilación completa de los dNTPs y la degradación de los oligos residuales, permitiendo la utilización del producto en secuenciación, genotipificación, clonación o análisis de SNPs. La mezcla se incubó a 37°C por 10 minutos para activar a las enzimas y posteriormente a 80°C por 10 minutos para inactivarlas. Así el producto de PCR quedó listo para utilizarse en la reacción de secuenciación.

Reacción de Secuenciación

Se realizó la reacción de secuenciación del fragmento de 988 pb amplificado en la PCR punto final para analizar los polimorfismos y determinar los haplogrupos mitocondriales, para esto, se preparó una mezcla de reacción de 10 µl de acuerdo a la Tabla 9.

Los iniciadores que se utilizaron fueron el L15989 (5'-CCCAAAGCTAAGATTCTAAT-3') para cubrir la HVR1 y el L29 (5'-GGTCTATCACCCCTATTAACCAC-3') para cubrir la HVR2. Las condiciones en el termociclador fueron: 1 ciclo a 96 °C durante 4 minutos y 25 ciclos a 95 °C durante 10 segundos, 50°C durante 4 segundos, 60°C durante 4 minutos.

Tabla 9 Concentración y volumen necesario de cada reactivo para la reacción de secuenciación de la región D-loop

Reactivo	[Final]	Volumen
Buffer	1X	2.0 μ l
Betaina	1 M	2.0 μ l
BigDye		0.3 μ l
Oligo	10 pM	0.5 μ l
Producto de PCR	20-40 ng	5.2 μ l

Purificación de la reacción de secuenciación

Las reacciones fueron purificadas en un tubo de 1.5 ml en el cual se colocaron los 10 μ l de reacción, se agregaron 60 μ l de etanol absoluto, 10 μ l de agua libre de nucleasas y se mezcló. Se dejó reposar en hielo por 20 minutos y posteriormente se centrifugó a 12,000 rpm durante 20 minutos. El sobrenadante se decantó con cuidado y se agregaron 250 μ l de etanol al 70%. Se centrifugó nuevamente a 12,000 rpm durante 10 minutos y se extrajo el sobrenadante con cuidado con una micropipeta para finalmente dejarlo secar en un termoblock a 65°C.

Las reacciones purificadas fueron llevadas a la Unidad de Ácidos Nucleicos del Departamento de Genética y Biología Molecular del Cinvestav Zacatenco, donde fueron procesados en un sistema de análisis de DNA por electroforesis para obtener los electroferogramas de las muestras problema.

Determinación de haplogrupos

Se analizaron las secuencias obtenidas de los electroferogramas y se determinaron los cambios de base de las mismas con respecto a la secuencia de referencia de Cambridge utilizando el software Sequencher 5.3. La determinación de los haplogrupos

Análisis estadístico de la asociación de haplogrupos mitocondriales con el desarrollo de cáncer de mama

El riesgo fue estimado mediante razón de momios (OR, por sus siglas en inglés). La prueba de OR es una manera de comprobar si la probabilidad de que ocurra un evento (la enfermedad) es la misma para los grupos en comparación (casos y controles) (Lewis, 2002) y se obtiene con la siguiente fórmula:

$$OR = \frac{\text{Odds de exposición de los casos}}{\text{Odds de exposición en los controles}} = \frac{\frac{a}{b}}{\frac{c}{d}} = \frac{a * d}{b * c}$$

Dónde:

a = sujetos que desarrollaron el evento y estaban expuestos

b = sujetos que desarrollaron el evento y que no estaban expuestos

c = sujetos que no desarrollaron el evento y estaban expuestos

d = sujetos que no desarrollaron el evento y que no estaban expuestos

El valor del OR oscila entre 0 y el infinito. Si el OR es igual a 1, significa que el polimorfismo es neutro, es decir, el riesgo a desarrollar la enfermedad es el mismo para ambas poblaciones. Si el OR es mayor a 1, significa que existe una asociación de riesgo entre la variable evaluada y la enfermedad, pero si el valor es menor a 1, indica que hay una asociación de protección entre la variable y la enfermedad.

Para obtener la precisión de la asociación se calcularon los intervalos de confianza con un nivel de confianza de 95%; esto significa que si el estudio se repitiera n veces, bajo las mismas suposiciones estadísticas en 95% de los casos el estimador puntual de la OR estará contenido dentro de los límites estimados.

Se debe tener en cuenta que para que la asociación sea significativa, en el caso de una asociación de protección, el límite superior debe ser menor a 1 y en el caso de una asociación de riesgo, el límite inferior tiene que ser mayor a 1. Un intervalo de

confianza que incluye el valor 1 significa que la asociación entre la exposición y el resultado pudo haber sido encontrado sólo por casualidad y que la asociación no es estadísticamente significativa (Lazcano-ponce & Salazar-martínez, 2001)

RESULTADOS

Características de las pacientes con cáncer de mama

Se analizaron un total 100 muestras de tejido tumoral de mama y 100 muestras de tejido adyacente de tumor de pacientes mexicanas con cáncer de mama y 173 muestras sanguíneas de mujeres sin cáncer de mama

En la Tabla 11 se muestran los datos de las variables antropométricas: edad, en promedio de 55.5 años; peso, en promedio 69.5 kg; estatura, en promedio 1.53 m; índice de masa corporal (IMC), estratificada en normal, sobrepeso y obesidad leve, media y mórbida; se muestran hábitos que son considerados factores de riesgo para el desarrollo de cáncer de mama: tabaquismo, en su mayoría no fumadoras; alcoholismo, en su mayoría bebedoras; edad de menarca, en promedio a la edad de 12 años; edad de menopausia, en promedio a la edad de 40 años y por último, características histológicas, siendo más común el tumor ductal infiltrante y de condición de los receptores hormonales en las muestras, siendo más común RE+ RP+ Her2-.

Tabla 11 Características de las pacientes con cáncer de mama

Parámetro		Valor
Edad (años)		55.54±15.70
Peso (kg)		69.49±12
Estatura (metros)		1.53±0.05
IMC	Normal (N/media)	18/23.95±2.20
	Sobrepeso (N/media)	45/27.52±1.38
	Obesidad leve (N/media)	30/32.32±1.57
	Obesidad media (N/media)	5/35.87±0.25
	Obesidad mórbida (N/media)	2/49.07±5.13

Fumador	Sí	18
	No	82
Bebedor	Sí	87
	No	13
Menarca (años)		12.55±1.39
Menopausia		40.27±19.55
Histología	Ductal infiltrante	56
	Ductal infiltrante grado II	8
	Ductal infiltrante grado III	16
	Lobulillar infiltrante	17
	Lobulillar infiltrante grado III	1
	Ductal y lobulillar 50% c/u	1
	Inflamatorio infiltrante	1
Receptores	Her2+	2
	RE+ RP+ Her3+	1
	RE- RP- Her3+	1
	RE+ RP- Her3+	2
	RE+ RP+ Her2-	39
	RE+ RP+ Her2+	1
	RE+ RP- Her2-	4
	Triple Negativo	7

IMC= Índice de masa corporal; RE= Receptor de estrógenos; RP= Receptor de progesterona; Her2/3= receptor 2/3 del factor de crecimiento epidérmico humano.

Obtención del DNA de las muestras de tejido tumoral y adyacente

Se extrajo el DNA total a partir de aproximadamente 40 mg de tejido tanto tumoral como adyacente de 100 mujeres mexicanas diagnosticadas con cáncer de mama. La cantidad de DNA extraída fue cuantificada y la pureza del DNA fue medida con el índice A260:A280 (~1.80). La concentración de DNA obtenido de las muestras presentó un rango de entre 15 y 300 ng/μl y el rango de la pureza de dicho DNA fue de 1.6 a 1.98.

Identificación del fragmento del gen *Env* de MMTV/HMTV en muestras de tejido tumoral y adyacente

La reacción de PCR anidada para la identificación de un fragmento del gen de la envoltura (*Env*) del retrovirus MMTV/HMTV se analizó en un gel de agarosa al 2%. En la Figura 14 se observa el resultado de la primera amplificación con los iniciadores 1 y 4 que dan como resultado un fragmento de 660 pb como se observa sólo en el carril del control positivo (C+).

Al primer amplicón se le realizó una segunda reacción de amplificación con los iniciadores 2 y 3, los cuales se encontraban dentro de la primera región amplificada. En esa segunda amplificación se obtuvo un fragmento de 250 pb, de igual manera sólo en el carril del control positivo como se observa en la Figura 15.

De las muestras 65 a 69 tanto de tejido tumoral (T) como adyacente (A) no se observó ninguna banda que indique que las muestras son positivas para la presencia del retrovirus. Este resultado fue obtenido en las 100 muestras tanto de tejido tumoral como adyacente, siendo todas negativas a la presencia del retrovirus MMTV/HMTV.

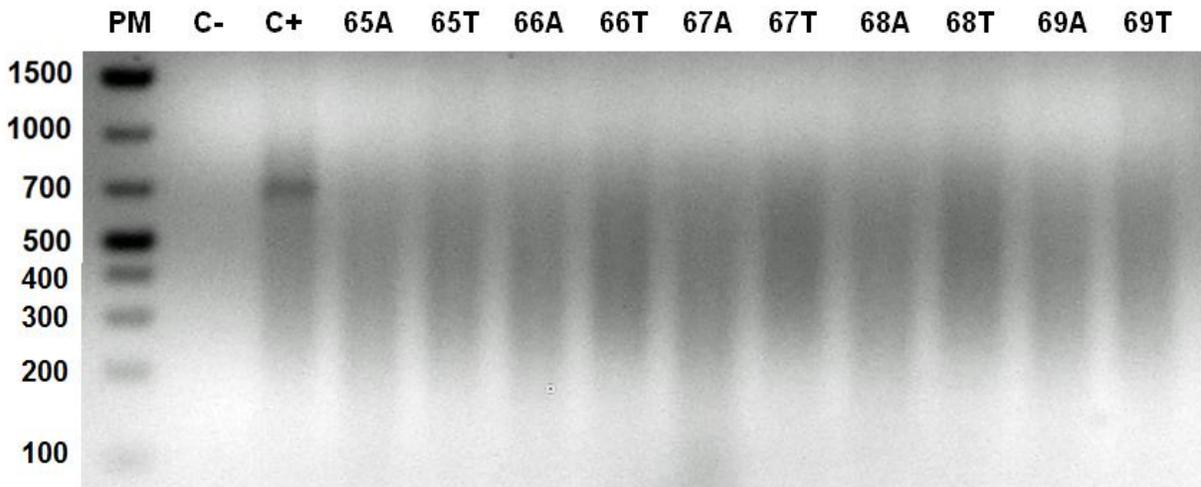


Figura 14 Resultado de la primera amplificación de PCR anidada. Los productos de la reacción con los iniciadores 1 y 4 se analizaron en un gel de agarosa al 2%. Se observa el producto de 660 pb. PM= Marcador de Peso Molecular. C-= Control Negativo (Agua libre de nucleasas). C+= Control Positivo (pBR322 con fragmento del gen *Env* de cepa CH3). A= Tejido Adyacente. T= Tejido Tumoral

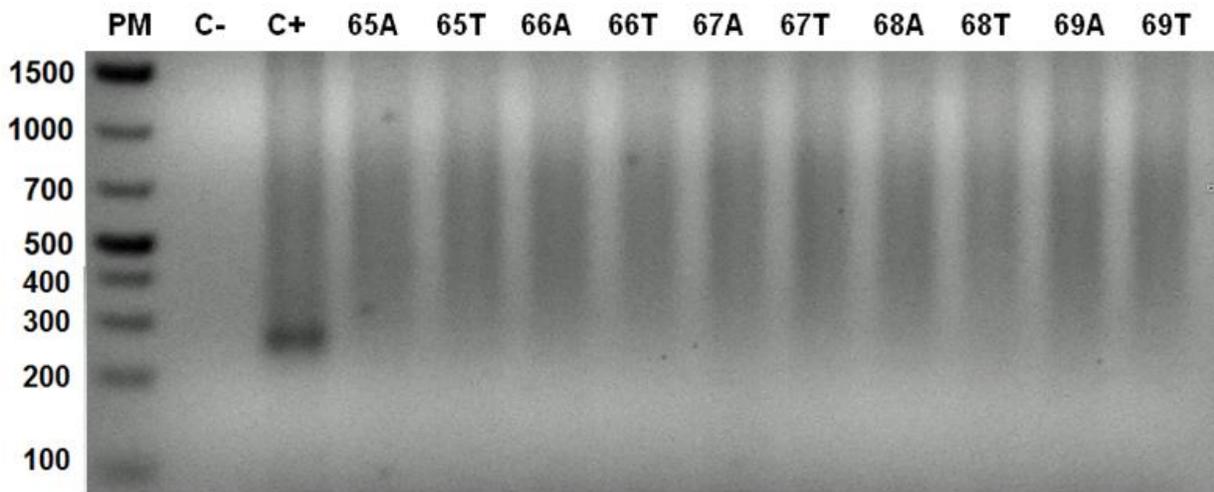


Figura 15 Resultado de la segunda amplificación de PCR anidada. Los productos de la reacción con los iniciadores 2 y 3 se analizaron en un gel de agarosa al 2%. Se observa el producto de 250 pb. PM= Marcador de Peso Molecular. C-= Control Negativo (Agua libre de nucleasas). C+ = Control Positivo (pBR322 con fragmento del gen *Env* de cepa CH3). A= Tejido Adyacente. T= Tejido Tumoral

Determinación de haplogrupos mitocondriales amerindios mediante PCR en tiempo real

Para el haplogrupo A se identificó el cambio de A por G en la posición 663 (A663G), el resultado de la PCR en tiempo real se muestra en la Figura 16, donde se observa en color azul a las 36 muestras que presentan el cambio de base correspondiente a este haplogrupo.

