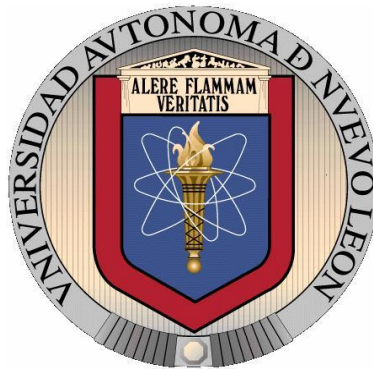




UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

SUBDIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO



CARACTERIZACIÓN DEL GENOMA DEL VIRUS “like-MMTV” INTEGRADO EN LA LÍNEA CELULAR DE ADENOCARCINOMA PULMONAR HUMANO “INER-51” Y ANÁLISIS DE SU EXPRESIÓN.

Por

Q.B.P. KARLA SELENE MORÁN SANTIBÁÑEZ

Como requisito para obtener el grado de **MAESTRO EN CIENCIAS**
con acentuación en Microbiología.

SAN NICOLÁS DE LOS GARZA, N. L. JULIO 2012



**CARACTERIZACIÓN DEL GENOMA DEL VIRUS “like-MMTV” INTEGRADO
EN LA LÍNEA CELULAR DE ADENOCARCINOMA PULMONAR HUMANO
“INER-51” Y ANÁLISIS DE SU EXPRESIÓN.**

Comité de Tesis

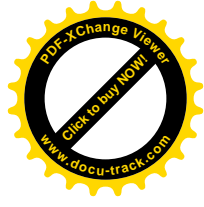
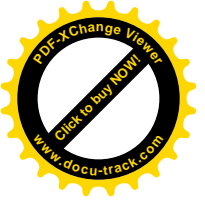
DIRECTOR
Dra. Laura Trejo Ávila

SECRETARIO
Dr. Pablo Zapata Benavides

VOCAL1
Dra. Lydia Guadalupe Rivera Morales

VOCAL 2
Dr. Juan Francisco Contreras Cordero

VOCAL 3
Dr. Edgar Mendoza Gamboa



DEDICATORIA

A mi familia, por ser mi principal motivo de superación. A mi mami linda por ser mi modelo a seguir, por toda su lucha, entrega y amor. A mi padre por su apoyo, motivación y estar siempre al pendiente de mi desarrollo profesional A mis hermanos Carlos y Diana por su amor, alegría y entusiasmo, gracias a ustedes por ser mi motor y mi fuerza.

A mis abuelos, tíos y primos y muy en especial a mi segunda familia, mi madrina Rosy, mi tío Tomás y mis primos Ricky, Rolis y Javier por su apoyo, cariño y siempre estar al pendiente de mi desarrollo personal y profesional

A Ricky por todo su amor y sus consejos, por darle color a mis días, apoyarme y ayudarme en todo momento, gracias por hacer esto posible, por tu paciencia y cariño, ¡muchas gracias amor!

A mi amiguita Lety, a mis amigos Conchi, Abraham, Ab, Hugo, Kiki, Ceci, Cocolite por tantos años de amistad y por todo su apoyo. A mis amigos Karen, Carlos, Raúl y Emmanuel por su amistad tan valiosa a pesar de la distancia.

A mis perritos, Pelusito (+), Lennon, Blanquita y Lluvia.

Este trabajo es por ustedes y gracias a ustedes, porque fueron parte importante de esto y porque han sido parte importante en mi vida.



AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico para la realización de mis estudios. A la Subdirección de Posgrado de la Facultad de Ciencias Biológicas por permitirme formar parte de su matrícula.

A la Dra. Laura Trejo Ávila, encargada de la Unidad de Virología y Cáncer, por aceptarme en su laboratorio, guiarme en el camino de la ciencia y transmitirme sus conocimientos, pero sobre todo por confiar en mí, muchas gracias Doctora por todos su apoyo y sus consejos.

Al Dr. Pablo Zapata, por aceptarme como parte de su laboratorio, por resolver todas mis dudas, transmitirme sus conocimientos, consejos, por todo su apoyo en este trabajo de tesis y por regalarme su amistad.

A la Dra. Lidia Rivera, al Dr. Juan Francisco Contreras y al Dr. Edgar Mendoza Gamboa por ser parte de mi comité de tesis; gracias por su ayuda, apoyo y amabilidad.

A mis compañeros del L7, Regina, Karlita, Thalya, Juanito, Rodrigo y Bernardo por crear un buen ambiente de trabajo y por regalarme su amistad, pero sobre todo a Edgar Fernández por toda su ayuda en los experimentos y por su amistad incondicional.

A mis compañeros del L5, Chago, mi amiguita Kary, Liz, Ash, Fer, León, por su amistad y apoyo y muy en especial a Edgar Manilla por darme “el apoyo” y considerarme siempre.

A mis compañeros del LIV Luigi, JJ, Beto, Cynthia, Emmanuel, Luis Fernando, Teo, Cristel, Josué, David, Manuel, Víctor por su apoyo y amistad.

A mis compañeros de posgrado, Ruly, Cindy, Aralia, Rosy, Claudia, Manuel, Roger, Wendy, Hugo, Carlitos, Alex y Allen por crear un buen ambiente de clases y por su amistad.

¡A todos ustedes muchas gracias!



INDICE DE FIGURAS

Fig.		Pág.
1	Genoma de un retrovirus	9
2	Transcripción y procesamiento del RNA retroviral.	12
3	Mecanismo de oncogénesis retroviral: Mutagénesis insercional.	16
4	Mecanismo de oncogénesis retroviral relacionado a Env.	18
5	Estructura del virus de tumor mamario murino MMTV	19
6	Mapa genético del virus de tumor mamario murino MMTV	20
7	Ciclo de replicación de un retrovirus (MMTV)	22
8	Rol del superantígeno en el ciclo de infección de MMTV	24
9	Análisis filogenético de las secuencias reguladoras LTR encontradas en madre, padre e hija	28
10	Análisis filogenético de secuencias LTR de pacientes con linfoma no-Hodgkin	29
11	Mapa mundial que demuestra la comparación entre el hábitat natural de las especies de ratón	31
12	Análisis filogenético de las secuencias env encontradas en ratón (HeJ) , humano(AF228551.1, AY52722.1, AF243039, HBC, HBY), gato(CMGT, Cat1 y Cat2), perro(DMGT y DBT) y HERVK10 (M14123) como raíz del árbol.	32
13	Diseño experimental	37
14	PCR <i>in silico</i> utilizando los primer G3PDHF y G3PDHR	41
Fig.		Pág.



16	PCR in silico para amplificar fragmentos de MMTV. Datos proporcionados utilizando el programa Amplifx, los círculos de color en los datos corresponden al color del fragmento amplificado.	43
17	Escalera de marcador de pares 100pb (a) y 1Kb (b) en un gel de agarosa al 1%.	45
18	Tratamientos con Polybrene y DMSO a células INER-51 para la estimulación de transcritos.	47
19	Productos de PCR de la línea celular INER-51 utilizando <i>primers</i> específicos para G3PDH.	52
20	Productos de PCR de la línea celular INER-51 utilizando los <i>primers</i> para MMTV “LTR5” y “GAG3”	52
21	A) Productos de PCR de la línea celular INER-51 utilizando los <i>primers</i> para MMTV “G378F” y “G1467R”	53
22	Productos de PCR de la línea celular INER-51 utilizando los <i>primers</i> para MMTV “KM4” y “POLJR”.	53
23	Productos de PCR de la línea celular INER-51 utilizando los <i>primers</i> para MMTV “POL5” y “POL2”.	54
24	Productos de PCR de la línea celular INER-51 utilizando los <i>primers</i> para MMTV “POL6” y “ENV5R”.	54
25	Productos de PCR de la línea celular INER-51 utilizando los <i>primers</i> para MMTV “POL3NR” y “EPR”.	55
26	Productos de PCR de la línea celular INER-51 utilizando los <i>primers</i> para MMTV “2N” y “LTR3”.	55
27	Productos de la PCR semianidada del producto de <i>ENV/LTR’-LTR3</i> , utilizando los <i>primers</i> “LTR5” y “LTR3”.	56



Fig.		Pág.
28	Comparación de la secuencia del provirus de MMTV en la línea INER-51 con la secuencia de MMTV	57
29	Resultados del alineamiento múltiple por BLAST de toda la región viral.	64
30	Porcentaje de identidad por región.	64
31	Alineamiento múltiple por MUSCLE de la región génica <i>env</i>	66
32	Análisis filogenético que muestra la relación de las secuencias <i>env</i>	68
33	Alineamiento múltiple por MUSCLE de la región reguladora <i>LTR</i>	69
34	Análisis filogenético que muestra la relación de las secuencias <i>LTR</i>	70



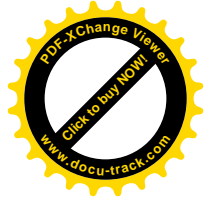
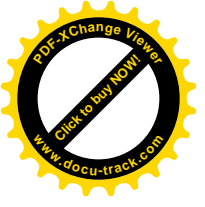
INDICE DE TABLAS

Tabla		Pág.
1	Clasificación de retrovirus.	10
2	Oncogenes celulares activados por mutagénesis insercional	15
3	Presencia de MMTV en cáncer de mama	26
4	Condiciones para una PCR convencional	40
5	Programa para amplificación del fragmento G3PDH.	40
6	Primers para detección de secuencias de MMTV	42
7	Programa para amplificación de los fragmentos de MMTV.	44
8	Temperatura de alineamiento de los pares de primers para la amplificación de los fragmentos de MMTV.	44
9	Condiciones para una PCR de alta fidelidad utilizando Platinum®PCR Super Mix.	45



RESUMEN

El cáncer de pulmón es la primer causa de muerte por tumores malignos en México, esta enfermedad puede ser causada por una gran variedad de factores, dentro de estos factores se pueden ubicar el tabaquismo, factores ambientales, nutricionales, genéticos y otros factores biológicos, entre ellos los virus. El Virus del Tumor Mamario Murino (MMTV) es un betaretrovirus que se trasmite en los ratones por leche materna y línea germinal provocando cáncer de mama en ratones aunque también se ha encontrado asociado con linfoma de timo y adenocarcinoma de riñón en ratón. Recientemente se ha asociado el MMTV con patologías humanas, como el cáncer de mama, linfoma y cirrosis hepática. Nuestro grupo encontró secuencias con una homología del 98 al 99% con MMTV, en muestras de cáncer mamario de pacientes mexicanas, en una línea celular proveniente de cáncer primario de pulmón (INER-51) y en muestras de cáncer primario pulmonar. En el presente trabajo se realizó una caracterización molecular del MMTV en la línea celular de pulmón INER-51 por medio de secuenciación del genoma y comparación con la secuencia reportada para el virus en el GenBank; así como también se realizó el análisis de su expresión y un análisis filogenético de secuencias específicas “env” y “LTR” Este estudio confirma la presencia de un provirus like-MMTV completo insertado en células de cáncer pulmonar asociado a los provirus aislados de tumores mamarios humanos y de ratón según el análisis filogenético de su región génica *env*; pero con variaciones significativas al comparar la secuencia de su región reguladora con las secuencias reguladoras de los provirus aislados a partir de cáncer de mama humano, linfoma no-Hodgkin y cáncer de mama murino.



ABSTRACT

Lung cancer is the leading cause of death from malignant tumors in Mexico, this disease can be caused by a variety of factors, among these factors may place smoking, environmental factors, nutritional, genetic and other biological factors, between these the viruses. Mouse Mammary Tumor Virus (MMTV) is a betaretrovirus transmitted in mice by germline breast milk, causing breast cancer in mice but has also been found associated with thymic lymphoma and adenocarcinoma of mouse kidney. MMTV has recently been associated with human pathologies, such as breast cancer, lymphoma and liver cirrhosis. Our group found sequences with homology of 98 to 99% with MMTV in breast cancer samples of Mexican patients, in a cell line derived from primary lung cancer (INER-51) and primary lung cancer samples. This work was carried out molecular characterization of MMTV in the lung cancer cell line INER-51 by genome sequencing and comparison with the sequence reported for the virus in GenBank, and also performed the analysis of their expression and phylogenetic analysis of specific sequences "env" and "LTR". This study confirms the presence of a complete MMTV provirus-like inserted in lung cancer cells associated with mammary tumors provirus isolated from human and mouse by phylogenetic analysis of *env* gene region, but with significant variations by comparing the sequence of their regulatory region with regulatory sequences of the provirus isolated from human breast cancer, non-Hodgkin's lymphoma and murine breast cancer.

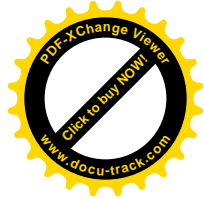
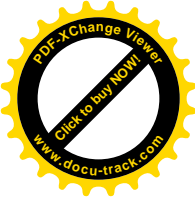


TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
DEDICATORIA	IV
AGRADECIMIENTOS	V
LISTA DE FIGURAS	VI
LISTA DE TABLAS	IX
RESUMEN	X
ABSTRACT	XI
1. INTRODUCCIÓN	1
2. JUSTIFICACIÓN	2
3. ANTECEDENTES	3
3.1 Generalidades del cáncer.....	3
3.2 Cáncer de pulmón.....	3
3.3 Epidemiología.....	4
3.4 Factores de riesgo.....	5
3.5 Virus y cáncer.....	6
3.6 Retrovirus.....	8
3.6.1 Oncornavirus.....	10
3.6.2 Replicación.....	10
3.7 Oncogénesis viral.....	13
3.8 Retrovirus endógenos.....	18
3.9 Virus de tumor mamario murino.....	19
3.9.1 MMTV en ratón.....	22
3.9.2 MMTV en humanos.....	25
3.9.3 Factores de riesgo asociados a la oncogénesis por MMTV en humanos.....	30
3.10 Virus y cáncer de pulmón.....	33
3.10.1 MMTV y cáncer de pulmón.....	33
4. HIPÓTESIS	34
5. OBJETIVOS	35
5.1 Objetivo general.....	35
5.2 Objetivos particulares.....	36
6. MÉTODOS	37
6.1 Diseño experimental.....	37
6.2 Cultivo celular INER-51.....	38
6.3 Extracción de DNA.....	38
6.4 Cuantificación de DNA genómico.....	39
6.5 PCR para gen constitutivo G3PDH.....	39



6.6. PCR para detección de secuencias MMTV.....	41
6.7 Electroforesis.....	45
6.8 Purificación del fragmento.....	46
6.9 Comparación de la secuencia de los fragmentos purificados con la secuencia de MMTV.....	46
6.10 Estimulación de transcritos con Polybrene y DMSO.....	47
6.11 Extracción de RNA.....	48
6.12 Cuantificación de RNA.....	49
6.13 Tratamiento con DNAsa libre de RNAsa.....	49
6.14 Síntesis de cDNA.....	49
6.15 Búsqueda de transcritos.....	50
6.16 Análisis filogenético para la región génica <i>env</i>	50
6.17 Análisis filogenético para la región reguladora LTR.....	51
7. RESULTADOS.....	52
7.1 Amplificación de G3PDH en la línea celular INER-51.....	52
7.2 Amplificación de regiones génicas y reguladoras de MMTV en la línea celular INER51.....	52
7.3 Comparación de las secuencias obtenidas del provirus con la secuencia reportada para MMTV en el Genbank.....	56
7.4 Análisis de la expresión del RNA genómico viral.....	64
7.5 Análisis filogenético para la región génica <i>env</i>	65
7.6 Análisis filogenético para la región reguladora LTR.....	68
8. DISCUSIÓN.....	71
9. CONCLUSIONES.....	75
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76



INTRODUCCIÓN

Con 10,9 millones de casos nuevos y 6,7 millones de muertes al año, el cáncer es una enfermedad devastadora, siendo una inmensa carga para las personas afectadas y sus familias (Parkin *et al*, 2005).