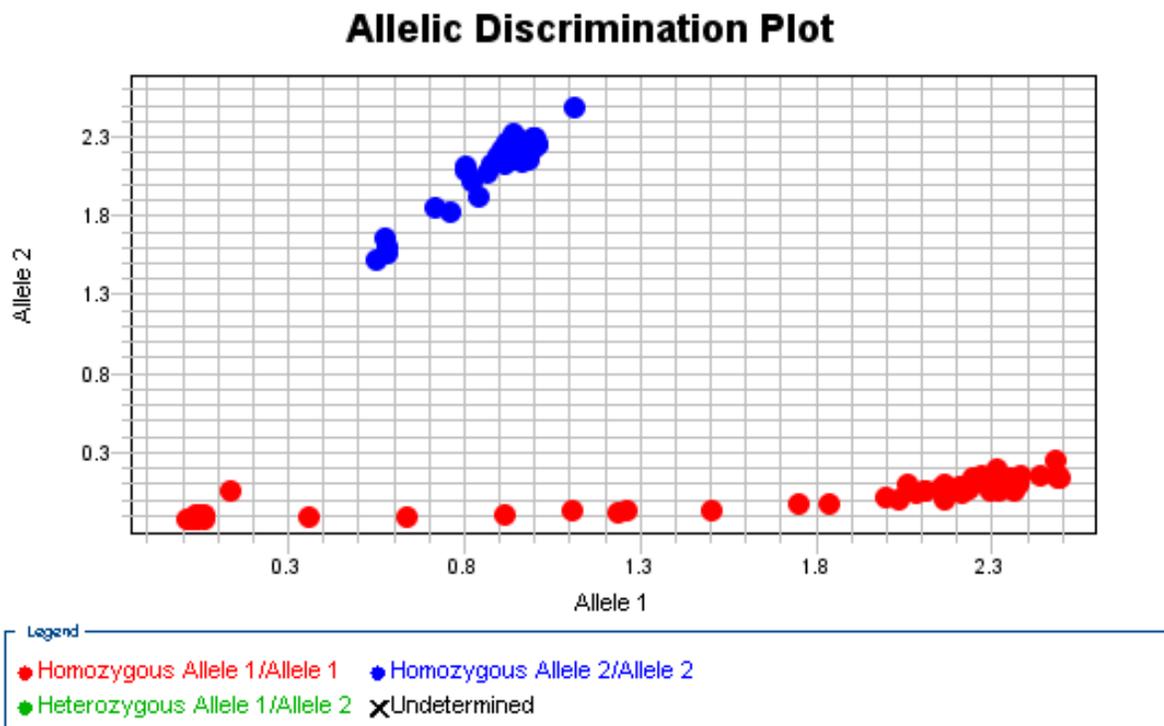


Figura 16 Gráfica de discriminación alélica para el haplogrupo A. El grupo de puntos de color rojo indican las muestras que presentan el alelo 1 que corresponde al reportado por la rRCS (G); los puntos de color azul corresponden al alelo 2, muestras que presentan el cambio de base en la posición 663 a adenina (A).

Para el haplogrupo C, se identificó el cambio de A por G en la posición 13263 (A13263G). En la Figura 17 se observa en color azul a las 17 muestras que presentan el cambio de base correspondiente a este haplogrupo.

Allelic Discrimination Plot

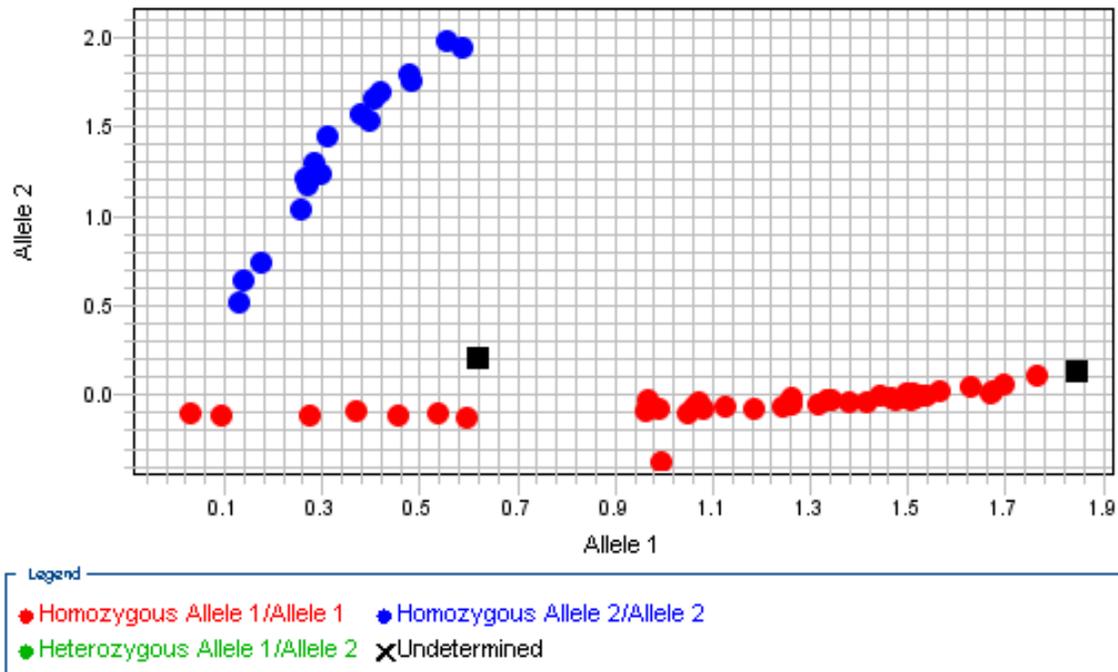


Figura 17 Gráfica de discriminación alélica para el haplogrupo C. El grupo de puntos de color rojo indican las muestras que presentan el alelo 1 que corresponde al reportado por la rRCS (G); los puntos de color azul corresponden al alelo 2, muestras que presentan el cambio de base en la posición 13263 a adenina (A).

Finalmente, para el haplogrupo D, se identificó el cambio de T por G en posición 5178 (T5178G). En la Figura 18 se observa en color azul a las 12 muestras que presentan el cambio de base correspondiente a este haplogrupo.

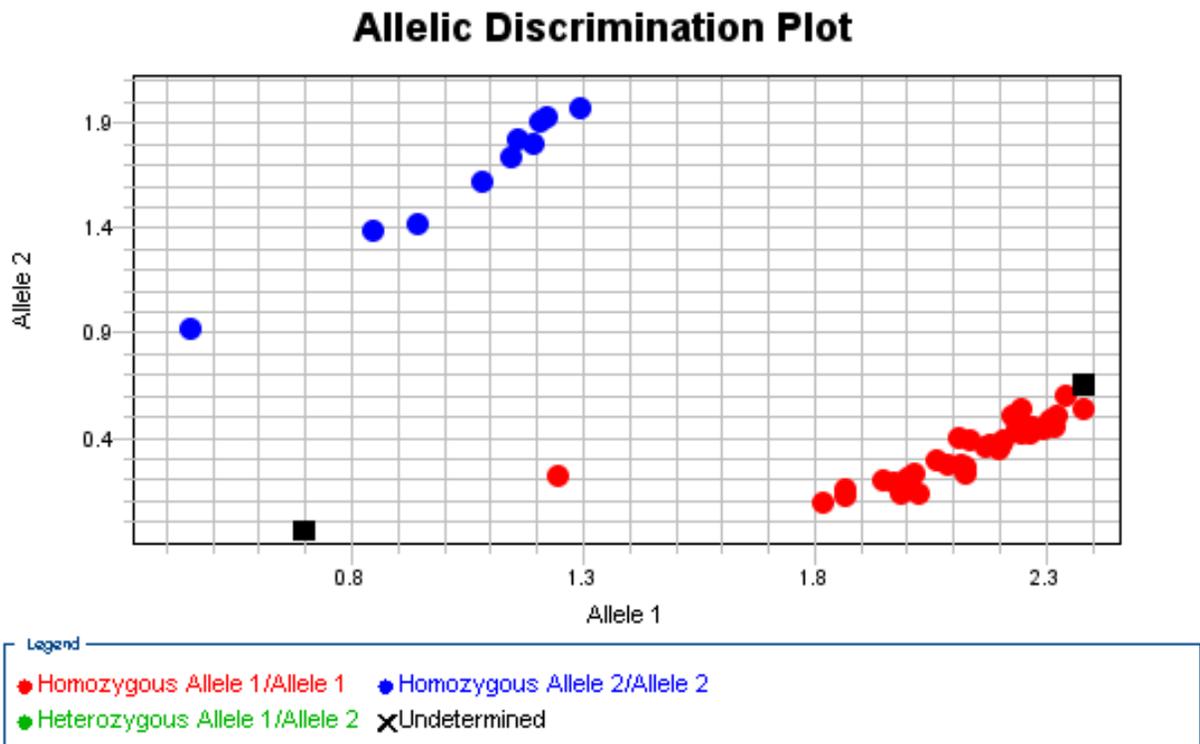


Figura 18 Gráfica de discriminación alélica para el haplogrupo D. El grupo de puntos de color rojo indican las muestras que presentan el alelo 1 que corresponde al reportado por la rRCS (G); los puntos de color azul corresponden al alelo 2, muestras que presentan el cambio de base en la posición 5178 a adenina (T).

Amplificación de la región D-loop mediante PCR punto final

Se amplificó un fragmento de la región control del mtDNA de 988 pb de la posición L15989 a la posición H408 que fue analizado mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1.5%. En la Figura 19 se muestra un ejemplo de los amplicones obtenidos de las muestras 75 a 78 tanto de tejido adyacente (A) como tumoral (T). En el primer carril se encuentra el marcador de peso molecular (PM), en el segundo se encuentra el control negativo de la reacción y en los carriles siguientes se observa la banda de 988 pb correspondiente a la región control del mtDNA. Posteriormente, las reacciones fueron purificadas para poder realizar la reacción de secuenciación e identificar los polimorfismos presentes para poder conocer su haplogrupo.

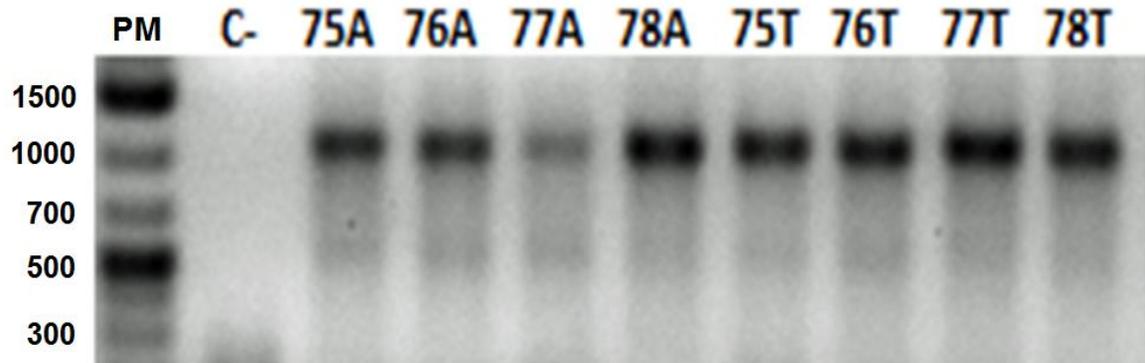


Figura 19 Amplicones del fragmento de 988 pb de la región control de mtDNA de las muestras 75 a 78. Los productos se analizaron en un gel de agarosa al 1.5%. PM= Marcador de Peso Molecular, C- = Control negativo (agua libre de nucleasas), A= Tejido Adyacente, T= Tejido Tumoral.

Obtención de las secuencias e identificación de los polimorfismos

Después de la purificación de las reacciones de amplificación, se realizó la reacción de secuenciación y las secuencias fueron analizadas en el programa Sequencher 5.3. En la Figura 20 se muestra el ejemplo del alineamiento de una de las secuencias problema con la Secuencia de Referencia de Cambridge donde puede observarse un cambio de T por C en la posición 16325 marcada con un punto negro.