El desarrollo de tratamientos y estrategias de prevención para esta enfermedad depende fundamentalmente de la comprensión de las células cancerosas y de los mecanismos por los cuales se produce; dicho mecanismo es llamado carcinogénesis y representa un complejo proceso de múltiples pasos (Zur Hausen, 2002).

Durante los últimos 30 años se ha observado el importante papel que juegan varios virus en el desarrollo de algunos tumores humanos, de hecho, aproximadamente del 15% al 20% de los cánceres se asocian con infecciones virales (Parkin *et al*, 2006).

El virus del tumor mamario murino (MMTV), un retrovirus causante de cáncer de mama en ratones se ha asociado con cáncer de mama en humanos (Wang *et al*, 1995), varias líneas de investigación se han enfocado en el estudio de MMTV con el objetivo de conocer la prevalencia, la vía de transmisión y de entender el proceso de carcinogénesis en el tejido mamario humano (Amarante *et al*, 2009).

Recientemente nuestro grupo observó la presencia de secuencias específicas de la región *env* de MMTV en una línea celular proveniente de cáncer de pulmón en humanos “INER-51” (Zapata-Benavides *et al.*, 2007), y en 3/18 pacientes con: adenocarcinoma primario, carcinoma broncogénico e infiltrado inflamatorio agudo de pulmón (Trejo-Ávila *et al.*, 2011), así como también la presencia de regiones reguladoras del virus “*LTR*” en las muestras mencionadas anteriormente. En base a estos hechos, el presente estudio pretende reunir más evidencias que diluciden el rol que juega MMTV en el proceso de carcinogénesis pulmonar, caracterizando el genoma completo del virus integrado en INER-51, analizando su expresión, así como también realizando un análisis filogenético de la región génica *env* y la región reguladora *LTR* del virus integrado en INER-51 y en las muestras de patología pulmonar.



JUSTIFICACIÓN

La creciente incidencia del cáncer asociado a factores químicos, físicos y biológicos, ha colocado a esta enfermedad como una de las más comunes desde mediados del siglo pasado. Aproximadamente el 85% -90% de las muertes por cáncer de pulmón en los Estados Unidos son causados por el tabaquismo activo, el restante 10% a 15% representan entre 17 000 y 26 000 muertes al año; este porcentaje asociado a “no fumadores” es de gran importancia, sin embargo, pocas líneas de investigación se han enfocado en la búsqueda de las posibles causas de estos carcinomas.

Se calcula que un 15% a 20% de todos los cánceres humanos tienen un origen viral, entre los cuales se encuentra el virus like-MMTV o HMTV. El virus like-MMTV se ha asociado a cáncer mamario en humanos, nuestro grupo de trabajo en un estudio encontró secuencias que indican la presencia del virus en el 5% de 160 biopsias de cáncer mamario de la región noreste del país, y recientemente encontró la presencia de secuencias específicas de MMTV en muestras de pacientes con patologías pulmonares y en una línea celular procedente de cáncer pulmonar primario “INER-51”, por lo que un virus like-MMTV podría también ser un factor importante en la etiología de este tipo de cáncer.

En este trabajo se analizó la secuencia y expresión del provirus *like-MMTV* que se encuentra insertado en el genoma de la línea celular “INER-51”, así como también se realizó un análisis filogenético de secuencias génicas (*env*) y reguladoras (*LTR*) del virus, encontradas en “INER-51” y en las muestras de pulmón con el provirus, con el objetivo de intensificar la investigación en esta línea, que tiene como finalidad contribuir en la elucidación de la asociación del virus like-MMTV con patologías en el hombre, específicamente con el cáncer de pulmón.



ANTECEDENTES

3.1 Generalidades del cáncer

El cáncer es un crecimiento anormal de células causado por múltiples cambios en la expresión de genes que desequilibran la proliferación y muerte celular desarrollando una población de células que puede invadir tejidos y dar metástasis en sitios distantes (Ruddon, 2007).

Las células normales se transforman en células tumorales por las modificaciones genéticas que resultan de mutaciones en genes específicos: los oncogenes y el silenciamiento de los genes supresores o por el reordenamiento de los cromosomas (Dingli *et al.*, 2006).

En los últimos años se ha intensificado el estudio de esta enfermedad debido a la creciente mortalidad que ha presentado en diversos países, con el fin de conocer a fondo las causas que lo desencadenan y desarrollar u optimizar tratamientos.

3.2 Cáncer de pulmón

Los carcinomas de pulmón son el resultado de la acumulación gradual de anomalías genéticas y epigenéticas, que transforman el epitelio bronquial benigno en tejido neoplásico (Kumar *et al.*, 2005).

Los cuatro principales tipos histológicos de cáncer pulmonar son:

- Carcinoma de células escamosas (30% a 40% de los cánceres de pulmón)
- Adenocarcinoma (25% a 30%)
- Carcinoma de células no pequeñas (menos de 10%), y
- Carcinoma de células pequeñas (15% a 20%).

Los cánceres de pulmón se pueden clasificar de acuerdo a una variedad de criterios. Histológicamente se hace una distinción entre el carcinoma de pulmón de células pequeñas y carcinoma de células no pequeñas, debido a las diferencias en su comportamiento biológico y las implicaciones de estas diferencias en el tratamiento y el



pronóstico. Más del 30% de los cánceres de pulmón tienen elementos de una variedad de tipos histológicos (Brambilla *et al*, 2009).

El cáncer de pulmón de células no pequeñas (broncogénico). Lesión de mayor frecuencia, crece y se disemina con lentitud. Existen tres subtipos: carcinoma de células escamosas (también llamado carcinoma epidermoide), adenocarcinoma y carcinoma de células grandes.

El cáncer de pulmón de células pequeñas (microcítico). También llamado cáncer de células en avena, crece con mayor rapidez y se disemina fácilmente a otros órganos del cuerpo (Rivera RM *et Salazar M.* 2002; National Cancer Institute, 2002).

3.3 Epidemiología

Los tumores malignos representan aproximadamente 13% de las defunciones mundiales, 7.9 millones de muertes por año, de las cuales más del 72% se registran en países de ingresos bajos y medios. La Organización Mundial de la Salud (OMS) prevé que entre 2007 y 2030, aumentará 45% la mortalidad por cáncer a nivel mundial, pues estima que pasara de 7.9 a 11.5 millones de defunciones por año, resultado del crecimiento demográfico y el envejecimiento de la población; además, estima que durante el mismo periodo, el número de casos nuevos de cáncer aumentará de 11.3 a 15.5 millones (OMS, 2011).

En nuestro país, la tasa de defunción por tumores tiende a aumentar. De 1998 a 2008, la tasa de mortalidad por cáncer se incrementó, pasando de 57.7 a 66.6 por cada 100 mil habitantes; entre las mujeres, el crecimiento fue de 59.6 a 66.7 por cada 100 mil habitantes, mientras que entre los hombres, de 55.6 a 66.5 cada 100 mil habitantes. En 2008, según la tasa de mortalidad observada de tumores malignos para la población de 60 años y más, los tumores en tráquea, bronquios y pulmón presentan la tasa más alta (60.19 por cada 100 mil habitantes), seguidos por los tumores de hígado y de las vías biliares intrahepáticas, y los de estómago (44.11 y 42.30 por cada 100 mil habitantes, respectivamente). Finalmente, de acuerdo con las defunciones por tumores malignos en 2008, entre los hombres, el mayor porcentaje de lesiones malignas fue en la próstata (8.1%), seguido por los tumores de tráquea, bronquios y pulmón (7.0%), enfermedad



asociada al consumo de tabaco; y entre las mujeres, el cáncer de mama (7.6%), seguido por los tumores malignos de ovarios (6.4 por ciento). (INEGI 2009).

Estos datos señalan la importancia del cáncer de pulmón como problema de salud pública en nuestro país.

3.4 Factores de riesgo

La teoría monoclonal del cáncer nos dice que comienza en una célula. La transformación de una célula normal en una tumoral es un proceso que abarca varias fases y suele consistir en una progresión de una lesión precancerosa a un tumor maligno. Esas modificaciones son resultado de la interacción entre los factores genéticos de una persona y tres categorías de agentes exteriores.

- carcinógenos físicos, como la luz ultravioleta y la radiación ionizante;
- carcinógenos químicos, como el asbesto y el humo del tabaco, y
- carcinógenos biológicos, como las infecciones causadas por determinados virus, bacterias o parásitos.

El consumo de tabaco, el consumo de alcohol, la ingesta insuficiente de frutas y hortalizas, las infecciones por virus de la hepatitis B, de la hepatitis C y por virus del papiloma humano son los principales factores de riesgo de cáncer en los países de ingresos bajos y medianos.

En los países de ingresos elevados, el consumo de tabaco y alcohol, el exceso de peso y la obesidad son causas muy importantes de cáncer.

Clásicamente se consideraba la edad, el sexo, la etnia y el tabaquismo como grandes factores predictivos del cáncer pulmonar. En la actualidad es conocida la relación entre el cáncer de pulmón y el hábito de fumar, especialmente en los tipos microcítico y escamoso. El riesgo de desarrollar cáncer de pulmón es unas 10 veces mayor en los fumadores de cigarrillo con respecto a los no fumadores, encontrándose en relación directa con la duración y cantidad de cigarrillos consumidos (OMS, 2009) (Abritta, 2000).



Aproximadamente el 85% -90% de las muertes por cáncer de pulmón en los Estados Unidos son causados por el tabaquismo activo. El restante 10% a 15% representa entre 17 000 y 26 000 muertes al año, una cifra que se ubicaría entre el 6º y el 8º lugar de mortalidad de cáncer más común en los Estados Unidos, si se considera como una categoría separada; siendo el adenocarcinoma el tipo de cáncer de pulmón más común asociado a “no fumadores” (Jemal *et al.*, 2005) (Sun *et al.*, 2007).

Se estima que los hombres no fumadores tienen mayores tasas de mortalidad por cáncer de pulmón que las mujeres que nunca fumaron, en promedio, la tasa de mortalidad estandarizada por edad por cáncer de pulmón es de aproximadamente 25% mayor en hombres que en mujeres que nunca han fumado. La diferencia por sexo se debe en parte a una mayor frecuencia de los errores de diagnóstico para las mujeres que para los hombres (Risch *et al.*, 2004).

Las causas conocidas de cáncer de pulmón que no se relacionan con el hábito de fumar son el humo de segunda mano, el tabaquismo activo de otros productos de tabaco y la exposición a otros carcinógenos como el asbesto, el radón, la terapia de radiación, entre otras (Thun *et al.*, 2006). Se considera que los agentes infecciosos desempeñan un papel vital en el desarrollo del cáncer. La mayoría de los cánceres comunes en todo el mundo se cree que son debido a infecciones virales, sin embargo, el papel de las infecciones virales en el proceso de carcinogénesis es una cuestión de intenso debate y controversia (McNally *et al.*, 2004).

Desde 1990, el número de publicaciones científicas que se relacionan con cáncer a infecciones virales, bacterianas, parasitarias, y de protozoarios ha aumentado significativamente (Braoudaki *et al.*, 2011).

3.5 Virus y cáncer

Las propiedades oncogénicas de numerosos virus han sido bien documentadas tanto en animales como en humanos. La primera evidencia de un virus oncogénico presente en humanos que fue documentada se encuentra relacionada con el virus de Epstein-Barr (EBV) agente causal del Linfoma de Burkitt. Entre otros virus oncogénicos se encuentran el virus del papiloma humano (HPV) agente causal



importante del cáncer cérvico uterino, y el virus de la hepatitis B y C que se han relacionado con carcinoma hepático (McLaughlin *et* Munger, 2008).

Quizás uno de los reportes más antiguos sobre la posible asociación de retrovirus y enfermedades crónicas y/o cáncer en animales domésticos provengan desde fines del siglo XIX, cuando los virus se clasificaron como pequeños agentes infecciosos que, a diferencia de las células y las bacterias, pasan a través de filtros de poro fino. Se observó que los ovinos domésticos al ser introducidos al África del Sur mostraron una gran susceptibilidad a padecer infecciones crónicas asociadas principalmente con síndromes respiratorios. En estas descripciones, registradas en correspondencia oficial de los inmigrantes europeos, utilizan "enfermedad del jaagsiekte" término africano para describir fatiga y dificultad respiratoria en animales sometidos a grandes caminatas (Tustin, 1969).

Posteriormente, en 1911, Peyton Rous demuestra una asociación entre el cáncer y los virus, demostrando que los extractos de filtrados de células tumorales podrían ser utilizados para propagar los tumores en los pollos. Poco después, sin embargo, el estudio del virus del sarcoma de Rous (RSV) se suspendió y el interés para explicar el proceso de carcinogénesis fue desplazado a factores físicos y químicos.

En 1933, Richard Shope y E. Weston Hurst informó que un virus causaba verrugas en la piel de conejos cola de algodón. La naturaleza tumorigénica de la enfermedad, ahora se entiende que es inducida por el virus del papiloma de conejo de rabo blanco; esto se confirmó posteriormente en colaboración con Peyton Rous. (McLaughlin *et* Munger, 2008).

Hasta la fecha, más de 100 tipos de virus del papiloma humano (VPH) se han identificado, varios etiológicamente relacionados con el cáncer humano. El importante papel de los virus en el cáncer fue reconocido, finalmente, en la segunda mitad del siglo

pasado después de que varios virus tumorales de roedores, como es el caso de MMTV fueron descubiertos. En 1966 el Premio Nobel fue otorgado a Rous, en reconocimiento al descubrimiento de que los virus pueden inducir tumores (Javier *et* al., 2008).



En la actualidad, seis virus humanos han sido clasificados por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) como "cancerígeno para los seres humanos" (Grupo 1): virus de Epstein Barr (VEB), virus de la hepatitis B (VHB), el VPH de varios tipos, el virus linfotrópico humano 1 (HTLV-1), virus de la hepatitis C (VHC), y el sarcoma de Kaposi asociado a virus del herpes (HVSK), también conocido como virus del herpes humano 8 (HHV- 8) (Bouvard *et al.*, 2009).

Los recientes avances en tecnologías moleculares han llevado al descubrimiento de un nuevo virus de la supuesta cáncer humano, poliomavirus de células de Merkel (MCPyV), aunque es necesaria más evidencia para establecer su carcinogenicidad. (Feng *et al.*, 2008).

Dado que los virus que causan cáncer en humanos producen tumores en las personas infectadas sólo en raras ocasiones, la acumulación de evidencia suficiente para establecer una asociación causal entre cualquier virus y el cáncer es un desafío. Por lo tanto, es probable que la carga de virus relacionados con cáncer se subestima, investigaciones futuras revelarán nuevas asociaciones entre los virus ya conocidos y el cáncer humano y / o virus nuevos de cáncer (Martel *et al.*, 2009).

Los virus oncogénicos u oncovirus se pueden clasificar según su ácido nucléico, en dos grupos. En el primer grupo se encuentran los virus con DNA, entre los que se incluyen miembros de las familias *Poxvirus*, *Herpesvirus*, *Adenovirus*, *Papovavirus* y *Hepadnavirus*. En el segundo grupo se encontrarían los *Retrovirus* que poseen RNA como material genético. Entre los cuales se encuentran el HTLV-1 causante de la leucemia de linfocitos T en humanos. Otro virus con RNA asociado a cáncer es el virus de la Hepatitis C (McLaughlin *et al.* Munger, 2008).

3.6 Retrovirus

Son virus de RNA de polaridad positiva, aproximadamente esféricos, dotados de envoltura y con un diámetro comprendido entre 80 y 120 nm. La envoltura contiene glucoproteínas víricas y se adquiere por gemación a través de la membrana plasmática. En 1970, Baltimore y Temin demostraron que los retrovirus codificaban una polimerasa de ácido desoxirribonucleico dependiente de RNA (transcriptasa reversa) y se replicaban mediante un intermediario de DNA (Murray *et al.* Pfaller, 2006).



El genoma de los retrovirus contiene dos copias de RNA monocatenario de polaridad positiva. El extremo 5´ del RNA presenta cap y el extremo 3´ esta poliadenilado (Haynes *et Palker*, 1997).

Todos los retrovirus contienen las siguientes regiones génicas virales: (**Figura 1**)

- *gag*: que codifica proteínas estructurales internas.
- *pol*: que codifica la transcriptasa inversa, la proteasa y la integrasa.
- *env*: que codifica las proteínas de la envoltura (Murray *et Pfaller*, 2006).

A los costados de estas regiones se presentan unas secuencias genéticas características denominadas secuencias terminales repetidas largas (long terminal repeat, *LTR*) que median la integración del ácido nucleico viral en los cromosomas de las células huésped. Además, regulan la transcripción de los genes de los retrovirus y, de este modo, influyen en su virulencia (Soriano, 2003).

Existen retrovirus complejos, los cuales además de poseer las regiones génicas virales anteriormente mencionadas, poseen regiones que codifican para varias proteínas potenciadoras de la virulencia que requieren un proceso de transcripción más complejo que los retrovirus simples; tal es el caso del HTLV-1 y de los lentivirus (Murray y Pfaller, 2006).



Fig. 1. Genoma de un retrovirus

Esta familia viral ha sido dividida en tres subfamilias: *Oncornavirinae*, donde todos ellos son virus oncogénicos, que producen leucemias, linfomas, carcinomas y/o sarcomas; la segunda, *Lentivirinae*, comprende el grupo de los virus Visna, VIH, Virus de la inmunodeficiencia bovina y del simio, entre otros; y la tercera, *Spumavirinae*, comprende los virus “espumantes” los cuales se encuentran en cultivo de células de riñón que degeneran de forma espontánea y que provocan la formación de células gigantes vacuoladas y multinucleadas, con un aspecto muy característico, en este grupo se encuentran los virus espumantes humanos (HFV) y virus espumante del simio SFV (**Tabla 1**) (Senra *et al.*, 2002).



Tabla 1. Clasificación de retrovirus.

Género	Especie
Alfaretrovirus	Virus de la leucocis y sarcoma aviar, virus del sarcoma de Rous.
Betaretrovirus	Virus de tumor mamario murino
Gammaretrovirus	Virus de la leucemia murina, virus de la leucemia felina
Deltaretrovirus	Virus linfotrópico humano, virus de la leucemia bovina
Epsilonretrovirus	Virus del sarcoma dermal de Walleye
Lentivirus	Virus de inmunodeficiencia humana, virus de inmunodeficiencia del simio, virus de inmunodeficiencia del felino
Espumavirus	Virus espumoso del bovino, virus espumoso del simio

Infect Dev Ctries 2011; 5(11):751-758

3.6.1 Oncornavirus

El aislamiento del oncornavirus linfotrópico de las células T humanas (HTLV-1) a partir de un individuo adulto con leucemia de linfocitos T constituyó el primer retrovirus aislado y relacionado con una enfermedad en el ser humano (Murray *et Pfaller*, 2006).

Los oncornavirus se clasifican según la morfología de su centro vírico y su cápside como de tipo A que son formas intracitoplasmáticas inmaduras que salen por gemación a través de la membrana plasmática para dar lugar a partículas maduras de tipo B, C y D; B con nucleocápside excéntrica dentro de un virión maduro (MMTV), C con nucleocápside central dentro de un virión maduro (HTLV-1) o D con nucleocápside de forma cilíndrica (Virus del mono Mason-Pfizer) (Murray *et Pfaller*, 2006).

3.6.2 Replicación

La replicación de los retrovirus es iniciada por la unión de las espículas a proteínas receptoras específicas de la superficie celular. La presencia de receptores para el virus es el determinante inicial del tropismo para tejidos y huéspedes concretos (Haynes *et Palker*, 1997).



El proceso global de replicación del virus se puede resumir en los siguientes pasos:

Penetración en la célula blanco: El ciclo de replicación inicia cuando el virión penetra a la célula por medio de la interacción de sus glicoproteínas con receptores específicos de la célula, una vez hecho el contacto con el receptor, se induce una endocitosis y es llevado hacia el compartimiento endosomal ácido, en donde ocurre un cambio conformacional en las proteínas de envoltura, permitiendo que las membranas vírica y celular se fusionen, lo que trae como resultado la liberación de la cápside vírica al citoplasma de la célula (Buchschacher, 2003).

Retrotranscripción. La retrotranscriptasa viral sintetizará DNA utilizando el RNA del virus como base, un tRNA celular es utilizado como primer, el cual se incorporará al sitio de unión (primer binding site pbs) localizado en el extremo *LTR* 5' del virus. La actividad RNAasa H de la transcriptasa reversa degrada la hebra de RNA y casi simultáneamente emplea la del cDNA como molde para sintetizar una segunda hebra de DNA, convirtiéndolo en bicatenario (Buchschacher, 2003).

Integración del DNA viral en los cromosomas celulares. La integración del DNA bicatenario en los cromosomas de la célula huésped es mediada por la Integrasa viral, el proceso se completa con la reparación del DNA mediado por enzimas celulares. Una vez integrado el provirus se mantiene en la célula como parte del genoma por un tiempo indefinido (Buchschacher, 2003).

Expresión. Los elementos que regulan la expresión viral se encuentran en las regiones *LTR*. La región U3 ubicada río arriba es la región reguladora de la transcripción que es iniciada por una RNA polimerasa de tipo II. La región U3, R y U5 ubicados río abajo contienen elementos reguladores del procesamiento post-transcripcional del extremo 3' (Coffin *et al.*, 1997).

Una parte del RNA viral se empaquetara en nuevos viriones y la otra puede traducirse directamente o sufrir procesos de splicing alternativo dando lugar a otros mensajeros (**Figura 2**) y por ende a otras proteínas, sin embargo la mayor parte del RNA que se traduce es aquel que no ha pasado por el proceso de splicing (Coffin *et al.*, 1997).

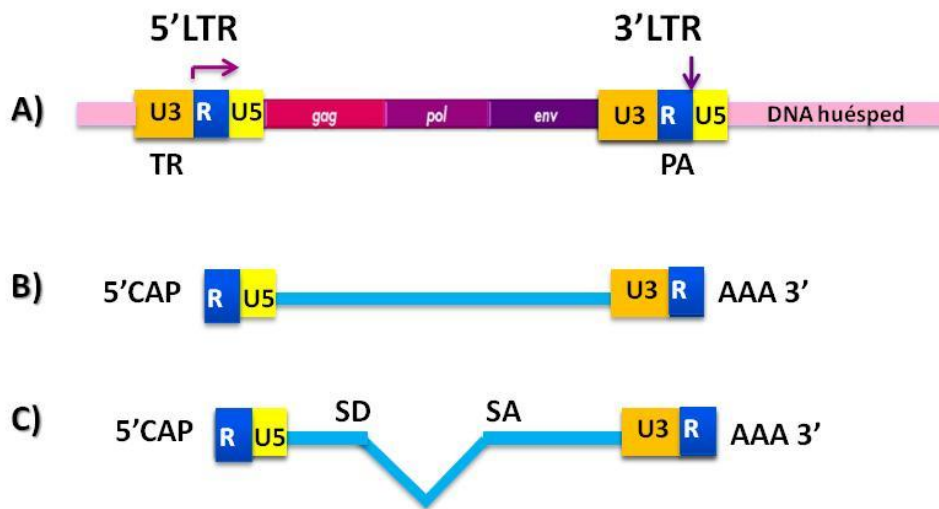


Fig2. Transcripción y procesamiento del RNA retroviral. A) Provirus con sus regiones *LTR* 5' y 3'. Las marcas de la flecha horizontal indican el punto de inicio de la transcripción. La flecha vertical indica el sitio final del procesamiento del extremo 3' y donde inicia la poliadenilación. B) Transcrito completo. C) Splicing. TR: Reguladores de la Transcripción, PA: Sitio de poliadenilación. SD Y SA. Sitio donador y aceptor de Splicing.

La traducción depende de los ribosomas, tRNAs y de los mecanismos de modificación postranscripcionales de la célula. El IRES (sitio interno de entrada al ribosoma) y el reconocimiento del CAP permiten el inicio de la síntesis proteica. Los transcritos completos sirven como mRNAs para la síntesis de las proteínas Gag y Gag-Pro-Pol. El RNA es traducido en poliproteínas las cuales se cortan por la acción de proteasas (Coffin *et al.*, 1997).

Las proteínas Gag de la mayoría de los retrovirus (así como sus proteínas Gag-Pol-Pro) sufren modificaciones postraduccionales, una de ellas es la adición del miristato en el extremo amino terminal; la adición de este ácido graso es requerida para la unión de *Gag* a la membrana plasmática (Coffin *et al.*, 1997).

Otra modificación postraduccional es la fosforilación de *Gag*; la relevancia de esta modificación ha sido difícil de determinar, en parte porque los productos de degradación de *Gag* que son fosforilados difieren de virus a virus (Coffin *et al.*, 1997).

La proteína Env es producida a partir de RNA que ha sufrido splicing y que ha eliminado las regiones *gag-pol-pro*. Env es sintetizada por la misma maquinaria utilizada por la célula para la síntesis de otras proteínas que son secretadas. Cuando la



región *env* se traduce se obtienen las proteínas SU y TM las cuales son glicosiladas, por lo que son conocidas como glicoproteínas (Coffin *et al.*, 1997).

Ensamblaje. Las proteínas de *gag* y *pol* se asocian con el RNA viral formando un “core” intracelular que en primera instancia se asemeja, en observaciones hechas ante el microscopio electrónico, a estructuras semicirculares que posteriormente terminan por cerrarse completamente, mientras que las proteínas de *env* se insertan en la membrana plasmática de la célula. El empaquetamiento del RNA viral es mediado por una región localizada al final del extremo *LTR*5' la cual se pierde en el proceso de splicing, asegurando que solo los transcritos completos se encapsiden y formen nuevos viriones (Buchschacher, 2003).

Gemación. Tras el ensamblaje, se produce la salida de la célula, durante la cual el virus adquiere la doble capa lipídica de su envoltura (Buchschacher, 2003).

3.7 Oncogénesis viral

Los retrovirus de la subfamilia Oncornavirinae pueden inducir el estado de transformación dentro de las células que infectan por tres mecanismos: transducción de oncogenes celulares; mutagénesis insercional; y transactivación por proteínas virales accesorias. Cuando un retrovirus infecta a una célula su genoma de RNA es convertido a DNA por la polimerasa codificada en el genoma viral, la polimerasa de DNA dependiente de RNA (transcriptasa reversa). El DNA entonces se integra en el genoma de la célula del huésped donde puede seguir siendo copiado mientras el genoma del huésped se duplica durante el proceso de la división celular. Contenidas en las secuencias de los extremos del genoma retroviral se encuentran secuencias promotoras poderosas de transcripción del DNA del virus llamadas repeticiones terminales largas (*LTRs*). Los *LTRs* promueven la transcripción del DNA viral que lleva a la producción de nuevas partículas del virus (Coffin *et al.*, 1997).