De igual manera se realizó el alineamiento en la base de datos de Mitomap para comparar con el resultado obtenido del programa Sequencher. Esta base de datos también realiza una predicción del haplogrupo de la secuencia que se analiza además de identificar los polimorfismos como se muestra en el ejemplo de la Figura 21. La muestra analizada en el ejemplo según la predicción pertenece al haplogrupo D y presenta nueve variantes.



Figura 20 Alineamiento y comparación de secuencia problema con la rCRS

Sequence alignment

Click a single sequence link below to show details or click [here to show details for all](#)

Show 10 entries

Copy CSV Excel PDF Print

Sequence	Predicted Haplogroup	Total Variants	Variants	Submittal (optional)
User	D1 (D1)	9	A73G, A263G, T310TTC, T310C, A16059G, C16223T, T16325C, T16362C, G16474GG	Submit Variants to Mitomap

Figura 21 Ejemplo de secuencia de haplogrupo D1 obtenido de la base de datos Mitomap

Confirmación del haplogrupo B

Para las muestras que presentaron el polimorfismo T16189C, la reacción de secuenciación se ve afectada por la secuencia de poli-C, como se muestra en la Figura 22, y es imposible identificar los polimorfismos posteriores a esta posición, por lo que para confirmar la presencia del haplogrupo B debe detectarse una delección de 9 pb en la posición 8281-8289del.

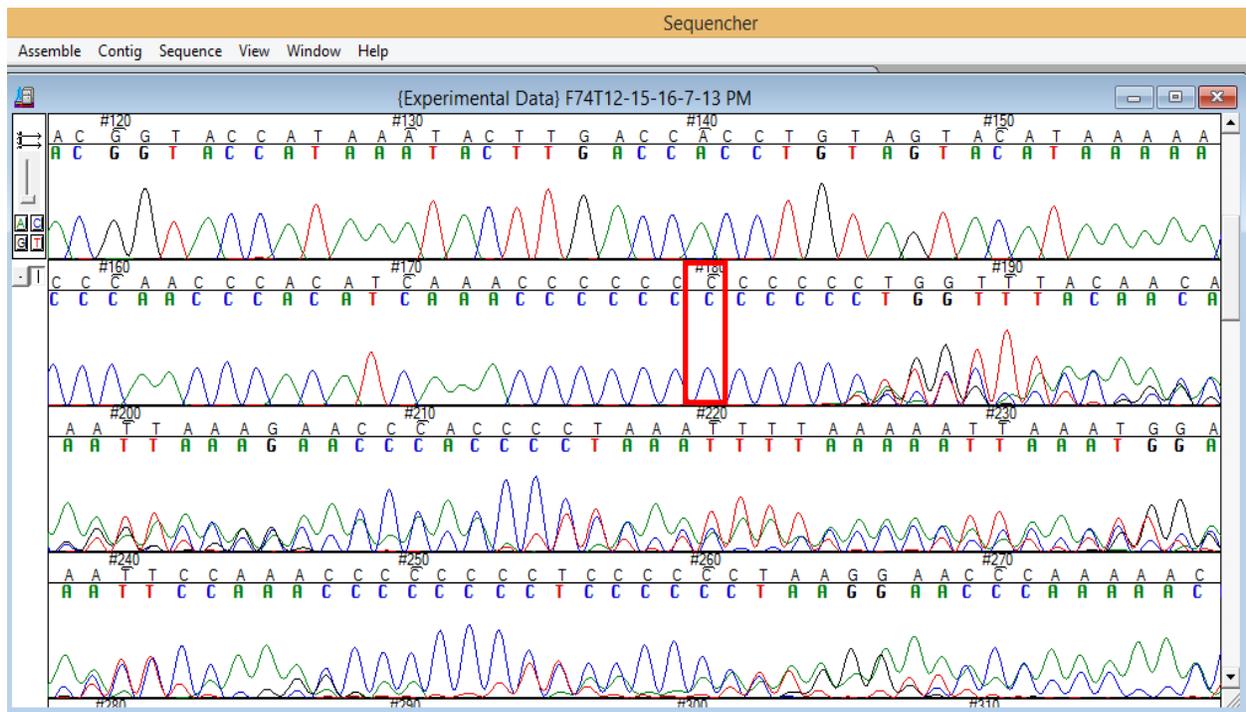


Figura 22 Ejemplo de electroferograma. Se observa el cambio de base en la posición 16189 de citosina (C) por timina (T) y la pérdida de señal posterior

Para ello se realizó una PCR punto final con los iniciadores L8200 y H8300 y el producto se observó en un gel de agarosa al 2.5% como se observa en la Figura 19. Se utilizaron dos controles negativos, el primero de ellos es un control de la reacción y el segundo corresponde a una muestra de un haplogrupo diferente al B, por lo que no presenta la delección y el tamaño del amplicón es de 100 pb. El control positivo corresponde a una muestra confirmada del haplogrupo B donde puede observarse una banda de peso molecular menor, es decir, que presenta la delección de 9 pb. En el

ejemplo de la Figura 23 puede observarse que las muestras 39, 48, 52 y 55 no corresponden al haplogrupo B.

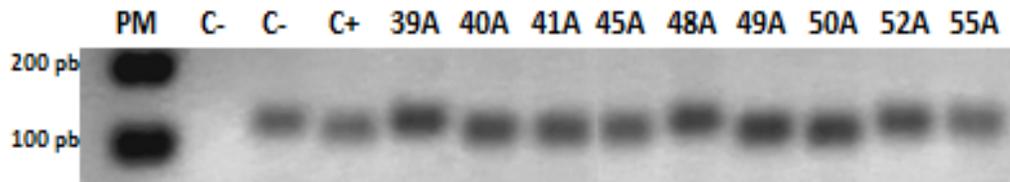


Figura 23 Ejemplo del producto de PCR punto final para identificar la delección 8281-8289del. Se observa la delección característica del haplogrupo B. PM= Marcador de Peso Molecular, C-= Agua libre de nucleasas, C-= Muestra de haplogrupo diferente al B, C+= Muestra de haplogrupo B, A= Tejido Adyacente

Determinación de haplogrupos y subhaplogrupos de pacientes y controles

La determinación de haplogrupos y subhaplogrupos de las 100 muestras se realizó tomando en cuenta los resultados de PCR tiempo real y la secuenciación de la región D-loop.

Se identificó al 91% de las muestras de las pacientes con cáncer de mama como haplogrupos amerindios (36% pertenecientes al haplogrupo A, 26% haplogrupo B, 17% haplogrupo C y 12% haplogrupo D) y el 9% como haplogrupo no amerindio, entre dichos haplogrupos se encuentran el H, J, K, L y U como se pueden observar en la Tabla 12 y en la Figura 24. También puede observarse el resultado de 173 muestras control, es decir, de mujeres mexicanas sin cáncer de mama. En dichas muestras control, el 94% presenta algún haplogrupo amerindio y 6% haplogrupo no amerindio.

La Tabla 12 también muestra los subhaplogrupos presentes tanto en las muestras control como en las pacientes y la frecuencia de éstos.

Tabla 12 Frecuencias de haplogrupos y subhaplogrupos de muestras problemas y controles

Haplogrupo	Controles					Problemas				
	N	Fr	Subhaplogrupo	N	Fr	N	Fr	Subhaplogrupo	N	Fr
A	77	0.445087	A	7	0.040	36	0.36	A2	22	0.220
			A2	28	0.162			A2a	1	0.010
			A12	3	0.017			A2d	2	0.020
			A19	1	0.006			A2f	1	0.010
			A2a	9	0.052			A2g	2	0.020
			A2b	2	0.012			A2h	1	0.010
			A2e	4	0.023			A2q	1	0.010
			A2g	4	0.023			A2u	6	0.060
			A2m	1	0.006					
			A2q	2	0.012					
			A2u	11	0.064					
			A2v	4	0.023					
			A2w	1	0.006					
			B	49	0.283237			B4	35	0.202
B2	2	0.012				B2a	2	0.020		
B2c	3	0.017				B2c	5	0.050		
B2i	2	0.012				B2g	6	0.060		
B2o	2	0.012				B2s	1	0.010		
B2u	2	0.012				B2t	1	0.010		
B2x	3	0.017				B2x	1	0.010		
		0.000				B2w	1	0.010		
C	35	0.202312	C1	11	0.064	17	0.17	C1	7	0.070
			C1b	10	0.058			C1b	3	0.030
			C1c	7	0.040			C1c	3	0.030
			C1d	4	0.023					
			C4a	3	0.017			C4	4	0.040
D	4	0.023121	D1m	4	0.023	12	0.12	D1	8	0.080
					0.000			D4	4	0.040
L	5	0.028902	L2	1	0.006	2	0.02	L2a	2	0.020
			L2b	2	0.012					
			L3d	1	0.006					
			L3h	1	0.006					
U	1	0.00578	U2e	1	0.006	1	0.01	U2e	1	0.010
J	1	0.00578	J1	1	0.006	1	0.01	J1	1	0.010
G	1	0.00578	G1a	1	0.006					
K						2	0.02	K1	2	0.020
H						3	0.03	H1	3	0.030
	173	1		173	1.000	100	1		100	1.000

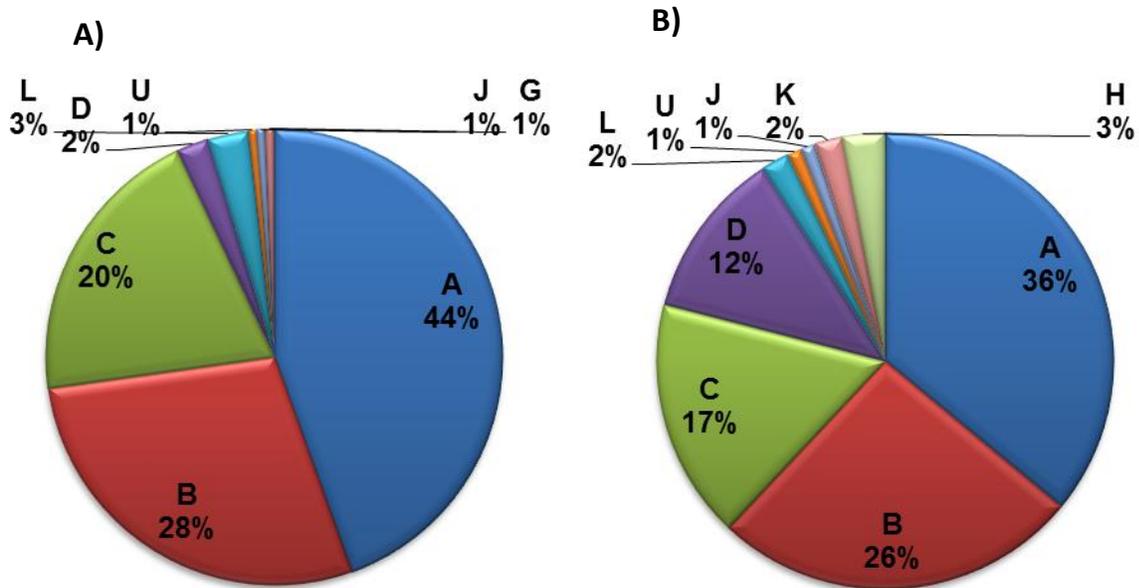


Figura 24 Frecuencias de haplogrupos. A) Controles, 173 muestras. B) Pacientes, 100 muestras. Se observa en distintos colores a los diferentes haplogrupos y sus frecuencias

Las frecuencias de cada subhaplogrupo de A se muestran en la Figura 25, donde se observa que el subhaplogrupo más frecuente tanto en controles como en pacientes es el A2 y también se encuentran presentes en menos frecuencia los subhalogrupos A12, A19, A2a, A2b, A2e, A2g, A2m, A2q, A2u, A2v y A2w en muestras controles y en pacientes los subhaplogrupos A2a, A2d, A2f, A2g, A2h, A2q y A2u.

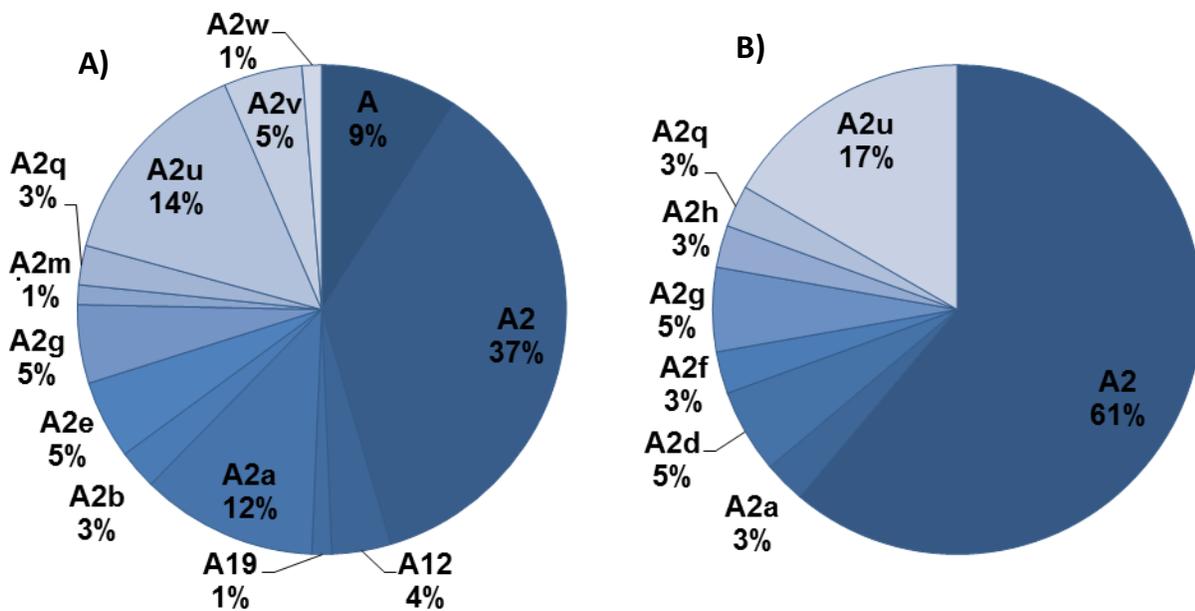


Figura 25 Frecuencias de subhaplogrupos de A. A) Controles, 77 muestras. B) Pacientes, 36 muestras. Se observa en distintos tonos de color los diferentes subhaplogrupos y sus frecuencias.

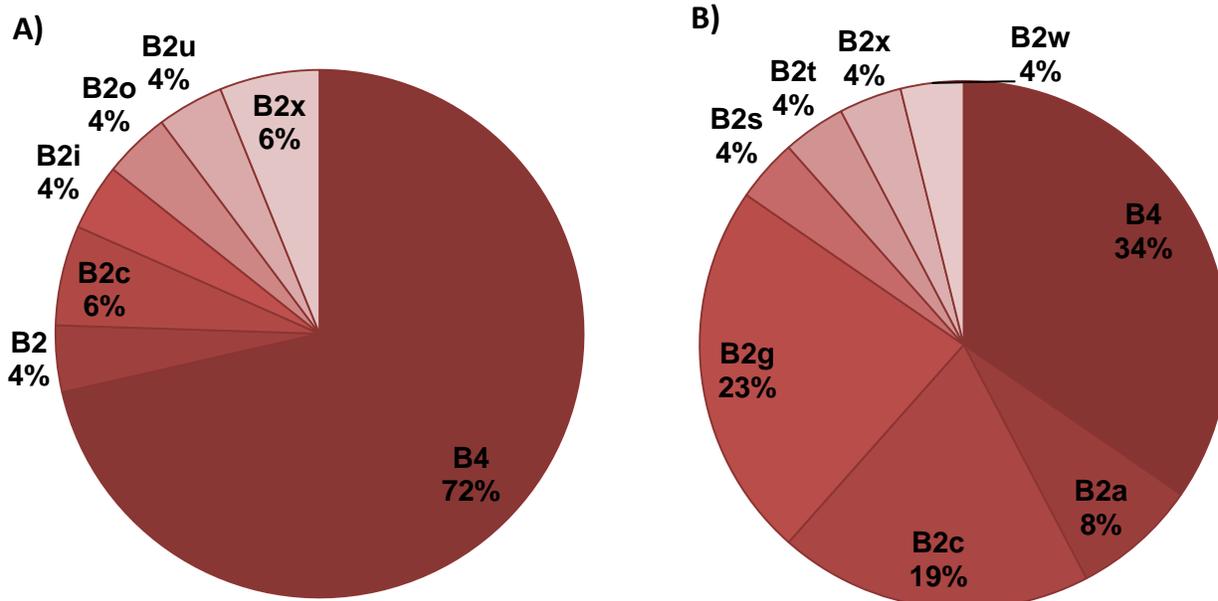


Figura 26 Frecuencia de subhaplogrupos de B. A) Controles, 49 muestras. B) Pacientes, 26 muestras. Se observa en distintos tonos de color los diferentes subhaplogrupos y sus frecuencias.

Las variantes presentes en la región control de las pacientes del haplogrupo B también fueron identificadas. En la Tabla 14 se presentan las variantes de las muestras de las 26 pacientes pertenecientes al haplogrupo B y el subhaplogrupo correspondiente. En la parte superior de la tabla se muestra la posición de la variante; en la segunda fila se encuentran las bases correspondientes a la Secuencia de Referencia de Cambridge y en cada muestra se anota el cambio que se presentó.

Tabla 14 Variantes presentes en pacientes de haplogrupo B

	73	114	146	152	153	207	263	-	309	-	315	16189	16196	16200	16206	16214	16217	16230	16258	16259	16270	16278	16295	16297	16298	16304	16311	16323	16357	16362	16391	16467	16483	16483	16519		
rCRS	A	C	T	T	A	G	A	-	-	-	-	T	G	A	A	C	T	A	A	C	C	C	C	T	T	T	T	T	T	T	G	C	G	G	T		
CaMa40 B2a	G	•	•	•	•	•	G	ins. C	ins. C	C	•	•	•	•	•	C	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	A	•	C
CaMa50 B2a	G	•	•	•	•	•	G	ins. C	ins. C	C	•	•	•	•	•	C	•	G	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	A	C
CaMa36 B2c	G	•	C	C	•	•	G	•	ins. C	C	•	•	•	•	•	C	•	•	•	•	•	•	•	T	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	C
CaMa45 B2c	G	•	C	•	•	•	G	ins. C	ins. C	C	•	•	•	•	•	C	•	•	•	•	•	•	•	T	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	C
CaMa73 B2c	G	•	C	C	•	•	G	ins. C	ins. C	C	•	•	•	•	•	C	•	•	•	•	•	•	•	T	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	C
CaMa88 B2c	G	•	C	C	•	•	G	ins. C	ins. C	C	•	•	•	•	•	C	•	•	•	•	•	•	•	T	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	C
CaMa100 B2c	G	•	C	C	•	•	G	ins. C	ins. C	C	•	•	•	•	•	C	•	•	•	•	•	•	•	T	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	C
CaMa16 B2g	G	G	C	•	•	•	G	•	ins. C	C	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	C	•	•	•	•	•	•	•	•	•	C	
CaMa19 B2g	G	G	C	•	•	•	G	•	ins. C	C	•	•	C	•	C	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	C	•	•	•	•	•	•	•	•	•	C	
CaMa31 B2g	G	G	•	•	•	•	G	•	ins. C	C	A	T	•	G	•	T	•	•	•	•	•	•	•	C	C	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	C	
CaMa60 B2g	G	G	•	C	•	•	G	ins. C	ins. C	C	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	C	•	C	•	•	•	•	•	•	•	C	
CaMa62 B2g	G	G	•	C	•	•	G	ins. C	ins. C	C	•	•	•	•	•	C	•	•	•	•	•	•	•	•	•	C	•	C	•	•	•	•	•	•	•	C	
CaMa74 B2g	G	G	•	•	•	•	G	ins. C	ins. C	C	•	•	•	•	•	C	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	A	•	•	C	
CaMa1 B2s	G	•	•	•	•	•	G	ins. C	ins. C	C	•	•	•	•	•	C	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	C
CaMa8 B2t	G	•	•	•	•	•	G	ins. C	ins. C	C	•	•	•	•	•	C	•	•	T	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	C	C	•	T	•	C
CaMa49 B2w	G	•	C	•	G	•	G	ins. C	ins. C	C	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	G	T	•	•	•	C	•	•	•	•	•	•	•	•	C
CaMa33 B2x	G	•	•	•	•	•	G	•	ins. C	C	•	•	•	•	•	C	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
CaMa2 B4	G	•	•	•	•	•	G	ins. C	ins. C	C	•	C	•	C	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	C
CaMa7 B4	G	•	•	•	•	•	G	ins. C	ins. C	C	•	•	•	•	•	C	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	C
CaMa9 B4	G	•	•	•	•	•	G	ins. C	ins. C	C	•	•	•	•	•	C	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	C
CaMa10 B4	G	•	C	•	•	A	G	ins. C	•	C	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	C
CaMa11 B4	G	•	•	•	•	•	G	ins. C	ins. C	C	•	•	•	•	•	C	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	C
CaMa30 B4	G	•	C	•	•	•	G	ins. C	ins. C	C	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	C
CaMa41 B4	G	•	•	•	•	•	G	ins. C	ins. C	C	•	•	•	•	•	C	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	C
CaMa61 B4	G	•	•	•	•	•	G	ins. C	ins. C	C	•	•	•	•	•	C	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	C
CaMa77 B4	G	•	C	•	G	•	G	ins. C	ins. C	C	•	•	•	•	•	C	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	C

rCRS: Secuencia de Referencia de Cambridge. CaMa: Cáncer de mama (número de paciente), A: Adenina, C: Citosina, G: Guanina, T: Timina, del.: Delección, ins.: Inserción

Las frecuencias de cada subhaplogrupo de C se muestran en la Figura 27, tanto en controles como en pacientes, se observa la presencia de los subhaplogrupos C1, C1b, C1c, C1d y C4c en controles y C1, C1b, C1c y C4 en pacientes.

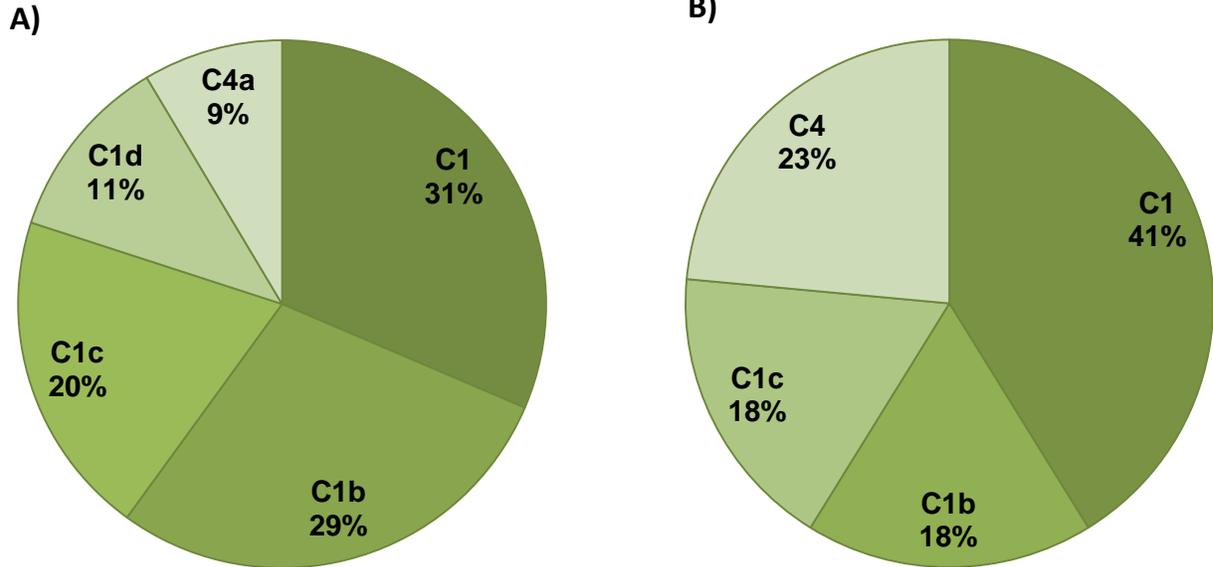


Figura 27 Frecuencia de subhaplogrupos de C. A) Controles, 35 muestras. B) Pacientes, 17 muestras. Se observa en distintos tonos de color los diferentes subhaplogrupos y sus frecuencias.

Las variantes presentes en la región control de las pacientes de haplogrupo C y D fueron identificadas. En la Tabla 15 se presentan las variantes de las muestras de las 17 pacientes pertenecientes al haplogrupo C y de las 12 pacientes pertenecientes al haplogrupo D y los subhaplogrupos correspondientes. En la parte superior de la tabla se muestra la posición de la variante; en la segunda fila se encuentran las bases correspondientes a la Secuencia de Referencia de Cambridge y en cada muestra se anota el cambio que se presentó.

Las frecuencias de cada subhaplogrupo de D se muestran en la Figura 27, se observa la presencia del subhaplogrupo D1m en pacientes y de D1 y D4 en controles.