Transducción de oncogenes celulares: Con una cierta frecuencia los provirus se insertan río arriba de oncogenes celulares donde se pueden unir por medio de eliminaciones de las bases que los mantenían separados y dar lugar a transcritos que van



desde el extremo *LTR5'* del virus hasta el oncogén celular; este proceso se llama transducción (Maeda *et al.*, 2008).

El virus con este oncogén transducido ha perdido alguna(s) de las regiones virales necesarias para replicarse e infectar células sanas; sin embargo podrá ensamblarse gracias a la ayuda de un virus “helper” que le proporcionara todos los elementos necesarios para ser un virus infeccioso; este virus contendrá el híbrido de RNA producto de la transducción, confiriendo una ventaja de crecimiento a las células que infecte que dará como resultado final una proliferación celular sin restricción y generación de tumores (Butel, 2000).

Los genes transducidos son oncogenes, el gen celular normal en su forma no modificada, no-transducida es denominado proto-oncogén puesto que tiene la capacidad de transformar células si se altera de cierta manera o si se expresa de una manera incontrolada; el primero de ellos fue el *src* del virus sarcoma de Rous (RSV) (Butel, 2000).

La sobreexpresión y/o la expresión inapropiada de estos protooncogenes inducida por los retrovirus dan como resultado la formación de tumores en animales en cortos períodos de latencia (Butel, 2000).

Numerosos retrovirus animales con capacidades oncogénicas fueron aislados entre 1950 y 1960, principalmente de pollos y ratones. Todos los oncogenes cargados por estos retrovirus transformantes provinieron de un gen progenitor celular entre los que se encuentran quinasas proteicas (*abl, fes, fps, src, erbB, fms, kit*), factores de crecimiento (*sis*), factores de transcripción (*erbA, ets, fos, jun, myb, myc, rel*), proteínas adaptadoras (*ctk*), proteínas G (*H-ras, Kras*), entre otras. Hasta la fecha se han identificado más de 30 oncogenes transducidos en retrovirus transformantes (Butel, 2000).

Mutagénesis insercional: Muchos retrovirus que no poseen oncogenes virales pueden inducir tumores, por medio de un mecanismo conocido como mutagénesis insercional que se basa en la integración cercana del provirus a un proto-oncogén celular introduciendo un fuerte promotor y secuencias enhancers, lo que modificará la expresión de dichos genes (**Tabla 2**).



Tabla 2. Oncogenes celulares activados por mutagénesis insercional

Oncogen	Virus		Proteína
	Abreviación	Origen	
<i>Lck</i>	Mo-MLV	Ratón	Tirosina quinasa
<i>c-erbB</i>	RAV-1	Pollo	Factor de crecimiento epidermal
<i>Pim1</i>	Mo-MLV	Ratón	Quinasas de serina/treonina
<i>Fgf3/Int2</i>	MMTV	Ratón	Factor de crecimiento de fibroblastos
<i>Wnt1/Int1</i>	MMTV	Ratón	Glicoproteína secretada
<i>c-fos</i>	RAV-1	Pollo	Factor de transcripción
<i>c-myc</i>	Mo-MLV	Ratón	Factor de transcripción
<i>Fis1/CyclinD1</i>	Fr-MLV	Ratón	Ciclina G1

Un provirus integrado posee 2 regiones *LTR*, una a cada extremo, el extremo *LTR* 5' actúa como un promotor de la RNA polimerasa II, el *LTR* 3' no actúa normalmente como un promotor, aunque es exactamente igual al otro extremo, este último actúa en la terminación de la transcripción y poliadenilación. Cuando la integración del *LTR* 5' se interrumpe, el extremo *LTR* 3' puede actuar como promotor; siendo este hecho la base de este mecanismo de oncogénesis retroviral; así la transcripción del extremo *LTR* 5' interfiere con la función de *LTR* 3' de promotor-enhancer (Butel, 2000) (**Figura 3**).

Los provirus pueden aumentar la expresión génica por la influencia de las secuencias enhancer dentro de la región U3 del promotor del proto-oncogén. Los enhancers de los retrovirus pueden aumentar la expresión de proto-oncogenes incluso a grandes distancias.

Estos mecanismos de tumorigénesis proporcionan una explicación de la lenta tasa de génesis tumoral de los retrovirus no agudos en comparación con agudas retrovirus de transformación. Múltiples rondas de infección deben ocurrir en un animal infectado antes de que un provirus se inserte en las proximidades de un proto-oncogén celular en una configuración apropiada para la activación (Fan, 1997).

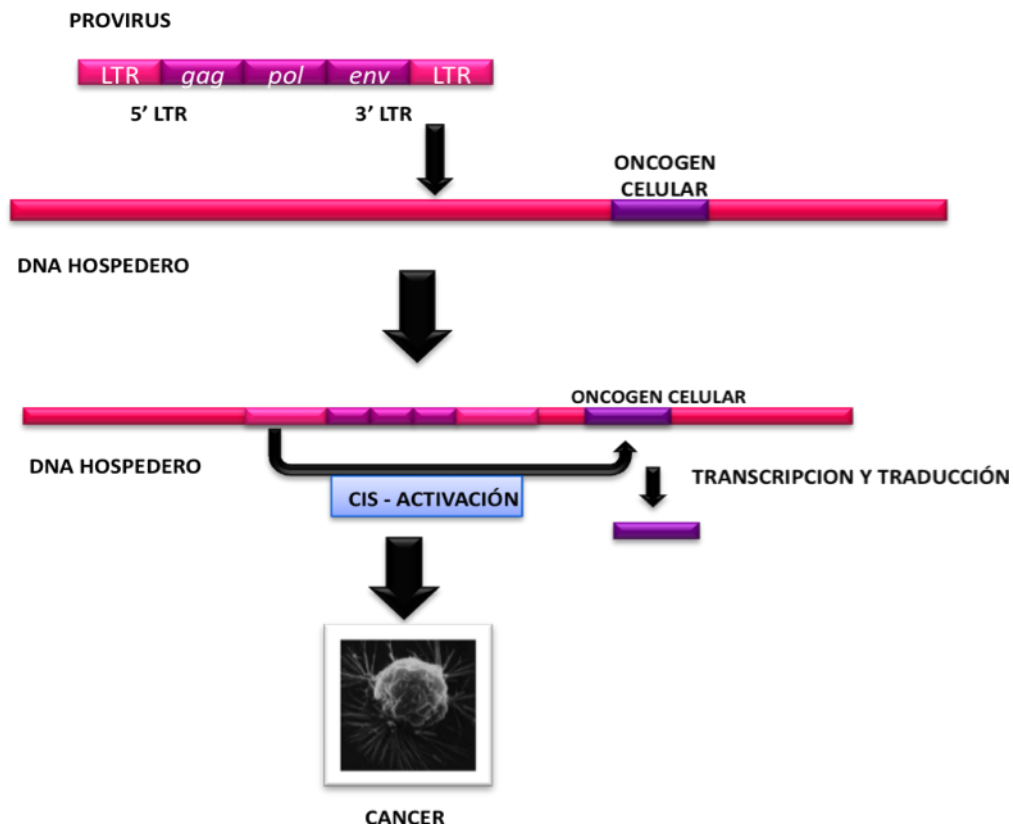


Fig3. Mecanismo de oncogénesis retroviral: Mutagénesis insercional.

Proteínas transactivadoras: El tercer mecanismo se observa en retrovirus complejos, aquellos que poseen una región génica que codifica para proteínas accesorias con capacidad oncogénica, tal es el caso del HTLV-1, donde la proteína Tax, una proteína transactivadora, que interactúa con elementos de rutas de señalización celular, estimulan la activación de factores de transcripción como el factor nuclear kappa B (NF- κ B) o proteínas de respuesta a unión de AMP cíclico. Además también actúa inactivando los productos de los genes supresores de tumores p53 y p16. Por otra parte, la expresión de Tax estimula el ataque por parte de los linfocitos T citotóxicos a las células (Grassmann *et al.*, 2005).

Por lo tanto, Tax participa en la transcripción, la regulación, la progresión del ciclo celular, en el mantenimiento de la estabilidad de los cromosomas y en la reparación del ADN dañado en células infectadas con HTLV-I de las células infectadas, apoyando la



noción de que Tax es una determinante primaria de la génesis tumoral (Matsuoka *et al*, 2007).

A pesar de la probable importancia de en la transformación oncogénica por HTLV-1, es importante mencionar que el LTR 5' es a menudo eliminado o inactivado en las células infectadas. Por otro lado, el LTR 3' permanece intacto y no se metila en todas las fases de desarrollo de la leucemia; lo que sugiere que el LTR 3' es importante para la transformación y que este mecanismo es independiente de Tax (Matsuoka *et al*, 2007).

Hasta hace poco se creía que los mecanismos descritos anteriormente eran los únicos relacionados con la carcinogénesis inducida por retrovirus; sin embargo recientemente se ha informado que la proteína Env de los virus: virus formador de focos esplénicos de Friend (SFFV); virus de Jaagsiekte (JSRV); y virus de tumor mamario murino (MMTV), pudiera jugar un rol importante en el desarrollo de este proceso (Maeda *et al.*, 2008).

Como ya es sabido el mecanismo de oncogénesis retroviral de MMTV es el proceso de mutagénesis insercional; sin embargo la expresión *in vitro* de la proteína Env en líneas celulares humanas (MCF-10F) y de ratón (NMuMG) produce una transformación celular que incrementa la habilidad de formar colonias en matrices de colágeno mostrando del mismo modo un fenotipo invasivo; así también al mutar dos residuos de tirosina (Y422 e Y432) del motivo ITAM del dominio SU gp52 se redujo la eficiencia de la transformación (**Figura 4**), planteando la posibilidad de que el proceso de mutagénesis insercional, aunado a la capacidad transformante de Env interactúen, siendo ambos responsables del proceso de carcinogénesis mediada por MMTV (Maeda *et al.*, 2008).



Fig 4. Mecanismo de oncogénesis retroviral relacionado a Env.

3.8 Retrovirus endógenos

Los retrovirus endógenos son secuencias en el genoma celular que se parecen a los retrovirus infecciosos que resultan de infecciones exógenas ancestrales retrovirales que se incorporaron en la línea germinal de DNA (McLaughlin y Munger, 2008).

Se sabe que los retrovirus endógenos humanos (HERVs) representan hasta el 9% del genoma humano y que incluyen más de 800 elementos relacionados con betaretrovirus (McLaughlin y Munger, 2008).

Estas secuencias por ser provirus retrovirales deberían contener dos repeticiones terminales largas en los extremos (*LTR*) y las regiones génicas *gag*, *pol* y *env*; sin embargo, la inmensa mayoría contienen únicamente *LTR*'s, habiendo perdido todos los



genes estructurales, pero manteniendo su capacidad reguladora (McLaughlin y Munger, 2008).

En la actualidad se han distinguido y clasificado los que se encuentran en los retrovirus endógenos humanos (HERV). La clase I de HERV se relaciona con los retrovirus tipo C de los mamíferos, como el virus de la leucemia felina (FeLV), el virus

de la leucemia en los gibones (GaLV) y el virus linfotrófico de células T humanas (HTLV). La clase II de HERV es más similar a los retrovirus tipo B y D de los mamíferos, como los virus de la leucosis en aves, el virus del tumor mamario de ratón (MMTV), el retrovirus de simio tipo 1 (SRV-1) y el virus del sarcoma de Rous en aves (McLaughlin y Munger, 2008).

3.9 Virus del tumor mamario murino (MMTV)

El virus del tumor mamario murino (MMTV) (**Figura 5**) ha sido utilizado como un modelo para el estudio del cáncer de mama desde su descubrimiento en la década de 1920.

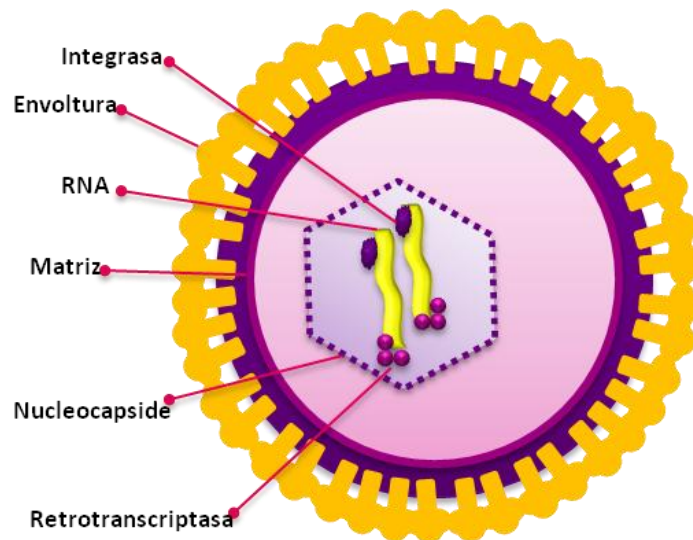


Fig5. Estructura del virus de tumor mamario murino MMTV



Aunque MMTV, fue descubierto por Bittner hace más de medio siglo (Bittner 1936), la biología de este virus no está aún completamente comprendida, principalmente debido a las dificultades en la obtención de títulos altos del virus en cultivo celular, su pobre capacidad de infección en comparación con otros retrovirus y la falta de un simple y delicado ensayo in vitro que evalúe la capacidad de infección y la transformación potencial de los virus (Indik *et al.*, 2005).

El genoma de MMTV posee las regiones virales características de un retrovirus simple (*gag-pol-env*), flanqueadas por las regiones reguladoras *LTR*. La región reguladora río abajo codifica a un súper antígeno (Sags) que estimula la respuesta de las células T, lo que produce la proliferación de estas células y la susceptibilidad para ser infectadas por MMTV (**Figura 6**) (Held *et al.*, 1994).