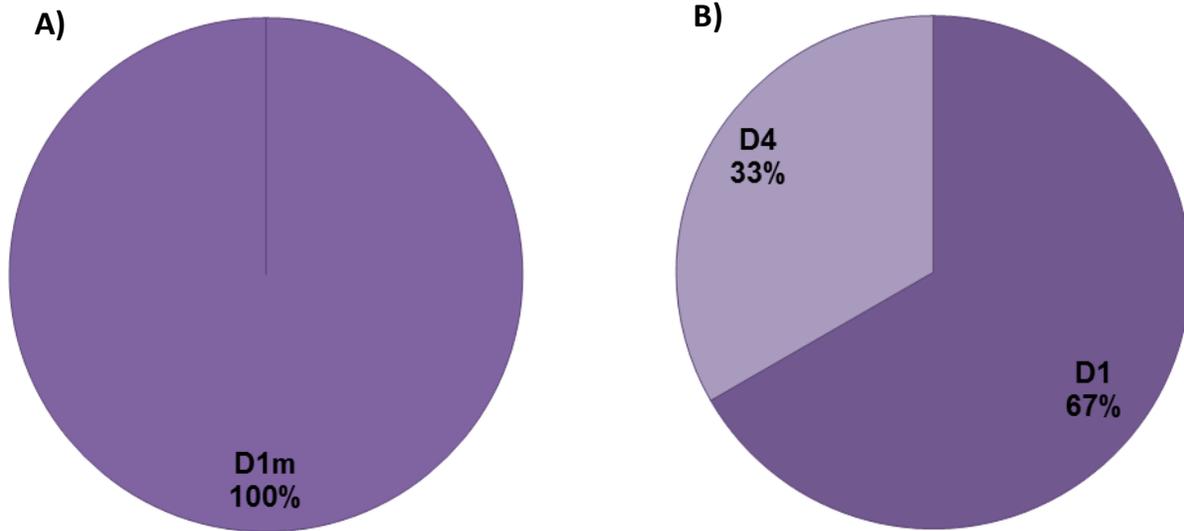


Figura 28 Frecuencia de subhaplogrupos de D. A) Controles, 4 muestras. B) Pacientes, 12 muestras. Se observa en distintos tonos de color los diferentes subhaplogrupos y sus frecuencias.

Tabla 15 Variantes presentes en pacientes de haplogrupos C y D

	73	146	150	152	185	188	199	204	207	214	215	249	250	263	290	309	315	16129	16153	16172	16174	16188	16204	16223	16239	16241	16260	16271	16274	16298	16301	16311	16325	16327	16342	16346	16354	16354	16362	16368	16390	16519					
rCRS	A	T	C	T	G	A	T	T	G	A	A	A	T	A	AA	-	-	G	G	T	C	C	G	C	C	A	C	T	G	T	C	T	T	C	T	C	T	G	T	G	T						
CaMa14 C1	G	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	del. A	•	•	del. AA	•	ins. C	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•			
CaMa25 C1	G	•	•	•	•	•	•	•	•	•	G	del. A	•	G	del. AA	•	ins. C	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•		
CaMa32 C1	G	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	del. A	•	G	del. AA	•	ins. C	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•		
CaMa43 C1	G	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	del. A	•	G	del. AA	•	ins. C	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•		
CaMa58 C1	G	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	del. A	•	G	del. AA	•	ins. C	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•		
CaMa64 C1	G	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	del. A	•	G	del. AA	•	ins. C	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•		
CaMa68 C1	G	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	del. A	•	G	del. AA	•	ins. C	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•		
CaMa38 C1b	G	C	•	C	•	•	•	•	•	•	•	del. A	•	G	del. AA	•	ins. C	A	•	C	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	C	•	C	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	C		
CaMa54 C1b	G	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	del. A	•	G	del. AA	ins. C	ins. C	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	C	•	C	C	T	•	•	•	•	•	•	•	•		
CaMa57 C1b	G	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	del. A	•	G	del. AA	ins. C	ins. C	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	C	C	C	T	•	•	•	•	•	•	•	•	•		
CaMa66 C1b	G	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	del. A	•	G	del. AA	ins. C	ins. C	•	A	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	C	•	C	C	T	•	•	•	•	•	•	•	•		
CaMa94 C1c	G	•	•	•	•	•	•	•	•	•	G	del. A	•	G	del. AA	•	ins. C	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	C	•	C	T	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•		
CaMa98 C1c	G	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	del. A	•	•	del. AA	•	ins. C	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	A	C	•	C	T	•	•	•	•	•	•	•	•	•			
CaMa22 C4	G	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	del. A	•	G	del. AA	ins. C	ins. C	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	A	C	•	C	T	•	•	•	•	•	•	•	•	•		
CaMa29 C4	G	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	del. A	•	G	del. AA	ins. C	ins. C	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	C	•	C	T	•	•	•	•	•	•	•	•	•		
CaMa79 C4	G	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	del. A	•	G	del. AA	ins. C	ins. C	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•		
CaMa28 C4	G	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	del. A	•	G	del. AA	ins. C	ins. C	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•		
CaMa72 D1	G	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	G	•	ins. C	ins. C	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	C	
CaMa75 D1	G	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	G	•	ins. C	ins. C	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	
CaMa76 D1	G	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	G	•	ins. C	ins. C	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	
CaMa83 D1	G	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	G	•	ins. C	ins. C	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	
CaMa87 D1	G	•	T	•	•	•	•	•	•	•	•	•	G	•	•	ins. C	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	A
CaMa4 D1	G	•	•	•	A	G	•	•	•	•	•	•	G	•	ins. C	ins. C	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	
CaMa5 D1	G	•	•	C	•	•	•	•	•	•	•	•	G	•	ins. C	ins. C	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	
CaMa71 D1	G	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	G	•	ins. C	ins. C	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	
CaMa52 D4	G	•	•	C	•	•	C	C	G	•	•	•	C	G	•	ins. C	ins. C	A	•	•	T	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	
CaMa78 D4	G	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	G	•	ins. C	ins. C	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	
CaMa97 D4	G	•	•	•	•	•	•	•	•	•	G	•	•	G	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	
CaMa99 D4	G	•	•	C	•	•	•	•	•	•	G	•	•	G	•	ins. C	ins. C	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	

rCRS: Secuencia de Referencia de Cambridge. CaMa: Cáncer de mama (número de paciente), A: Adenina, C: Citosina, G: Guanina, T: Timina, del.: Delección, ins.: Inserción

Siguiendo la misma estrategia, se identificaron las variantes presentes en la región control de las pacientes de haplogrupos no amerindios. En la Tabla 16 se presentan las variantes de las 9 pacientes de haplogrupos no amerindios. En la parte superior de la tabla se muestra la posición de la variante; en la segunda fila se encuentran las bases correspondientes a la Secuencia de Referencia de Cambridge y en cada muestra se anota el cambio que se presentó.

Tabla 16 Variantes presentes en pacientes de haplogrupos no amerindios

	73	143	146	152	185	188	195	198	228	263	295	309	315	16126	16189	16192	16200	16212	16215	16223	16224	16270	16274	16278	16294	16309	16311	16356	16390	16438	16519		
rCRS	A	G	T	T	G	A	T	C	G	A	C	-	-	T	T	C	A	A	A	C	T	C	G	C	C	A	T	T	G	G	T		
CaMa48 H1	G	•	•	•	•	•	C	•	•	G	•	ins. C	ins. C	•	C	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	C	•	•	•	C	
CaMa55 H1	G	•	•	•	•	•	•	•	•	G	•	ins. C	ins. C	•	C	•	•	G	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	A	C
CaMa70 H1	•	•	•	•	•	•	•	•	•	G	•	•	ins. C	•	•	•	•	•	•	•	•	•	T	•	•	•	•	•	•	•	•	•	C
CaMa37 J	G	•	•	•	A	G	•	•	A	G	T	ins. C	ins. C	C	•	•	•	•	T	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	C
CaMa35 K	G	•	C	C	•	•	•	•	•	G	•	•	ins. C	•	•	T	•	•	•	•	•	C	•	•	•	•	•	•	C	•	•	•	•
CaMa39 K	G	•	C	C	•	•	•	•	•	G	•	•	ins. C	•	•	T	•	•	•	•	•	C	•	•	•	•	•	C	•	•	•	•	C
CaMa42 L2	G	A	C	C	•	•	C	T	•	G	•	•	ins. C	•	C	•	C	•	•	T	•	•	A	T	T	G	•	•	A	•	•	C	
CaMa65 L2	G	•	C	C	•	•	C	•	•	G	•	ins. C	ins. C	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	T	T	G	•	•	A	•	C	
CaMa12 U	G	•	•	•	•	•	C	T	•	G	•	ins. C	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	C	•	•	•	•	

rCRS: Secuencia de Referencia de Cambridge. CaMa: Cáncer de mama (número de paciente), A: Adenina, C: Citosina, G: Guanina, T: Timina, del.: Delección, ins.: Inserción

Asociación entre haplogrupos y/o haplotipos mitocondriales con la presencia del MMTV/HMTV y/o con el desarrollo de cáncer de mama

No se pudo realizar ninguna asociación de algún haplogrupo o haplotipo mitocondrial y la presencia de MMTV/HMTV ya que todas las muestras fueron negativas a dicho retrovirus.

Se realizó el análisis de asociación entre haplogrupos mitocondriales y el cáncer de mama. En la Tabla 14 se observa la razón de probabilidades (OR), junto con su intervalo de confianza de 95%, el valor de χ^2 y el valor de P por haplogrupo, donde sólo se observó que el haplogrupo D fue más frecuente en casos que en controles y además presentó un valor de $P < 0.05$.

Tabla 17 Análisis de asociación de haplogrupos mitocondriales amerindios con el desarrollo de cáncer de mama. La diferencia entre frecuencias y la asociación con cáncer de mama fue calculada con una prueba de Odds Ratio (OR) con intervalos de confianza de 95% y significancia de $p < 0.05$ contrastando la hipótesis de asociación mediante la prueba de χ^2

Haplogrupo	Controles (Frecuencia) n = 173	Casos (Frecuencia) n = 100	OR (I.C. 95%)	χ^2	P
A	77 (0.445)	36 (0.36)	0.701 (0.42-1.16)	1.89	0.17
B	49 (0.283)	26 (0.26)	0.89 (0.51-1.55)	0.17	0.68
C	35 (0.202)	17 (0.17)	0.81 (0.43-1.53)	0.43	0.51
D	4 (0.23)	12 (0.12)	5.76 (1.81-18.39)	10.78	0.001

También se realizó el análisis de OR por subhaplogrupo, En la Tabla 15 se muestran los resultados del análisis estadístico para subhaplogrupos de A, donde no se observó diferencia significativa para ningún subhaplogrupo.

Tabla 18 Análisis de asociación de subhaplogrupos A con el desarrollo de cáncer de mama. La diferencia entre frecuencias y la asociación con cáncer de mama fue calculada con una prueba de Odds Ratio (OR) con intervalos de confianza de 95% y significancia de $p < 0.05$ contrastando la hipótesis de asociación mediante la prueba de χ^2 .

Subhaplogrupo	Controles (Frecuencia) n = 173	Casos (Frecuencia) n = 100	OR (I.C. 95%)	χ^2	P
A2	28 (0.162)	22 (0.22)	1.46 (0.78-2.72)	1.43	0.23
A2a	9 (0.052)	1 (0.01)	0.18 (0.02-1.47)	3.17	0.07
A2g	4 (0.023)	2 (0.02)	0.86 (0.15-4.79)	0.03	0.86
A2q	2 (0.012)	1 (0.01)	0.86 (0.08-9.65)	0.01	0.91
A2u	11 (0.064)	6 (0.06)	0.94 (0.34-2.62)	0.01	0.91

En cuanto al análisis de OR para los subhaplogrupos de B se observó que el subhaplogrupo B4 fue más frecuente en los controles que en los casos, presentando un OR y un intervalo de confianza menores a uno y además un valor de P significativo menor a 0.05, como puede observarse en la Tabla 16.

Tabla 19 Análisis de asociación de subhaplogrupos B con el desarrollo de cáncer de mama. La diferencia entre frecuencias y la asociación con cáncer de mama fue calculada con una prueba de Odds Ratio (OR) con intervalos de confianza de 95% y significancia de $p < 0.05$ contrastando la hipótesis de asociación mediante la prueba de χ^2

Subhaplogrupo	Controles (Frecuencia) n = 173	Casos (Frecuencia) n = 100	OR (I.C. 95%)	χ^2	P
B4	35 (0.202)	9 (0.09)	0.39 (0.18-0.85)	5.91	0.01
B2c	3 (0.017)	5 (0.05)	2.98 (0.69-12.75)	2.38	0.12
B2x	3 (0.017)	1 (0.01)	0.57 (0.06-5.58)	0.24	0.63

El análisis estadístico para los subhaplogrupos de C tampoco se obtuvo algún valor significativo que indicara la existencia de alguna asociación de riesgo o protección según los datos obtenidos de OR como puede observarse en la Tabla 17.

Tabla 20 Análisis de asociación de subhaplogrupos C con el desarrollo de cáncer de mama. La diferencia entre frecuencias y la asociación con cáncer de mama fue calculada con una prueba de Odds Ratio (OR) con intervalos de confianza de 95% y significancia de $p < 0.05$ contrastando la hipótesis de asociación mediante la prueba de χ^2 .

Subhaplogrupo	Controles (Frecuencia) n = 173	Casos (Frecuencia) n = 100	OR (I.C. 95%)	χ^2	P
C1	11 (0.064)	7 (0.07)	1.11 (0.41-2.96)	0.04	0.84
C1b	10 (0.058)	3 (0.03)	0.504 (0.13-1.88)	1.08	0.3
C1c	7 (0.04)	3 (0.03)	0.73 (0.18-2.90)	0.20	0.66
C4	3 (0.017)	4 (0.04)	2.36 (0.52-10.77)	1.30	0.25

Por último, el subhaplogrupo D1 fue más frecuente en casos que en controles, presenta valores tanto de OR como de intervalo de confianza mayores a 1 y un valor de P significativo menor a 0.05, como se observa en la Tabla 18.

Tabla 21 Análisis de asociación de subhaplogrupos D con el desarrollo de cáncer de mama. La diferencia entre frecuencias y la asociación con cáncer de mama fue calculada con una prueba de Odds Ratio (OR) con intervalos de confianza de 95% y significancia de $p < 0.05$ contrastando la hipótesis de asociación mediante la prueba de χ^2 .

Subhaplogrupo	Controles (Frecuencia) n = 173	Casos (Frecuencia) n = 100	OR (I.C. 95%)	χ^2	P
D1	4 (0.023)	8 (0.08)	3.67 (1.08-12.53)	4.88	0.02

Por otra parte, también se realizó el análisis estadístico de OR para los 15 polimorfismos más frecuentes en las muestras control y en los pacientes. El cambio G por A en la posición 16274 sólo se encontró en las pacientes con cáncer de mama y presentó un OR con su intervalo de confianza mayores a uno y una P con valor menor a 0.05. El cambio de C por T en la posición 16519 fue más frecuente en las pacientes con cáncer de mama que en los controles y el análisis estadístico indica que es una diferencia significativa, como puede observarse en la Tabla 19.

Tabla 22 Análisis de asociación de SNV's con el desarrollo de cáncer de mama. La diferencia entre frecuencias y la asociación con cáncer de mama fue calculada con una prueba de Odds Ratio (OR) con intervalos de confianza de 95% y significancia de $p < 0.05$ contrastando la hipótesis de asociación mediante la prueba de χ^2 .

SNV	Controles (Frecuencia) n = 98	Casos (Frecuencia) n = 100	OR (I.C. 95%)	χ^2	P
C16111T	32 (0.327)	27 (0.27)	0.76 (0.41-1.41)	0.76	0.38
G16129A	10 (0.102)	5 (0.05)	0.46 (0.15-1.41)	1.91	0.17
T16136C	4 (0.041)	6 (0.06)	1.50 (0.41-5.49)	0.38	0.54
T16189C	31 (0.316)	29 (0.29)	0.88 (0.48-1.62)	0.16	0.69
T16217C	24 (0.245)	20 (0.20)	0.77 (0.39-1.51)	0.58	0.45
C16223T	62 (0.633)	63 (0.63)	0.99 (0.55-1.76)	0.001	0.97
G16274A	0 (0.00)	11 (0.11)	13.2 (1.68-103.5)	9.72	0.002
C16290T	37 (0.378)	36 (0.34)	0.93 (0.52-1.65)	0.06	0.80
T16298C	13 (0.133)	20 (0.20)	1.63 (0.76-3.50)	1.62	0.20
T16311C	15 (0.153)	15 (0.15)	0.98 (0.45-2.12)	0.004	0.95
G16319A	38 (0.388)	34 (0.34)	0.81 (0.45-1.45)	0.49	0.48
T16325C	20 (0.204)	28 (0.28)	1.52 (0.79-2.93)	1.55	0.21
C16327T	17 (0.173)	16 (0.16)	0.91 (0.43-1.92)	0.06	0.80
T16362C	35 (0.357)	45 (0.42)	1.30 (0.73-2.31)	0.82	0.36
T16519C	20 (0.204)	36 (0.36)	2.19 (1.16-4.16)	5.93	0.01

DISCUSIÓN

El cáncer de mama es la neoplasia con mayor incidencia y mortalidad tanto a nivel mundial como en nuestro país. Se sabe que el cáncer de mama es una enfermedad multifactorial, entre los que se encuentran factores ambientales y/o geográficos que pueden contribuir al desarrollo de la neoplasia.

Entre los factores ambientales podemos encontrar a los virus. El descubrimiento de un agente infeccioso presente en la leche de ratones capaz de generar tumores malignos de mama en dichos animales y su identificación como un β -retrovirus, desembocó en la generación de la PCR anidada que actualmente se utiliza como método de detección del retrovirus en muestras de cáncer de humanos.

En el presente trabajo se realizó una PCR anidada utilizando los oligos descritos por Wang et al. en 1995 para identificar un fragmento del gen de la envoltura del retrovirus MMTV/HMTV en 100 muestras de tejido canceroso y 100 muestras de tejido adyacente al tumor de pacientes mexicanas diagnosticadas con cáncer de mama y dicha secuencia no se encontró en ninguno de los dos tipos de tejido.

En todas las reacciones realizadas para identificar a la secuencia del gen *Env* en las muestras de tejido tumoral y tejido adyacente, se utilizaron 3 ng de control positivo para validar el sistema de detección y la banda de 250 pb correspondiente a dicho control aparece en todos los geles de electroforesis, lo que indica que el sistema funcionaba de manera correcta.

Las condiciones en el termociclador y los reactivos utilizados en la PCR anidada fueron los mismos que se utilizaron en el trabajo de Cedro-Tanda et al., así como también el vector pBR322 (Cat 45006, ATCC), que contiene al gen *Env* de MMTV obtenido de la cepa C3H (GenBank AF228552) como control positivo.

El estudio de la prevalencia del retrovirus MMTV/HMTV ha sido realizado previamente por dos equipos de investigación diferentes en México. En el primer estudio la secuencia del gen de la envoltura del retrovirus estuvo presente en 5 de 119 muestras

de tejido canceroso de mama, esto es el 4.2%, en una población del noroeste del país (Zapata-Benavides et al., 2007).

En el segundo estudio se reportó la presencia de la secuencia en 57 pacientes de un total de 458 muestras de tejido analizado, es decir, el 12.4%. Además, en este estudio la secuencia también fue encontrada no sólo en tejido canceroso, sino en tejido sano adyacente al tumor incluso con una frecuencia mayor de 15.7% (Cedro-Tanda et al., 2014).

La detección de un fragmento del gen de la envoltura (*Env*) en muestras de tejido canceroso de pacientes diagnosticadas con cáncer de mama se ha realizado en varios países a lo largo del mundo para conocer la prevalencia y se ha demostrado una heterogeneidad geográfica.

Se ha detectado una alta prevalencia en E.U.A, Argentina, Australia (Ford et al., 2003; Melana et al., 2002; Wang et al., 1995) y países del Mediterráneo como Marruecos, Túnez e Italia (Hachana et al., 2008; Mazzanti et al., 2011; Slaoui et al., 2014), donde el rango va del 31 al 78% .

Sin embargo, en países asiáticos, la secuencia no fue detectada en Japón e Irán (Fukuoka et al., 2008; Oskouee et al., 2014), mientras que una muy baja frecuencia se observó en Vietnam y Myanmar (0.8% y 1.7%, respectivamente) (Ford et al., 2003; San et al., 2017). Por otra parte, aunque en China y Pakistán fueron reportadas las frecuencias de 16.8% y 20%, respectivamente, las secuencias no han sido confirmadas con las bases de datos (Luo et al., 2006; Naushad et al., 2014).

Por otra parte, el retrovirus no ha sido detectado en países del centro y norte de Europa como Suecia, Alemania, Inglaterra y Austria (Bindra et al., 2007; Frank et al., 2008; Mant et al., 2004; Witt et al., 2003).

El resultado obtenido en el presente trabajo concuerda con algunas referencias mencionadas anteriormente en otros países. En el estudio realizado por Bindra et al., se sugiere que no detectaron ninguna muestra positiva a la secuencia debido a una muy baja concentración de DNA viral, no mayor a una copia por 10^3 células.

La baja cantidad de copias del retrovirus insertadas en el genoma de las pacientes es una posible explicación a la ausencia de muestras de tejido tumoral y/o adyacente positivas. La estandarización de una prueba más sensible como lo es el tiempo real, ayudaría a aumentar la sensibilidad de detección del virus y eliminar falsos negativos.

Por otra parte, si se compara la frecuencia del retrovirus con la incidencia del cáncer en los distintos países mencionados se puede observar que los países asiáticos con cero o baja prevalencia como Japón, Vietnam y Myanmar, también tienen una baja incidencia de cáncer (51.5, 23.0 y 22.1 por cada 100,000 mujeres, respectivamente); en cambio, en países donde se ha reportado una alta prevalencia del retrovirus como Estados Unidos, Italia y Australia, también se reporta una alta incidencia de cáncer de mama (92.9, 91.3 y 86 por cada 100,000 mujeres, respectivamente), según lo reportado por el GLOBOCAN.

En el caso de México, la incidencia de 28.75 por cada 100,000 mujeres es similar a los países con baja frecuencia del retrovirus, lo que también explicaría la ausencia de muestras positivas y la necesidad de aumentar el número de muestras como se realizó en el estudio de Cedro-Tanda *et al.*, además de que según el cálculo del tamaño de la muestra mostrado en la sección de Materiales y Métodos, si se quisiera un poder estadístico de al menos el 80% tomando en cuenta al haplogrupo amerindio menos común en la población mexicana que corresponde al haplogrupo D, se necesitarían al menos 438 casos y 438 controles como se muestra en la Tabla 6.

Como no se obtuvo ninguna muestra positiva a la presencia del virus, no se pudo realizar ninguna asociación de algún haplogrupo o haplotipo mitocondrial y la presencia de MMTV/HMTV, por lo que la asociación se realizó directamente con los haplogrupos, subhaplogrupos y variantes mitocondriales y el cáncer de mama, en este análisis se omitieron a los haplogrupos no amerindios (G, H, J, K, L y U) debido a que con el número de individuos que presentan estos haplogrupos no se alcanza un poder estadístico adecuado que permita detectar una asociación significativa. La mayoría de mutaciones detectadas en diferentes estudios de asociación se han detectado específicamente en la región D-loop y en los genes NADH deshidrogenasa, citocromo oxidasa y ATPasa. El D-loop es una de las regiones consideradas como “hotspot” ya

que alberga un gran número de alteraciones que han sido relacionadas con distintos tipos de cáncer.

Los haplogrupos mitocondriales ayudan a distinguir a las poblaciones que han evolucionado de manera independiente durante la historia humana. Las variantes localizadas en la región control del mtDNA son especialmente útiles porque el rango de mutación es mayor en el resto de mtDNA, es por ello que si algunas enfermedades son afectadas por la función mitocondrial, deben comportarse de manera diferente dependiendo del haplogrupo del paciente.

En el presente trabajo, se determinó el haplogrupo de 100 pacientes mexicanas diagnosticadas con cáncer de mama. Se obtuvo la secuencia de la región control del mtDNA mediante la amplificación por PCR, donde la banda obtenida fue del tamaño adecuado y los electroferogramas obtenidos tras la reacción de secuenciación fueron de buena calidad, lo que permitió que lo obtenido fuese comparado con la secuencia de referencia de Cambridge y los polimorfismos presentes fueron consultados con la clasificación de Kumar *et al.* Además, la confirmación de haplogrupos y subhaplogrupos de B se realizó a través de la delección de 9 pb y mediante la secuenciación con el oligo reverse 23 R. El 91% de las muestras presentaron haplogrupo amerindio y 9% no amerindio. El haplogrupo más frecuente fue el haplogrupo A con un 36%, seguido del B con un 26%, seguido del C con 17% y por último el haplogrupo D con un 12%.

La frecuencia del haplogrupo A, de 36%, en este grupo de pacientes con cáncer de mama, es menor en comparación de la frecuencia del grupo control (44%) y en comparación con dos trabajos previos de nuestro grupo de trabajo en los cuales la frecuencia de dicho haplogrupo fue del 50% en una población mexicana. En cuanto a la frecuencia de los haplogrupos B y C es similar al grupo control y a los dos trabajos previos del grupo de trabajo. Sin embargo, la frecuencia del haplogrupo D en el grupo de pacientes con cáncer de mama (12%) es mucho mayor al grupo control (2%) y a las reportadas por los dos trabajos mencionados (6% y 7%) (Domínguez-de-la-Cruz, 2014; Saldaña-Martínez, 2012).

Se identificó que el haplogrupo D es más frecuente en pacientes con cáncer de mama y el análisis estadístico demostró que existe una asociación de riesgo de desarrollar dicha neoplasia ($P = 0.0004$). Específicamente el subhaplogrupo D1 es el que genera el riesgo ($P = 0.02$).

Además, también se realizó el análisis estadístico por subhaplogrupo. Tanto en este análisis como en el anterior, sólo se tomaron en cuenta a los haplogrupos amerindios debido a que son los más frecuentes en la población mexicana. Fueron tomados en cuenta sólo los subhaplogrupos amerindios que sí presentaban un poder estadístico adecuado para detectar una asociación significativa.

Se determinó que no existe asociación entre los subhaplogrupos de A y C y el desarrollo de cáncer de mama.