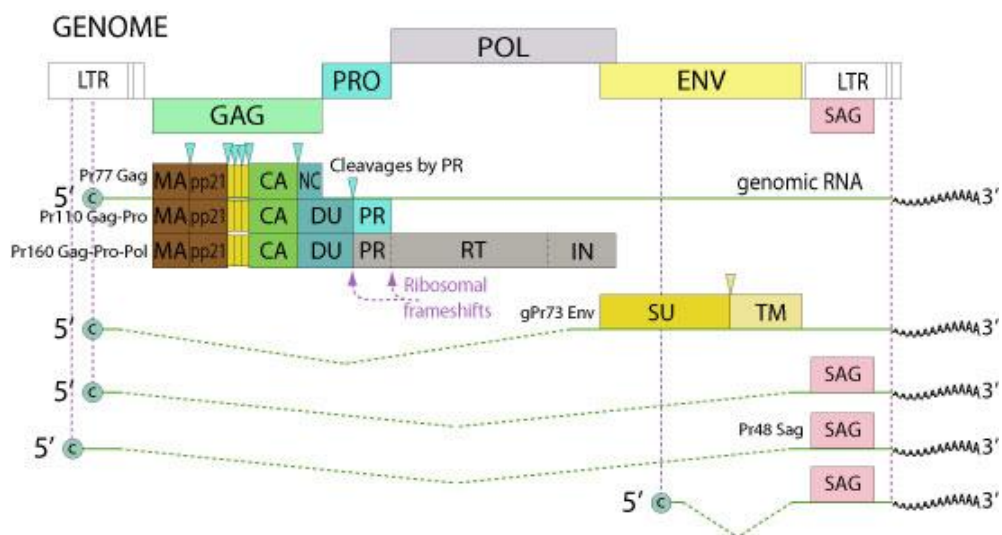


Fig6. Mapa genético del virus de tumor mamario murino MMTV. El genoma es de alrededor de 10 Kb, se observan los diferentes transcritos que se producen a partir del DNA insertado en el genoma, la región *gag-pro-pol* que da lugar a la mayor parte de las proteínas del virus; la región *env*, de la cual se obtendrán las proteínas SU y TM y los transcritos que codifican para el Superantígeno de MMTV.

Al menos cinco transcripciones se generan a partir del genoma MMTV. El RNA sin splicing que inicia en la LTR 5' y termina en la LTR 3' sirve como el genoma viral y se empaqueta en viriones. Esta transcripción también funciona como el RNAm para las



proteínas gag y pol, así como un dUTPasa (dut) y otras proteínas de función desconocida (Ross, 2010).

La proteína Env, que se encarga de la entrada retroviral, está codificada por un ARNAm separado longitudinalmente (Figura 7). Al igual que con otros retrovirus, el env de MMTV consta de dos cadenas, generadas por el procesamiento de la poliproteína 73 kDa que da como resultado a las proteínas de superficie (SU) de 52 kDa, que se une al receptor de entrada, y una proteína transmembranal de 36 kDa (TM) que es responsable de la fusión de membranas (Ross, 2010).

MMTV utiliza un receptor de la transferrina (TfR1) para la entrada. TfR1 es el principal medio por el cual las células captan el hierro, la entrada MMTV requiere un pH bajo (<5,2), el TfR1 es altamente expresado en linfocitos activados y células epiteliales mamarias en división, lo que probablemente limita infección MMTV a estos tipos de células (Wang et al, 2008).

Una vez liberada la nucleocápside del endosoma, se retrotranscribe el RNA, obteniendo DNA que se integra al DNA hospedero, transcribiendo sus mensajeros. Por lo menos dos genes accesorios adicionales, son codificados por otros mRNA por medio de splicing alternativo. La proteína Sag se traduce de dos transcripciones diferentes, la primera inicia en la LTR 5' y se utiliza el donador de empalme mismo que el mRNA de *env*. La transcripción del segundo utiliza un promotor y donador de empalme en *env*. Ambos transcritos utilizan un aceptor de empalme justo río arriba del marco de lectura abierto en la LTR 3' (**Figura 7**) (Xu L et al, 1997).

La proteína reguladora de la exportación de MMTV (Rem) es una proteína que está codificada por un mRNA doble empalmado. Al igual que la proteína Rev en el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) la proteína Rem se requiere para el transporte eficiente del RNA viral (Mullner et al, 2008).

Como es el caso de otros betaretrovirus, el ensamblaje se produce en un compartimento intracelular y los viriones se exportan a la membrana plasmática para la salida. Sin embargo, poco se sabe acerca de los requisitos, ya sea viral o celular para el ensamblaje de MMTV.

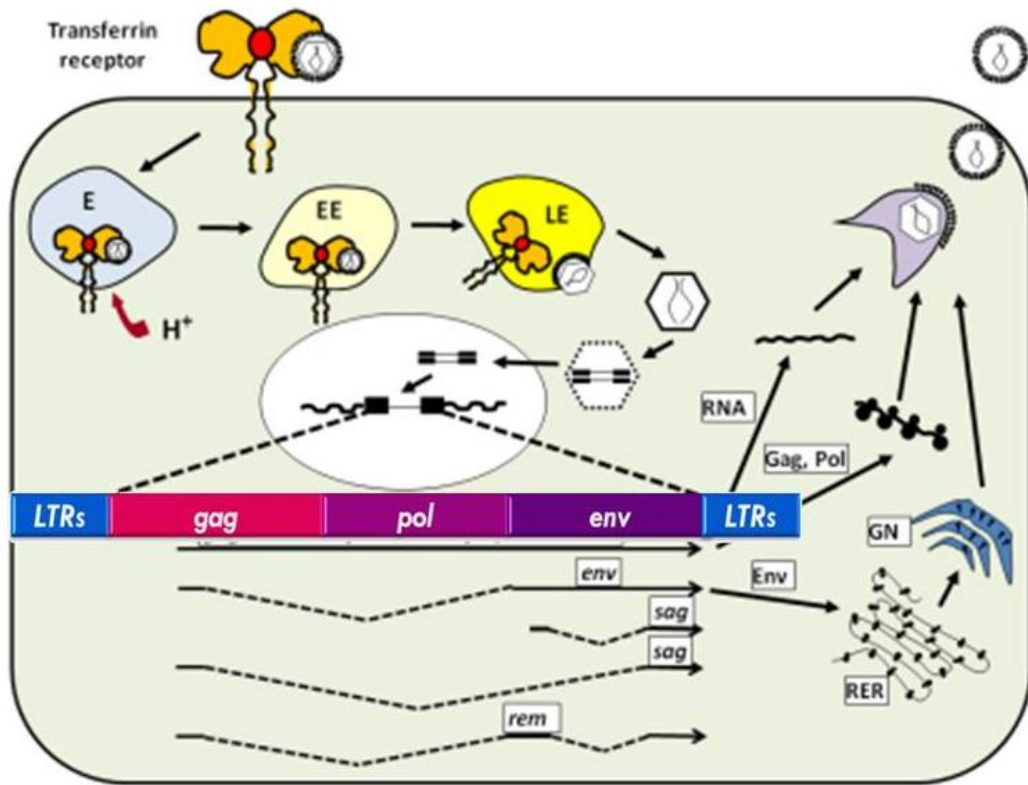


Fig7. Ciclo de replicación de un retrovirus (MMTV)

3.9.1 MMTV en ratón

Mus musculus domesticus es considerado hospedero de este virus; en su hospedero MMTV reacciona al estrógeno durante la lactación con la influencia de las hormonas esteroides y aumenta su expresión en las glándulas mamarias, lo que da como resultado que se secreten las partículas virales por medio de la leche y se trasmite a la progenie en forma exógena (Gallahan *et al.*, 1986).

MMTV, es la causa más común de cáncer de mama en ratones, y aunque la infección por este virus es altamente tejido específico, se han observado secuencias de MMTV en linfoma murino de timo y en adenocarcinoma murino de riñón (Rollini *et al.*, 1992).

Los virus aislados de los ratones a partir de la leche infectada pueden causar tumores en diferentes cepas de ratones y estos tumores se pueden observar en distintos grados. Esta susceptibilidad diferencial a la infección por MMTV se debe en gran parte



a la inmunidad intrínseca, innata y adaptativa contra el virus que varían entre las cepas de ratón (Bentvelzen *et al.*, 1980).

Además de la forma exógena de MMTV, todos los ratones comúnmente poseen copias endógenas de MMTV que se cree que han entrado en el genoma del ratón hace 20 millones de años. La gran mayoría de MMTVs endógenos no son infecciosos debido a deleciones o mutaciones en el genoma proviral (Baillie *et al.*, 2004).

La infección por MMTV en ratones infectados está asociada a los linfocitos, ya que la infección a estas células es crítica para la propagación del virus en el intestino y por ende la infección del tejido mamario. El virus entra al aparato digestivo de los lactantes e infecta a las células B que están en las placas de Peyer (Ross *et al.*, 2008).

La expresión de superantígenos resulta crítica para el ciclo de vida del MMTV. Las primeras fases de la infección afectarían casi exclusivamente a las células B para más tarde infectar a los linfocitos T. Como ocurre con otros virus, la infección y replicación de MMTV es más eficiente en células en división. Los linfocitos B infectados expresan el superantígeno en su superficie, asociado a moléculas de clase II. Este complejo Sag/moléculas MHC de clase II estimula a las células T, esta

estimulación induce la proliferación de las células B infectadas, lo que da lugar a la amplificación viral (Held *et al.*, 1994) (**Figura 8**).

Al cabo de tres o cuatro semanas del nacimiento de las crías del ratón, la infección del virus se eleva y es más fácil que pueda infectar a las glándulas mamarias (Gallahan *et al.*, 1986).

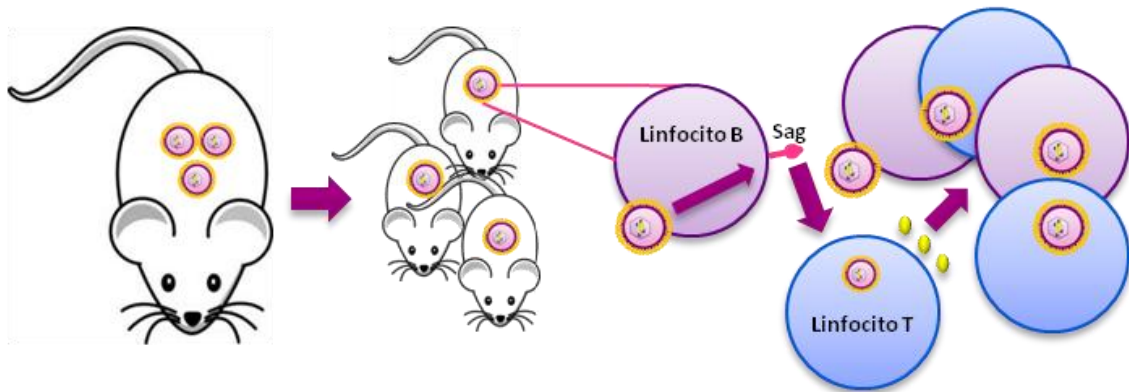


Fig8. Rol del superantígeno en el ciclo de infección de MMTV. El virus se transmite de forma vertical por medio de la leche, infecta a los linfocitos B presentes en las placas de peyer, quienes presentan el superantígeno a los linfocitos T, estos en respuesta producen un gran número de citocinas que atraerán a más linfocitos dando como resultado una amplificación de la infección.

Mientras que MMTV endógeno posee mutaciones en las regiones que codifican para las proteínas del virión, casi todos mantienen intacta la región que codifica para Sag (Gallahan *et al.*, 1986).

La infección por el virus en ratón está restringida por factores intrínsecos inmunológicos como la apolipoproteína APOBEC3. Diferentes cepas poseen polimorfismos en Apobec3, que afecta a la capacidad de este factor para inhibir la infección. Todos los genes del ratón que afectan a la infección de linfocitos por MMTV también alteran la incidencia y la inducción de tumor mamario (Takeda *et al.*, 2008).

MMTV induce tumores mamarios en los ratones por medio de la integración proviral, actuando como activador y potenciador de oncogenes celulares cercanos, aunque también se ha descrito que por medio de inserciones en la región puede alterar el producto del gen. Existen sitios de integración comunes implicados en los tumores mamarios inducidos por MMTV, estos sitios de integración se encuentran

principalmente en la cercanía de los oncogenes *wnt* y *fgf*. Sin embargo aun no se sabe si la inducción del tumor es el resultado de una sola integración o de un compuesto de múltiples integraciones (Callahan *et Smith*, 2008).



3.9.2 MMTV en humanos

Estudios previos han encontrado la presencia de este virus en muestras de tejido canceroso de mujeres, el primer hallazgo de secuencias específicas de este virus fue realizado por el grupo de investigadores de la Dra. Pogo en Estados Unidos observándose secuencias específicas en el 38.5% de 314 muestras de tejido fresco y el 37% de 73 muestras de tejido embebido en parafina de las biopsias de cáncer de mama. Al hacer la secuenciación del provirus se demostró un 95-99% de homología con MMTV y una homología no significativa de un 50-60% con los retrovirus endógenos humanos conocidos (Wang *et al.* 1995).

A partir de este suceso se han desarrollado varias líneas de investigación con el fin de encontrar la prevalencia de estas secuencias en diferentes países alrededor del mundo, los resultados de estas se muestran en la **Tabla 3**.

Mientras que varios grupos de investigación en diferentes regiones del mundo han encontrado secuencias relacionadas a MMTV en tumores, otros no han llegado a los mismos resultados tal es el caso de los grupos de Japón, Alemania, Austria, Suiza e Inglaterra (Zangen *et al.* 2002; Witt *et al.* 2003; Mant *et al.* 2004; Bindra *et al.* 2007; Frank *et al.* 2008; Fukuoka *et al.* 2008).

En nuestro país, nuestro grupo de investigación ha logrado encontrar evidencia de la presencia de secuencias del gen *env* de MMTV en el 4.2% de las biopsias de tumor mamario procesadas, observándose una elevada homología, entre el 98 – 99%, con este virus (Zapata-Benavides *et al.* 2007) (**Tabla 3**).