En cuanto a los subhaplogrupos de B, la medida estadística de OR sugiere que el haplogrupo B4 puede ser un factor de protección al desarrollo de cáncer de mama ($P = 0.01$).

El estudio de asociación de haplogrupos mitocondriales con la carcinogénesis de mama también se ha realizado en diferentes países. En una población europeo-americana se identificó que el haplogrupo K incrementa el riesgo de desarrollar cáncer de mama ($P = 0.0004$), mientras que el haplogrupo U es un factor de protección al desarrollo de dicha neoplasia ($P = 0.0023$) (Bai *et al.*, 2007).

En otro estudio realizado en una población hindú se validó que la presencia de la alteración G1398A es patogénica ($P = 0.01$), el cual pertenece al haplogrupo N (Darvishi *et al.*, 2006). En una población polaca el haplogrupo I es más frecuente en individuos con cáncer de mama, mientras que en China el haplogrupo M también incrementa el riesgo de la carcinogénesis (Shen *et al.*, 2011).

Además también se han encontrado asociaciones de haplogrupos mitocondriales y el desarrollo de cáncer de mama en pacientes portadoras de mutaciones en los genes BRCA1 y BRCA2, los cuales explican del 5 al 10% de todos los casos de cáncer de mama. Dicha investigación se llevó a cabo en una población italiana en donde se

identificó que el haplogrupo X es más frecuente en pacientes con mutación en el gen BRCA1 ($P = 0.005$) y el haplogrupo H se encontró asociado a pacientes con mutación en el gen BRCA2 ($P = 0.05$) (Tommasi et al., 2014).

Por otra parte, también se llevó a cabo el análisis de asociación de 15 variantes presentes en la región control (D-loop) del mtDNA de las pacientes con cáncer de mama de las cuales llama la atención la variante G16274A, ya que sólo estuvo presente en las pacientes, mientras que en los controles estuvo ausente y también la variante T16519C, la cual fue más frecuente en pacientes que en controles, por lo que ambos representan factores de riesgo para el desarrollo de la neoplasia ($P = 0.002$ y $P = 0.01$, respectivamente).

La asociación de la variante T16519C con cáncer de mama ha sido previamente reportada en tres diferentes poblaciones: europeo-americana, polaca e italiana, en las cuales representa un incremento en el riesgo de desarrollar dicha neoplasia (Bai et al., 2007; Czarnecka et al., 2010; Tommasi et al., 2014).

También se ha reportado que la variante T16519C aumenta el riesgo de desarrollar cáncer pancreático en pacientes con diabetes mellitus (Navaglia et al., 2006) y de igual manera, de acuerdo a MITOMAP, la presencia de dicha variante se ha reportado en cáncer oral, gástrico, de pulmón y ovárico.

En cuanto a la variante G16274A, no se encontraron reportes de asociación con cáncer sin embargo, este polimorfismo es característico del haplogrupo D1, el cual define exclusivamente a la población otomí (Gorostiza et al., 2012) y además se encuentra en la región 7S, la cual funciona como iniciador de la replicación de la cadena H del mtDNA (Minczuk, 2014).

CONCLUSIONES

No se identificó la presencia del retrovirus MMTV/HMTV y por tanto tampoco una relación con los polimorfismos presentes en los haplogrupos mitocondriales de las mujeres con cáncer de mama en una población mexicana.

El haplogrupo D representa un factor de riesgo al desarrollo de cáncer de mama, específicamente el subhaplogrupo D1 mientras que el subhaplogrupo B4 representa un factor de protección.

Se identificó que la variante G16274A, así como la variante T16519C, representan factores de riesgo para el desarrollo del cáncer de mama.

PERSPECTIVAS

- Aumentar el número de muestras para aumentar el poder estadístico y lograr la detección del retrovirus MMTV/HMTV
- Diseñar sondas Taqman para la detección del retrovirus MMTV/HMTV por PCR en tiempo real y estandarizar la prueba

BIBLIOGRAFÍA

- Abbadessa, G., Bagella, L., & Giordano, A. (2007). Viral infections as a cause of cancer (Review), 1521–1528.
- Abdulkareem, I. H., & Zurmi, I. B. (2012). Review of hormonal treatment of breast cancer, 15(1), 9–14. <http://doi.org/10.4103/1119-3077.94088>
- Achilli, A., Perego, U. A., Bravi, C. M., Coble, M. D., Kong, Q., & Scott, R. (2008). The Phylogeny of the Four Pan-American MtDNA Haplogroups: Implications for Evolutionary and Disease Studies, 3(3). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0001764>
- American Cancer Society. (2016). Tipos de cáncer de seno. Retrieved from <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-seno/compreension-de-un-diagnostico-de-cancer-de-seno/tipos-de-cancer-de-seno.html#referencias>
- American Joint Committee on Cancer. (2009). Breast Cancer Staging. In *Cancer Staging Manual* (7th editio, pp. 221–240).
- Bai, R., Leal, S. M., Covarrubias, D., Liu, A., & Wong, L. C. (2007). Mitochondrial Genetic Background Modifies Breast Cancer Risk, (10), 4687–4695. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-3554>
- Bindra, A., Muradrasoli, S., Kisekka, R., Nordgren, H., & Wa, F. (2007). Search for DNA of exogenous mouse mammary tumor virus-related virus in human breast cancer samples. *Journal of General Virology*, 88, 1806–1809. <http://doi.org/10.1099/vir.0.82767-0>
- Bittner, J. J. (1936). Some Possible Effects of Nursing on the Mammary Gland Tumor Incidence in Mice. *Science (New York, N.Y.)*, 84(2172), 162. <http://doi.org/10.1126/science.84.2172.162>
- Bonawitz, N. D., Clayton, D. A., & Shadel, G. S. (2006). Initiation and Beyond: Multiple Functions of the Human Mitochondrial Transcription Machinery. *Molecular Cell*, 24(6), 813–825. <http://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.11.024>
- Breast Cancer Organization. (2016). ¿Qué es el cáncer de mama? Retrieved from http://www.breastcancer.org/es/sintomas/cancer_de_mama/que_es_cancer_mama#Estadios
- Cai, F. F., Kohler, C., Zhang, B., Chen, W. J., Barekati, Z., Garritse, H. S. P., ... Zhong, X. Y. (2011). Mutations of Mitochondrial DNA as Potential Biomarkers in Breast Cancer. *ANTICANCER RESEARCH*, 31, 4267–4272.
- Cedro-Tanda, A., Córdova-Solis, A., Juárez-Cedillo, T., Pina-Jiménez, E., Hernández-Caballero, M. E., Moctezuma-Meza, C., ... García-Hernández, N. (2014). Prevalence of HMTV in breast carcinomas and unaffected tissue from Mexican

- women. *BMC Cancer*, 14(1), 942. <http://doi.org/10.1186/1471-2407-14-942>
- Cheng, M., Guo, Z., Li, H., Li, Z., Li, C., & Geng, C. (2014). Identification of sequence polymorphisms in the mitochondrial displacement loop as risk factors for sporadic and familial breast cancer. *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 35(5), 4773–7. <http://doi.org/10.1007/s13277-014-1626-5>
- Czarnecka, A. M., Krawczyk, T., Plak, K., Klemba, A., Zdrozny, M., Arnold, R. S., ... Mossakowska, M. (2010). Mitochondrial genotype and breast cancer predisposition, 1521–1534. <http://doi.org/10.3892/or>
- Darvishi, K., Sharma, S., Bhat, A. K., Rai, E., & Bamezai, R. N. K. (2006). Mitochondrial DNA G10398A polymorphism imparts maternal Haplogroup N a risk for breast and esophageal cancer. *Cancer Letters*, 249(2), 249–255. <http://doi.org/10.1016/j.canlet.2006.09.005>
- Domínguez-de-la-Cruz, E. (2014). *Asociación de variantes en los genes TCF7L2, WFS1 y el haplogrupo mitocondrial con el desarrollo de diabetes tipo 2 en una población mexicana*. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.
- Etkind, P., Du, J., Khan, A., Pillitteri, J., & Wiernik, P. H. (2000). Mouse Mammary Tumor Virus-like ENV Gene Sequences in Human Breast Tumors and in a Lymphoma of a Breast Cancer Patient 1, 6(April), 1273–1278.
- Fackenthal, J. D., & Olopade, O. I. (2007). Breast cancer risk associated with BRCA1 and BRCA2 in diverse populations, 7(december). <http://doi.org/10.1038/nrc2054>
- Falkenberg, M. (2007). DNA Replication and Transcription in Mammalian Mitochondria. <http://doi.org/10.1146/annurev.biochem.76.060305.152028>
- Fang, H., Shen, L., Chen, T., He, J., Ding, Z., Wei, J., ... Bai, Y. (2010). Cancer type-specific modulation of mitochondrial haplogroups in breast, colorectal and thyroid cancer. *BMC Cancer*, 10(1), 421. <http://doi.org/10.1186/1471-2407-10-421>
- Faschinger, A., Rouault, F., Sollner, J., Lukas, A., Salmons, B., & Gu, W. H. (2008). Mouse Mammary Tumor Virus Integration Site Selection in Human and Mouse Genomes □ †, 82(3), 1360–1367. <http://doi.org/10.1128/JVI.02098-07>
- Ford, C. E., Faedo, M., Crouch, R., Lawson, J. S., & Rawlinson, W. D. (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, 4755–4759.
- Ford, C. E., Tran, D., Deng, Y., Ta, V. T., Rawlinson, W. D., & Lawson, J. S. (2003). Mouse Mammary Tumor Virus-like Gene Sequences in Breast Tumors of Australian and Vietnamese Women 1, 9(March), 1118–1120.
- Frank, O., Verbeke, C., Schwarz, N., Mayer, J., Fabarius, A., Leib-mo, C., & Seifarth,

- W. (2008). Variable Transcriptional Activity of Endogenous Retroviruses in Human Breast Cancer □ †, 82(4), 1808–1818. <http://doi.org/10.1128/JVI.02115-07>
- Fukuoka, H., Moriuchi, M., Yano, H., Nagayasu, T., & Moriuchi, H. (2008). No association of mouse mammary tumor virus-related retrovirus with Japanese cases of breast cancer. *J Med Virol*, 80(8), 1447–1451.
- GLOBOCAN. (2012). Breast Cancer Estimated Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. Retrieved from 1. <http://globocan.iarc.fr/old/FactSheets/cancers/breast-new.asp#INCIDENCE>
- Gochhait, S., Bhatt, A., Sharma, S., Singh, Y. P., Gupta, P., & Bamezai, R. N. K. (2008). Concomitant presence of mutations in mitochondrial genome and p53 in cancer development — A study in north Indian sporadic breast and esophageal cancer patients. <http://doi.org/10.1002/ijc.23817>
- Gorostiza, A., Acunha-Alonzo, V., Regalado-Liu, L., Tirado, S., Granados, J., Sámano, D., ... Gonzalez-Martin, A. (2012). Reconstructing the History of Mesoamerican Populations through the Study of the Mitochondrial DNA Control Region. *Plos One*, 7(9). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0044666>
- Guardado-Estrada, M., Juarez-Torres, E., Medina-Martinez, I., Wegier, A., Macías, A., Gomez, G., ... Berumen, J. (2009). A great diversity of Amerindian mitochondrial DNA ancestry is present in the Mexican mestizo population. *Journal of Human Genetics*, 54(12), 695–705. <http://doi.org/10.1038/jhg.2009.98>
- Guardado-Estrada, M., Medina-Martínez, I., Juárez-Torres, E., Roman-Bassaure, E., Macías, L., Alfaro, A., ... Berumen, J. (2012). The Amerindian mtDNA haplogroup B2 enhances the risk of HPV for cervical cancer: de-regulation of mitochondrial genes may be involved. *Journal of Human Genetics*, 57(4), 269–276. <http://doi.org/10.1038/jhg.2012.17>
- Hachana, M., Trimeche, M., Ziadi, S., Amara, K., Gaddas, N., Mokni, M., & Korbi, S. (2008). Prevalence and characteristics of the MMTV-like associated breast carcinomas in Tunisia. *Cancer Letters*, 271(2), 222–230. <http://doi.org/10.1016/j.canlet.2008.06.001>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hendrickson, S. L., Hutcheson, H. B., Ruiz-Pesini, E., Poole, J. C., Lautenberger, J., Sezgin, E., ... O'Brien, S. J. (2008). Mitochondrial DNA haplogroups influence AIDS progression. *AIDS (London, England)*, 22(18), 2429–39. <http://doi.org/10.1097/QAD.0b013e32831940bb>
- Holder, W. D., & Wells, S. A. (1983). Antibody Reacting with the Murine Mammary Tumor Virus in the Serum of Patients with Breast Carcinoma: A Possible Serological Detection Method for Breast Carcinoma1, (January), 239–244.