Tabla 3. Presencia de MMTV en cáncer de mama

Region	Sample	Controls/MMTV+ (%)	Cases	MMTV+ %	Authors
USA	Paraffin-embedded tissue/Frozen	107/(1.8)	314	38.5	Wang et al. (1995)
USA	Frozen	35/(0.0%)	73	37.0	Etkind et al. (2000)
Italy	Paraffin-embedded tissue	106/(0.9%)	106	30.1	Melana et al. (2001)
Argentina	Paraffin-embedded tissue	10/(10%)	74	31%	Melana et al. (2002)
USA	Paraffin-embedded tissue	-	18	0.0	Zangen et al. (2002)
Australia	Paraffin-embedded tissue	111/(1.8%)	45	42.2	Ford et al. (2003)
USA	Fresh frozen/Paraffin-embedded tissue	-	29	62	Wang et al. (2003)
Austria	Fresh frozen tumor	-	50	0.0	Witt et al. (2003)
Australia	Paraffin-embedded tissue	20/(0.0%)	33	78.8	Ford et al. (2004b)
Australia	Paraffin-embedded tissue	-	136	32	Ford et al. (2004a)
England	Fresh frozen tumor	-	44	0.0	Mant and Cason (2004)
Tunisia	Paraffin-embedded tissue	-	38	73.7	Levine et al. (2004)
USA	Paraffin-embedded tissue	-	12	50	Etkind et al. (2004)
Sweden	Fresh frozen	11/(0.0%)	18	0.0	Bindra et al. (2007)
Mexico	Paraffin-embedded tissue	-	119	4.2	Zapata-Benevides et al. (2007)
Tunisia	Frozen	-	122	13.9	Hachana et al. (2008)
USA	Paraffin-embedded tissue	-	3	100	Etkind et al. (2008)
Germany	Fresh Frozen	46/(0.0%)	23	0.0	Frank et al. (2008)
Japan		-	46	0.0	Fukuoka et al. (2008)

* J Cancer Res Clin Oncol (2009)

Se han encontrado no solo secuencias aisladas del virus, sino el genoma del virus completo; Wang *et al.*, (2001), reportaron la secuencia de un provirus completo con una homología del 96% con MMTV y del 57% con HERVs, además de la región codificante para Sags ubicada en el extremo *LTR 3'*. En un estudio reciente se logró aislar el genoma viral completo de dos muestras de cáncer de mama que habían resultado positivas para las secuencias *env* de MMTV, el producto obtenido de 9.9kb resultó poseer un 95% de homología con MMTV y una similitud muy baja con HERV's (Ahmed *et al.* 2008).

Sin embargo no solo se han detectado secuencias completas del virus, sino también la expresión de proteínas de envoltura en tejido mamario, encontrándose presente en tejido mamario canceroso y ausente en tejido mamario normal (Yanget *al.*, 1978) y recientemente se ha logrado aislar la proteína en un cultivo primario de cáncer



de mama MSSM; así como también partículas virales completas con la morfología característica de un betaretrovirus (Melana *et al.* 2007, 2010).

También se detectó la presencia de secuencias reguladoras *LTR* en un estudio realizado a 3 miembros de la misma familia, padre, madre e hija que desarrollaron un tumor maligno mamario; encontrando secuencias con una homología del 98%-99%; aunque no se conoce como estas tres personas se infectaron con el virus, existe la posibilidad de que la infección sea el resultado de la exposición a ratones (Etkind *et al.*, 2000).

En este mismo estudio se construyó un análisis filogenético basado en los alineamientos de los fragmentos *LTR*, observando que estos se relacionaban con las secuencias de MMTV presentes en otras patologías (cáncer de mama y linfoma no Hodgkin) así como también con el MMTV murino (**Figura 9**).

MMTV no solo se ha asociado con cáncer de mama, también se han encontrado secuencias génicas *env* y reguladoras *LTR* en muestras de linfoma no-Hodgkin humano, en este estudio se realizó un análisis filogenético por el método de máxima parsimonia, observándose una estrecha relación de las secuencias *LTR* asociadas a linfoma no-Hodgkin y las secuencias *LTR* de cáncer de mama murino murino (**Figura 10**) (Etkind, 2004).

Por otro lado, se han encontrado secuencias de *env* presentes en diferentes enfermedades del hígado, observándose en 53 de 210 muestras (25%) y en el 0% de las muestras de hígado sano. En las muestras de las distintas patologías del hígado la prevalencia de MMTV no fue significativamente diferente en los desórdenes asociados a cirrosis y los no asociados a cirrosis (Harpreet *et al.* 2009).

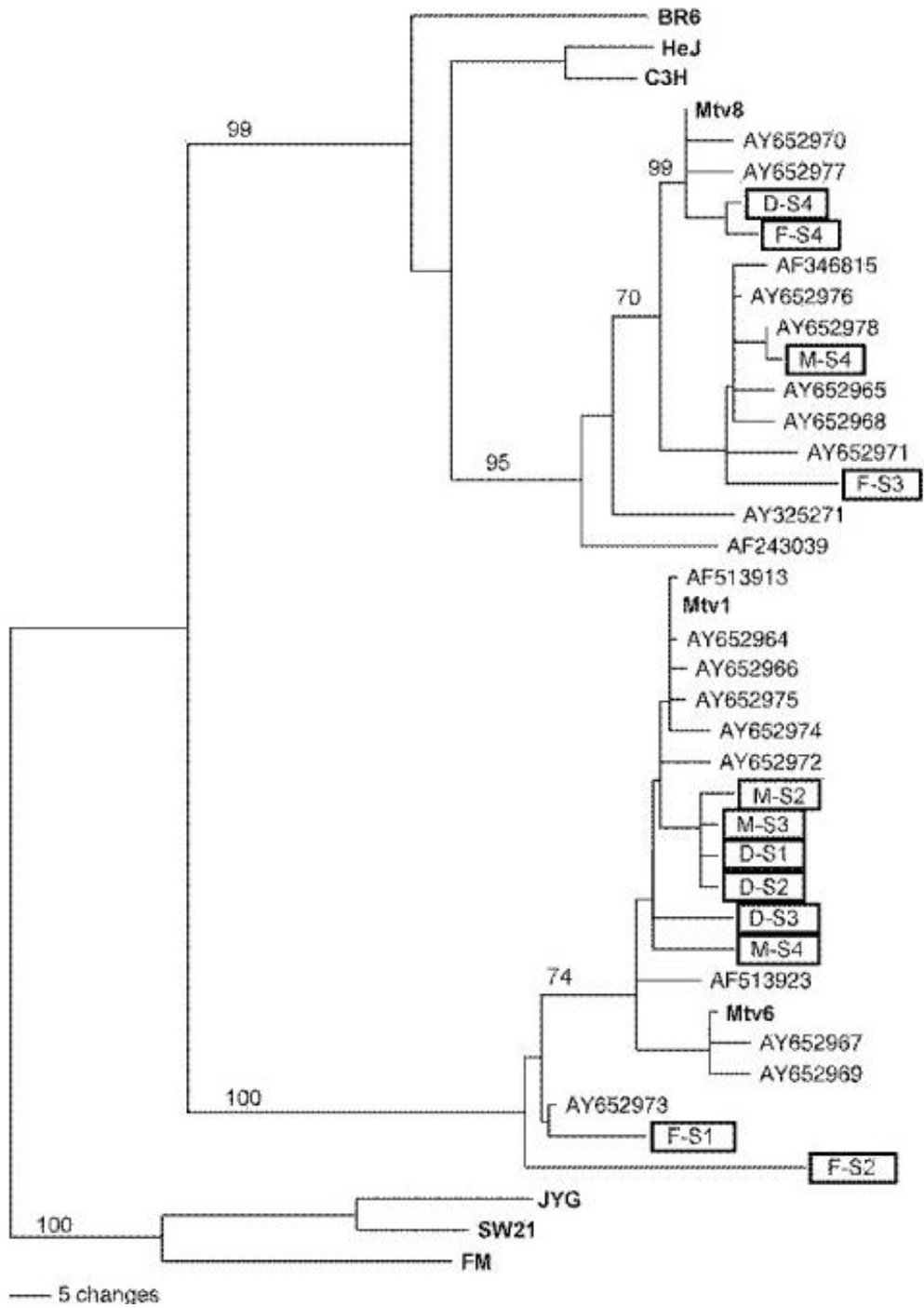


Fig. 9. Análisis filogenético de las secuencias reguladoras LTR encontradas en madre, padre e hija. Las secuencias de la madre se encuentran etiquetadas como D, las del padre con F y las de la hija con M, todas ellas seguidas del número de clona. Las secuencias que inician con AY o AF seguida de una numeración son secuencias encontradas en cáncer de mama humano, BR6, C3H, HeJ Mtv1, 6 y 8 son cepas de MMTV de ratón, FM, SW21 y JYG son secuencias de MMTV en ratón asiático.

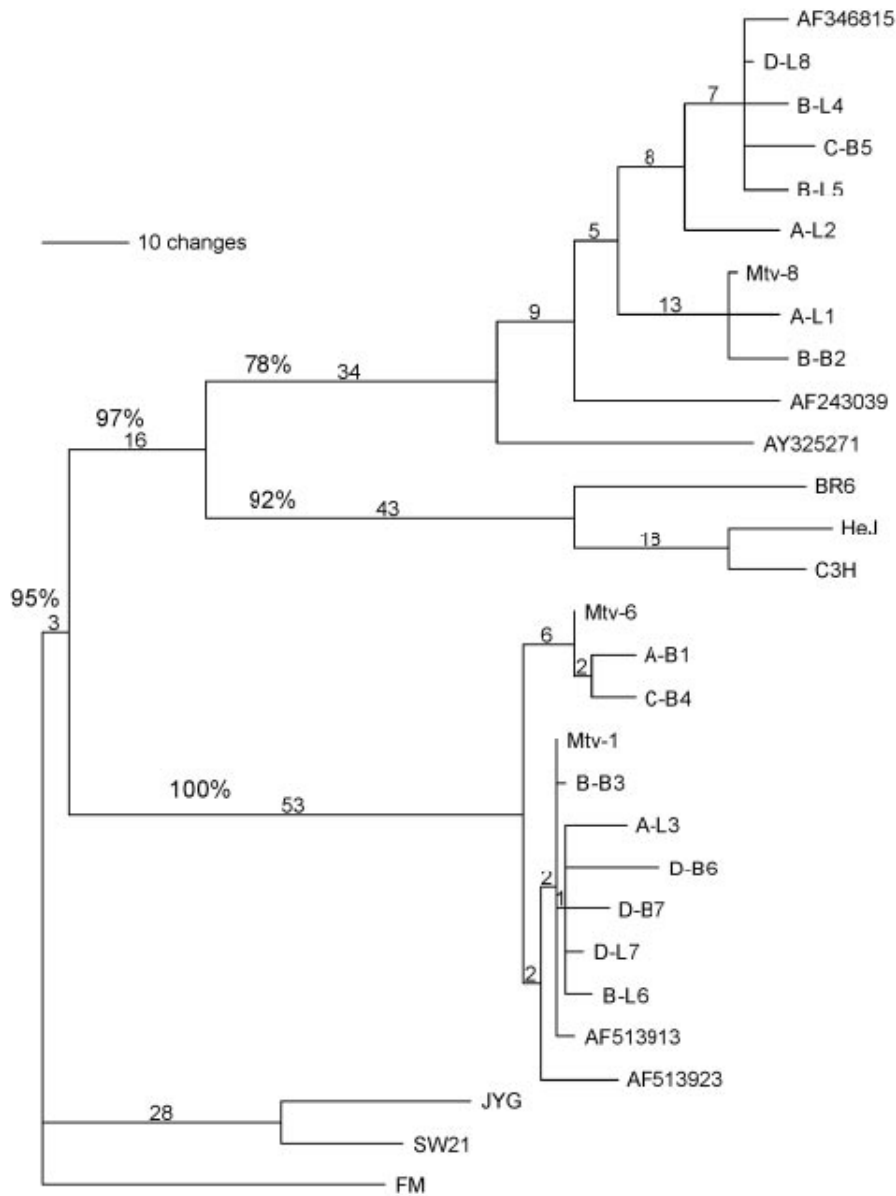


Fig. 10. Análisis filogenético de las secuencias reguladoras LTR encontradas en pacientes con linfoma no-Hodgkin (Con letra inicial de la A a la D) Las secuencias que inician con AY o AF seguida de una numeración son secuencias de cáncer de mama humano, BR6, C3H, HeJ Mtv1, 6 y 8 son cepas de MMTV de ratón, FM, SW21 y JYG son secuencias de ratón asiático.



3.9.3 Factores de riesgo asociados a la oncogénesis por MMTV en humanos.

Se ha relacionado la presencia de MMTV con la raza o etnia: en un trabajo realizado en Australia se determinó la presencia de secuencias del gen *env* de MMTV en cáncer de mama tanto en poblaciones de mujeres vietnamitas como de australianas, obteniéndose como resultado en las mujeres australianas caucásicas una incidencia de virus del 42.2% (de un total de 45 casos) mientras que en el caso de las mujeres vietnamitas únicamente se encontraba presente en un 0.8% (de 120 casos estudiados); sin embargo, en las mujeres australo-vietnamitas no se encontró dicha secuencia viral.

Este estudio plantea la existencia de una posible relación entre los grupos humanos y la relación de MMTV con cáncer de mama (Ford *et al.*, 2004), pero además de estos atributos también se ha planteado el posible impacto de la geografía y el medio ambiente. Se observa que la incidencia de cáncer de mama es mayor en Europa Occidental, hábitat común de *M. musculus domesticus*, que en Europa Oriental, donde existe *M. musculus musculus*. Esta aseveración también se extiende a otras regiones previamente enunciadas como Túnez, Australia y Norteamérica con reportes de MMTV en cáncer de mama, lugares en donde también existe una alta incidencia en ratones de la especie *M. musculus domesticus* (**Figura 11**). Mientras que en otras regiones en donde esta especie no existe como Vietnam, Suiza y Austria se ha reportado la ausencia de secuencias de MMTV en muestras de cáncer de mama (Ahmed *et al.* 2008).