- Hughes, J. F., & Coffin, J. M. (2004). Human endogenous retrovirus K solo-LTR formation and insertional polymorphisms: Implications for human and viral evolution, *101*(6).
- INEGI. (2016). ESTADÍSTICAS A PROPÓSITO DEL DÍA MUNDIAL DE LA LUCHA CONTRA EL CÁNCER DE MAMA (19 DE OCTUBRE).
- Kamińska, M., Ciszewski, T., Łopacka-szatan, K., Miotła, P., & Starostawska, E. (2015). Breast cancer risk factors, *14*(3), 196–202. <http://doi.org/10.5114/pm.2015.54346>
- Krishnamurti, U., & Silverman, J. F. (2014). HER2 in Breast Cancer: A Review and Update, *21*(2), 100–107.
- Kumar, S., Bellis, C., Zlojutro, M., Melton, P. E., Blangero, J., & Curran, J. E. (2011). Large scale mitochondrial sequencing in Mexican Americans suggests a reappraisal of Native American origins, 7–15.
- Lazcano-ponce, E., & Salazar-martínez, E. (2001). Estudios epidemiológicos de casos y controles . Fundamento teórico , variantes y aplicaciones, *43*(2), 135–150.
- Levine, P. H., Pogo, B. G., Ph, D., Klouj, A., Coronel, S., Woodson, K., ... Holland, J. F. (2004). Increasing Evidence for a Human Breast Carcinoma Virus with Geographic Differences, (July), 721–726. <http://doi.org/10.1002/cncr.20436>
- Levint, A., Hsia, C. C., Geller, N., & Good, R. A. (1981). Antibodies reactive with murine mammary tumor virus in sera of patients with breast cancer : Geographic and family studies, *78*(4), 2483–2487.
- Lewis, C. M. (2002). Genetic association studies : Design , analysis and interpretation, *3*(2), 146–153.
- Li, C. I., Uribe, D. J., & Daling, J. R. (2005). Clinical characteristics of different histologic types of breast cancer, 1046–1052. <http://doi.org/10.1038/sj.bjc.6602787>
- Li, H., Liu, D., Lu, J., & Bai, Y. (2012). *Advances in Mitochondrial Medicine*. (R. Scatena, P. Bottoni, & B. Giardina, Eds.). Springer. <http://doi.org/10.1007/978-94-007-2869-1>
- Liu, B., Wang, Y., Melana, S. M., Pelisson, I., Najfeld, V., Holland, J. F., & Pogo, B. G. (2001). Identification of a Proviral Structure in Human Breast Cancer 1, 1754–1759.
- Luo, T., Wu, X., Zhang, M., & Qian, K. (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.
- Mant, C., Gillett, C., Arrigo, C. D., & Cason, J. (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, *318*, 393–404. <http://doi.org/10.1016/j.virol.2003.09.027>

- May, F. E., & Westley, B. R. (1989). Characterization of sequences related to the mouse mammary tumor virus that are specific to MCF-7 breast cancer cells. *Cancer Res*, 49(0008-5472 (Print)), 3879–3883.
- Mazzanti, C. M., Hamad, M. Al, Fanelli, G., Scatena, C., Zammarchi, F., Zavaglia, K., ... Bevilacqua, G. (2011). A Mouse Mammary Tumor Virus env -Like Exogenous Sequence Is Strictly Related to Progression of Human Sporadic Breast Carcinoma. *AJPA*, 179(4), 2083–2090. <http://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.06.046>
- Melana, S. M., Holland, J. F., & Pogo, B. G. (2001). Search for Mouse Mammary Tumor Virus-like env Sequences in Cancer and Normal Breast from the Same Individuals 1, 7(February), 283–284.
- Melana, S. M., Nepomnaschy, I., Sakalian, M., Abbott, A., Hasa, J., Holland, J. F., & Pogo, B. G. T. (2007). Characterization of viral particles isolated from primary cultures of human breast cancer cells. *Cancer Research*, 67(18), 8960–8965. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-3892>
- Melana, S. M., Picconi, M. A., Rossi, C., Mural, J., Alonio, L. V., Teyssie, A., ... Pogo, B. G. T. (2002). DETECCIÓN DE SECUENCIAS HOMOLOGAS AL GEN env DEL VIRUS DEL TUMOR MAMARIO MURINO (MMTV) EN CANCER DE MAMA DE PACIENTES ARGENTINAS, 323–327.
- Minczuk, M. (2014). In D-loop : 40years of mitochondrial 7S DNA Article in Experimental gerontology · April 2014. *EXG*, (April). <http://doi.org/10.1016/j.exger.2014.03.027>
- Moore, D. H., Charney, J., Kramarsky, B., Lasfargues, E. Y., & Sarkar, N. H. (1971). Search for a Human Breast Cancer Virus. *Nature*, 229.
- Nartey, T., Mazzanti, C. M., Melana, S., Glenn, W. K., Bevilacqua, G., Holland, J. F., ... Pogo, B. G. T. (2017). Mouse mammary tumor-like virus (MMTV) is present in human breast tissue before development of virally associated breast cancer. *Infectious Agents and Cancer*, 1–7. <http://doi.org/10.1186/s13027-016-0113-6>
- Nartey, T., Moran, H., Marin, T., Arcaro, K. F., Anderton, D. L., Etkind, P., ... Pogo, B. G. (2014). Human Mammary Tumor Virus (HMTV) sequences in human milk, 1–8.
- National Cancer Institute. (2017). Información general sobre el cáncer de mama. Retrieved from <https://www.cancer.gov/espanol/tipos/seno/paciente/tratamiento-seno-pdq>
- Naushad, W., Bin, T., Gomez, M., Ashig, M., Younas, M., & Sadia, H. (2014). Detection and identification of mouse mammary tumor virus-like DNA sequences in blood and breast tissues of breast cancer patients. *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 35(8), 8077–86.
- Navaglia, F., Basso, D., Fogar, P., Sperti, C., Pizzi, S., Parenti, A., ... Plebani, M. (2006). Mitochondrial DNA D-Loop in Pancreatic Cancer Somatic Mutations Are Epiphenomena While the Germline 16519 T Variant Worsens Metabolism and

- Outcome. *American Journal for Clinical Pathology*, 126(September), 593–601. <http://doi.org/10.1309/GQFCCJMH5KHNvX73>
- Nawijn, M. C., Alendar, A., & Berns, A. (2011). For better or for worse : the role of Pim oncogenes in tumorigenesis, 11(jANuARY). <http://doi.org/10.1038/nrc2986>
- Ohta, A., & Nishiyama, Y. (2011). Mitochondrion Mitochondria and viruses. *MITOCH*, 11(1), 1–12. <http://doi.org/10.1016/j.mito.2010.08.006>
- Organización Mundial de la Salud. (2015). Cáncer. Retrieved from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>
- Oskouee, M., Shahmahmoodi, S., Jalilvand, S., Mahmoodi, M., Ziaee, A.-A., Esmaeili, H. A., ... Nategh, R. (2014). No Evidence of Mammary Tumor Virus env Gene-Like Sequences among Iranian. *Intervirolgy*, 57, 353–356. <http://doi.org/10.1159/000366280>
- Pina-Jiménez, E. (2017). *Determinación de la secuencia y estructura génica proviral del MMTV/HMTV, así como su expresión en cáncer de mama de mujeres mexicanas*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Pogo, B. G., & Holland, J. F. (1997). Possibilities of a viral etiology for human breast cancer. A review. *Biological Trace Element Research*, 56(1), 131–42. <http://doi.org/10.1007/BF02778989>
- Ranzani, M., Annunziato, S., Adams, D. J., & Montini, E. (2013). Cancer Gene Discovery: Exploiting Insertional Mutagenesis, 1141–1159. <http://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-13-0244>
- Saki, M., & Prakash, A. (2017). HHS Public Access, 216–227. <http://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.11.050.DNA>
- Saldaña-Martínez, A. (2012). *Determinación de la mutación A3243G en el DNA mitocondrial de pacientes con Diabetes tipo 2*. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Insituto Politécnico Nacional.
- San, T. H., Fujisawa, M., Fushimi, S., Yoshimura, T., Ohara, T., Soe, L., ... Matsukawa, A. (2017). Low prevalence of human mammary tumor virus (HMTV) in breast cancer patients from Myanmar, 1–7. <http://doi.org/10.1186/s13027-017-0130-0>
- Shen, L., Wei, J., Chen, T., He, J., Qu, J., & He, X. (2011). Evaluating mitochondrial DNA in patients with breast cancer and benign breast disease, 669–675. <http://doi.org/10.1007/s00432-010-0912-x>
- Slaoui, M., Mzibri, M. El, Razine, R., Qmichou, Z., Attaleb, M., & Amrani, M. (2014). Detection of MMTV-Like sequences in Moroccan breast cancer cases, 1–7.
- Stewart, J. B., & Chinnery, P. F. (2015). The dynamics of mitochondrial DNA heteroplasmy: implications for human health and disease. *Nature Reviews. Genetics*, 16(9), 530–42. <http://doi.org/10.1038/nrg3966>

- Taneja, P., Maglic, D., Kai, F., Zhu, S., Kendig, R. D., & Elizabeth, A. (2010). Clinical Medicine Insights: Oncology Classical and Novel Prognostic Markers for Breast Cancer and their Clinical Significance, 15–34.
- Theodorou, V., Boer, M., Weigelt, B., Jonkers, J., Valk, M. Van Der, & Hilkens, J. (2004). Fgf10 is an oncogene activated by MMTV insertional mutagenesis in mouse mammary tumors and overexpressed in a subset of human breast carcinomas, 6047–6055. <http://doi.org/10.1038/sj.onc.1207816>
- Tommasi, S., Favia, P., Weigl, S., Bianco, A., Pilato, B., Russo, L., ... Petruzzella, V. (2014). Mitochondrial DNA variants and risk of familial breast cancer: An exploratory study, 1691–1698. <http://doi.org/10.3892/ijo.2014.2324>
- Vigilant, L., Pennington, R., Harpending, H., Kocher, T. D., & Wilson, A. C. (1989). Mitochondrial DNA sequences in single hairs from a southern African population. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(23), 9350–9354. <http://doi.org/10.1073/pnas.86.23.9350>
- ViralZoneExpASy. (2017). Betaretrovirus. Retrieved from http://viralzone.expasy.org/66?outline=all_by_protein
- Wallace, D. C., Brown, M. D., & Lott, M. T. (1999). Mitochondrial DNA variation in human evolution and disease, 238, 211–230.
- Wang, F., Hou, J., Shen, Q., Yue, Y., Xie, F., Wang, X., & Jin, H. (2014). Mouse mammary tumor virus-like virus infection and the risk of human breast cancer: A meta-analysis. *American Journal of Translational Research*, 6(3), 248–266.
- Wang, Y., Holland, J. F., Bleiweiss, I. J., Melana, S., Liu, X., Pelisson, I., ... Pogo, B. G. (1995). Detection of mammary tumor virus env gene-like sequences in human breast cancer. *Cancer Res.*, 55(0008-5472 SB - M SB - X), 5173–5179.
- Wang, Y., Mandeli, J. F., Holland, J. F., & Pogo, B. G. T. (2003). High Prevalence of MMTV-like env Gene Sequences in Gestational Breast Cancer, 20(3), 233–234.
- Weigl, S., Paradiso, A., & Tommasi, S. (2013). Mitochondria and familial predisposition to breast cancer. *Current Genomics*, 14(3), 195–203. <http://doi.org/10.2174/1389202911314030005>
- White, M. K., Pagano, J. S., & Khalili, K. (2014). Viruses and Human Cancers: a Long Road of Discovery of Molecular, 27(3), 463–481. <http://doi.org/10.1128/CMR.00124-13>
- Witt, A., Hartmann, B., Marton, E., Zeillinger, R., Schreiber, M., & Kubista, E. (2003). The mouse mammary tumor virus-like env gene sequence is not detectable in breast cancer tissue of Austrian patients. *Oncology Reports*, 10(4), 1025–9.
- Xu, C., Ma, C., May, K., Jung, J., Vecchiarelli, J., & Done, S. J. (2012). Mitochondrial D310 mutations in the early development of breast cancer, 1506–1511. <http://doi.org/10.1038/bjc.2012.74>

- Yadav, N., & Chandra, D. (2013). Mitochondrial DNA mutations and breast tumorigenesis. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*, 1836(2), 336–344. <http://doi.org/10.1016/j.bbcan.2013.10.002>
- Zapata-Benavides, P., Saavedra-Alonso, S., Zamora-Avila, D., Vargas-Rodarte, C., Barrera-Rodriguez, R., Salinas-Silva, J., ... Trejo-Avila, L. (2007). Mouse Mammary Tumor Virus-Like Gene Sequences in Breast Cancer Samples of Mexican Women. *Intervirology*, 50, 402–407. <http://doi.org/10.1159/000110652>
- Zhang, R., Zhang, F., Wang, C., Wang, S., Shiao, Y.-H., & Guo, Z. (2010). Identification of sequence polymorphism in the D-Loop region of mitochondrial DNA as a risk factor for hepatocellular carcinoma with distinct etiology. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research : CR*, 29, 130. <http://doi.org/10.1186/1756-9966-29-130>