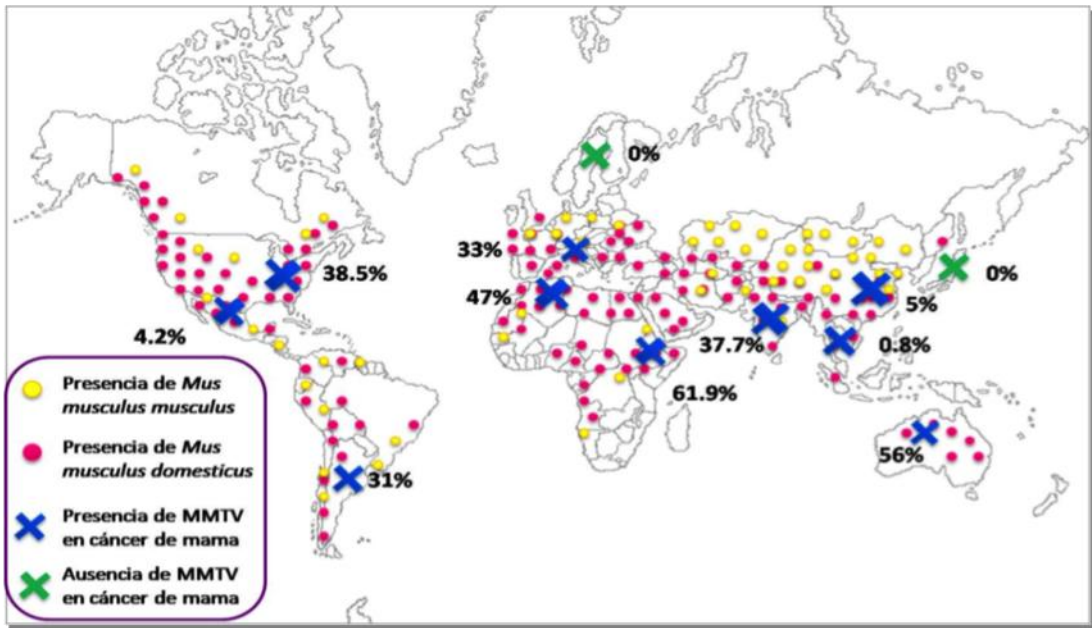


Fig. 11. Mapa mundial que demuestra la comparación entre el hábitat natural de las especies de ratón *Mus musculus musculus* y *Mus musculus domesticus* y los casos reportados de MMTV en cáncer de mama. Las muestras positivas para MMTV se indican en porcentajes (Zapata-Benavides *et al.*, 2007)

Existen más evidencias que soportan la hipótesis de una posible zoonosis, ya que se han encontrado secuencias del virus en animales domésticos como perros y gatos, en este estudio se realizó un análisis filogenético del gen *env* por el método neighbor-joining, mostrando que MMTV detectado de diferentes huéspedes (ratón, humano, gato y perro) no se clasificó en diferentes clústers, indicando que MMTV se puede transmitir entre estos diferentes huéspedes (Figura 12) (Hsu *et al.* 2010).

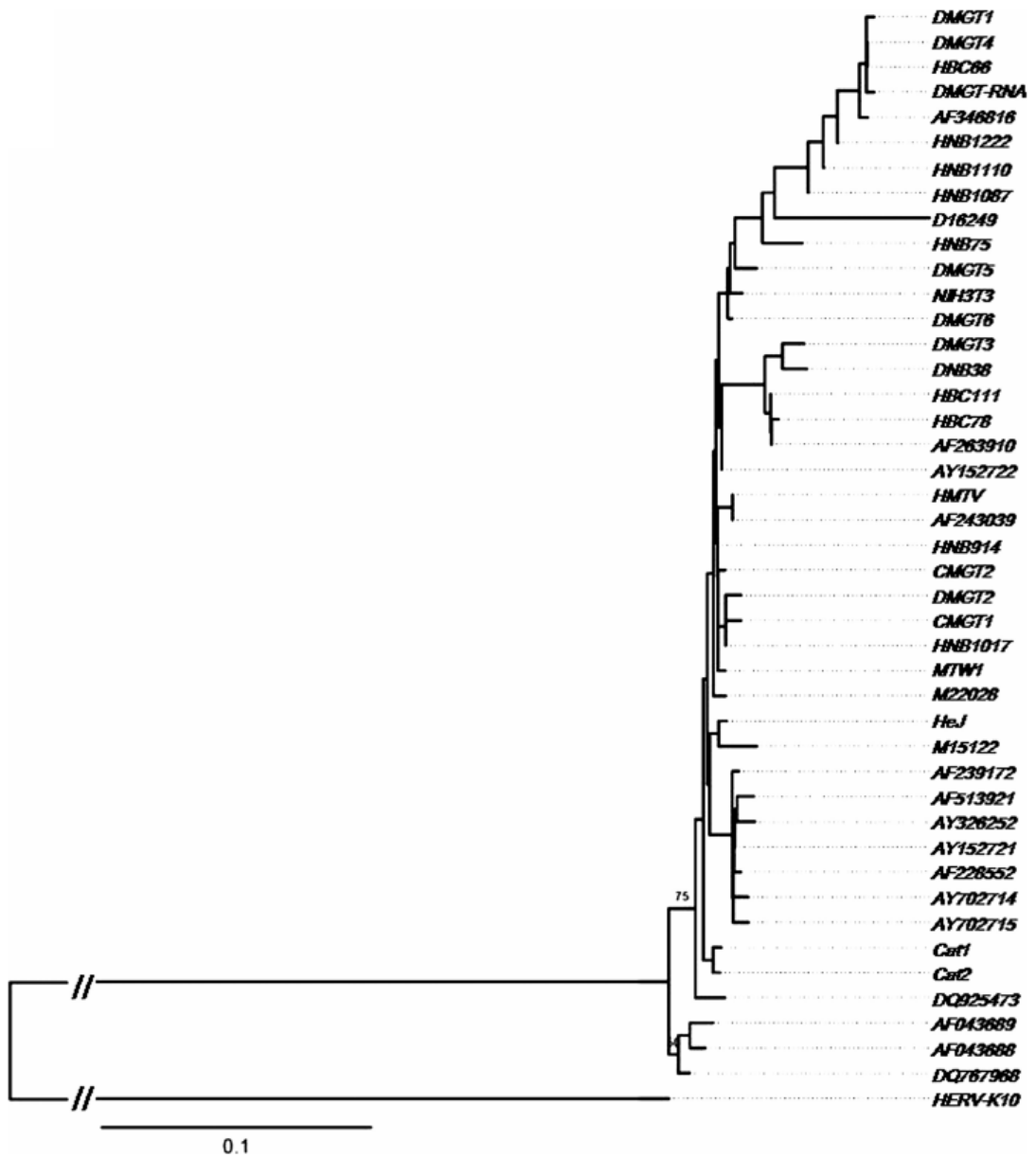


Fig. 12. Análisis filogenético de las secuencias env encontradas en ratón(HeJ) , humano(AF228551.1, AY52722.1, AF243039, HBC, HBY), gato(CMGT, Cat1 y Cat2), perro(DMGT y DBT) y HERVK10 (M14123) como raíz del árbol.



3.10 Virus y cáncer de pulmón

Estudios previos han relacionado la infección por el virus del papiloma humano (VPH) con la formación adenocarcinomas pulmonares en humanos; siendo el tipo más predominante VPH 16, seguido de VPH 18; ambos tipos se han encontrado presentes en cáncer de pulmón de mujeres no fumadoras de Taiwán (Cheng *et al.*, 2001).

Otros estudios han detectado al virus de Epstein-Barr en adenocarcinomas y carcinomas pulmonares; así como también se ha observado la presencia del virus de Jaagsiekte; un virus zoonótico, en cáncer de pulmón humano (Kasai *et al.*, 1994) (Braoudaki M *et* Tzortzatou-Stathopoulou. 2011).

3.10.1 MMTV y cáncer de pulmón

En un estudio previo que tenía como principal objetivo la búsqueda de secuencias de la región *env* en cáncer de mama, nuestro grupo de investigación encontró secuencias con una homología del 98-99% con la región *env* de MMTV en una línea celular establecida a partir de cáncer primario de pulmón INER-51 (Zapata-Benavides *et al.*, 2007).

A partir de esta evidencia se inició el estudio de este virus en muestras de tejido fresco y lavados bronquioalveolares, de cáncer de pulmón y de otras patologías pulmonares, encontrando en 3/18 muestras, un fragmento de la región *env* de MMTV (Trejo-Avila *et al.*, 2011), así como también secuencias de las regiones reguladoras “LTR” involucradas en el proceso de carcinogénesis del virus, en 2 / 18 muestras y en la línea celular INER-51.



HIPÓTESIS

El provirus *like*-MMTV presente en la línea celular de carcinoma pulmonar primario humano "INER-51" tiene un alto porcentaje de identidad con MMTV y está expresando su genoma.



OBJETIVO GENERAL

Secuenciar el genoma completo del virus like-MMTV integrado en la línea celular de adenocarcinoma pulmonar humano "INER-51", realizar su análisis filogenético y analizar la expresión del provirus.



OBJETIVOS PARTICULARES

1. Secuenciar las regiones génicas y reguladoras del provirus de MMTV integrado en la línea celular INER-51 derivada de cáncer pulmonar.
2. Comparar las secuencias obtenidas del provirus con la secuencia reportada para MMTV en el GenBank (GenBank. Número de acceso M15122.1).
3. Analizar la expresión de RNA genómico viral.
4. Construir un análisis filogenético del gen *env* de MMTV de las secuencias reportadas en Genbank y las secuencias provirales; de la línea celular INER-51 y de las muestras de cáncer de pulmón positivas.
5. Construir un análisis filogenético de las regiones reguladoras *LTR* de MMTV de las secuencias reportadas en Genbank y las secuencias provirales; de la línea celular INER-51 y de las muestras de cáncer de pulmón positivas.

MATERIAL Y MÉTODOS

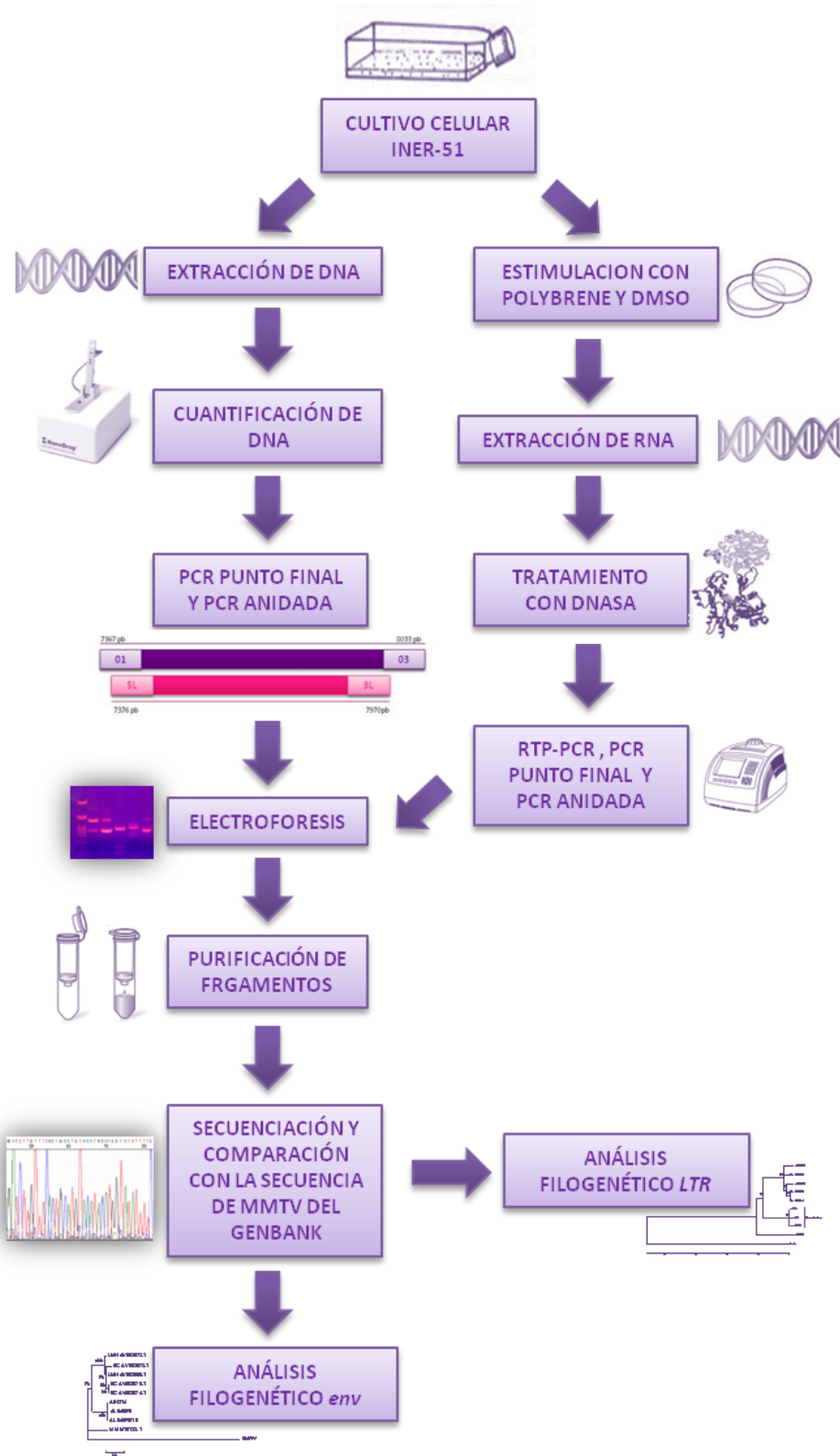


Fig. 13 Diseño experimental.



6.2 Cultivo de Línea celular INER-51.

La línea celular INER-51 (Células de Adenocarcinoma Primario Pulmonar) fue proporcionada por el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias de la Secretaría de Salud.

Para el cultivo celular primero se realizó la descongelación de las células; para esto se colocaron 10 mL de medio DMEM/ F12 suplementado con SFB al 10% en un tubo falcon de 15 mL y 3 mL del mismo medio en una botella para cultivo T25. Se le añadieron 500 μ L de medio a los criotubos, se resuspendió y se agregó el volumen al tubo falcon al que previamente se le añadieron 10 mL de medio, se centrifugó a 2500 rpm durante 7 minutos y se retiró el medio. La pastilla se resuspendió con 500 μ L de medio y se agregó a la botella con 3 mL de medio, posteriormente se incubó a 37°C, 5% de CO₂ y condiciones de humedad controlada, las células fueron transferidas al alcanzar un 90% de confluencia.

Para obtener los paquetes celulares para la obtención de DNA, se agregó 1 mL de tripsina a una botella confluyente con el objetivo de despegar las células, una vez que esto sucedió se colocó el contenido en tubos eppendorf, se centrifugó y se retiró el sobrenadante; posteriormente se realizaron lavados del paquete celular con PBS 1X estéril, centrifugando a 4,000 rpm por 5 min y descartando el sobrenadante, en dos ocasiones. Por último se almacenó en congelación a -30° C hasta la extracción de DNA.

6.3 Extracción de DNA genómico

La extracción de DNA se realizó a partir del pellet de células previamente congelado, al cual se le añadieron 200 μ L de Buffer TE 1X (Tris·Cl10 al mM, pH 8.0; 1 mM EDTA) estéril. Posteriormente las células fueron sometidas a un buffer de lisis (200 μ L Buffer TE 1X estéril, 200 μ L de SDS 10% y 2 μ L de Proteinasa K (20mg/mL), se incubó a 60° C durante toda la noche, al terminar se adicionaron 150 μ L de Buffer P3 (Kit de extracción de DNA de QIAGEN, Hilden, Alemania) (acetato de sodio) y se centrifugó a 10,000 rpm por 10 min.



Posteriormente se decantó el sobrenadante en otro tubo eppendorf estéril y se agregaron 350 μ L de isopropanol absoluto (SIGMA, Missouri, EUA), se centrifugó a 12,000 rpm por 15 min. A la pastilla precipitada se le realizaron 2 lavados con 200 μ L de etanol al 70% centrifugándose en cada ocasión a 10,000 rpm por 5 min, se eliminó el etanol y se agregaron 30 μ L de Buffer TE aumentándose la temperatura a 60°C por espacio de 30 min para resuspender de forma homogénea.

6.4 Cuantificación del DNA genómico

Para este fin se utilizó un espectrofotómetro (Nanodrop 2000) en el cual se introducen 2 μ L de la muestra y a partir de la concentración obtenida en una longitud de onda de 260 nm se realizaron diluciones para obtener alícuotas con una concentración de DNA idónea para los ensayos de PCR tradicional (200 ng/ μ L).

6.5 PCR para gen constitutivo G3PDH

Para la detección del gen constitutivo G3PDH se utilizó la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa tradicional utilizando *primers* específicos para este gen constitutivo celular (SIGMA GENOSYS, Missouri, EUA), que amplifican un fragmento de 452 pb, siguiendo las condiciones que se muestran en la Tabla 4 y utilizando el programa descrito (Tabla 5).

Las secuencias de los *primers* para G3PDH son:

GF: 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3' (SIGMA GENOSYS, Missouri, EUA)

GR: 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3' (SIGMA GENOSYS, Missouri, EUA)

La temperatura de alineamiento para este gen se definió realizando una PCR *in silico* con la ayuda del programa AmplifX (AmplifX versión 1.44 by Nicolas Jullien <http://ifrjr.nord.univ-mrs.fr/AmplifX-Home-page>) (Figura 14).



Tabla4. Condiciones para una PCR convencional

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	Cantidad por reacción
Buffer PCR (INVITROGEN)	10x	1x	2.5µl
MgCl ₂ (INVITROGEN)	50mM	1.5mM	0.75µl
Primer sentido	100ng/µl	2 ng/µl	0.5µl
Primer antisentido	100ng/µl	2ng/µl	0.5µl
DNTP's (INVITROGEN)	10mM	0.2mM	0.5µl
Taq Polimerasa (INVITROGEN)	5U/µl	0.5 U/µl	0.25µl
Muestra	200ng/µl	8 ng/µl	1µl
Agua Milli-Q estéril			19µl
Volumen final			25µl

Tabla 5. Programa para amplificación del fragmento G3PDH.

FASE	CICLOS	PASOS	
		TEMPERATURA (°C)	TIEMPO (MINUTOS)
1	1	95	04:00
2	35	94	00:45
		59	00:30
		72	01:30
3	1	72	10:00
4	1	4	∞

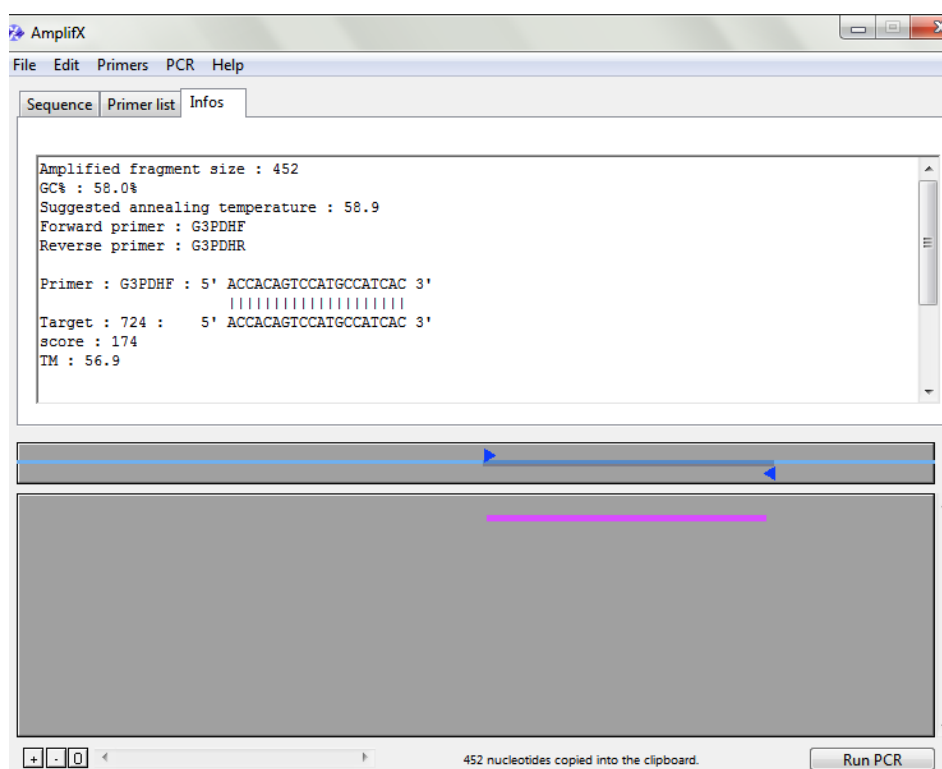


Fig. 14. PCR *in silico* utilizando los primer G3PDHF y G3PDHR

6.6 PCR para detección de secuencias de MMTV

Para detección de regiones génicas y reguladoras de MMTV se realizaron PCRs punto final y anidadas utilizando pares de *primers* tomados de la literatura (Wang *et al.*, 2001) y *primers* diseñados (KM4) por medio del programa GENTle © 2004-2008 (Magnus Manske).

Todos los *primers* utilizados se encuentran descritos en la tabla 6 y se observa su ubicación en la figura 15, las temperaturas de alineamiento para todos los genes amplificados se definieron realizando una PCR *in silico* con la ayuda del programa AmplifX (AmplifX version 1.44 by Nicolas Jullien <http://ifrjr.nord.univ-mrs.fr/AmplifX-Home-page>) (Figura 16).

Las PCRs se realizaron bajo las condiciones descritas anteriormente (Tabla 4) y utilizando los programas de las Tablas 7 y 8.

Una vez realizada la PCR con Taq Polimerasa (Invitrogen, California EUA), se repitió la reacción utilizando una polimerasa de alta fidelidad Platinum®PCR Super



Mix (Invitrogen, California EUA) siguiendo las condiciones descritas en la Tabla 9, con el objetivo de secuenciar el producto de PCR.

Tabla 6. Primers para detección de secuencias de MMTV

Nombre	Secuencia	Localización
LTR5	GGTGGCAACCAGGGACTTAT	735-754 o 9308-9327
LTR3	CGAACAGACACAAACACACG	1345-1364 o 9918-9937
GAG3	GACAGCTTGCTACCTCTGT	2053-2072
G378F	ATGTGAAAGAGAGCAGTGCAATAG	1709-1732
G1467R	TTTTATCTGAGAAGAAGGGGACAG	2763-2786
G1158F	GGGAGAGAGTGATGAAGATGACACG	2429-2454
G1987	TCTTACATCTGGGGCAGAGC	3263-3283
POLJR	CCATGCCTAACCTTGAAGAGA	3992-4014
POL2	GTGGATTAACCTTTGTAAAT	5811-5830
POL3	GGGTCTTTACTAAATAATTC	5345-5364
POL5	TGTAGCAGTCCCTAAAGGAT	4501-4520
POL6	AAATTAACACGGGAGAGTT	5021-5040
POL7	AAAGGAGAAAGAATAGCACA	3756-3775
POL9	TTGAGGAATGCCCATGTATGC	6269-6289
POL3NR	CCGATCCAAAACCTATGGTC	6576-6595
ENV5R	GACCCAGATTGGTGTTCGGCA	6685-6706
EPR	AAACTACCCCTGGTCAG	7453-7472
KM4	GTCTAAGGATGTCTAAAAGAT	2765-2786
ENV1	AAATCAAACCATGTATTTGG	7061-7080
2N	CCTACATCTGCCTGTGTAC	7779-7798
3N	ATCTGTGGCATACTAAAGG	8014-8034
5L	CCAGATCGCCTTTAAGAAGG	7376-7395
3L	TACAGGTAGCAGCACGTATG	7951-7970
ENVLT	CTGCAGCAGAAATGGTTGAA	8706-8725

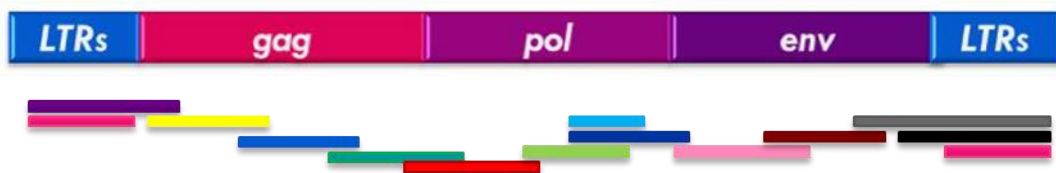


Fig. 15. Localización, en el mapa genético de MMTV, de los productos amplificados con los juegos de pares de primers. Morado: LTR5-GAG3. Magenta: LRT5-LTR3. Amarillo: G378f-G1467R, Azul: G1158F-G1987R. Verde: KM4-POLJR. Rojo: POL7-POL3. Verde limón: POL5-POL2. Azul marino: POL6-ENV5R. Celeste: POL6-POL9. Rosa pastel: POL3NR-EPR. Café: ENV1-3N. Gris: 2N-LTR3. Negro ENV/LTR-LTR3.

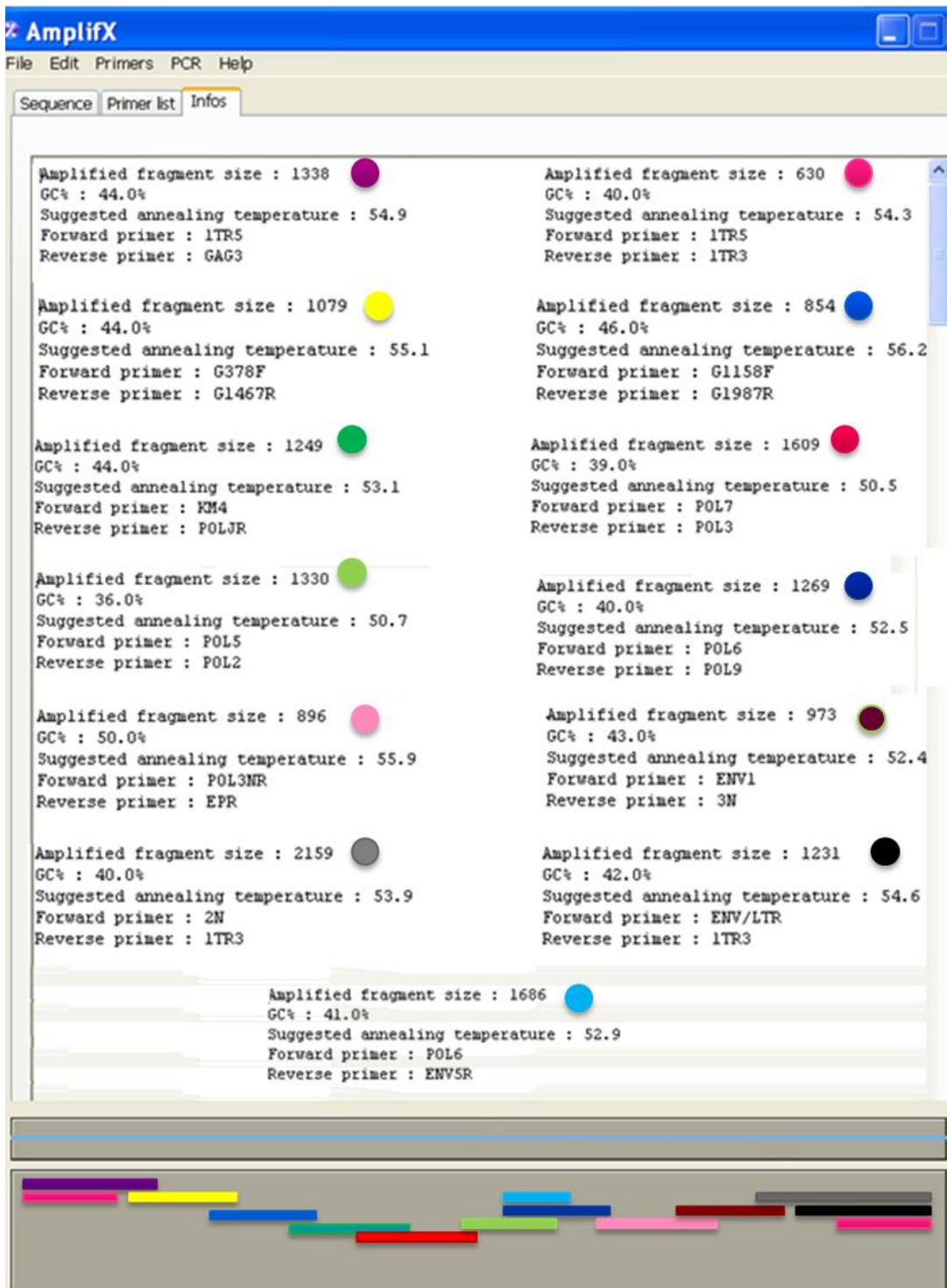


Fig. 16. PCR in silico para amplificar fragmentos de MMTV. Datos proporcionados utilizando el programa Amplifx, los círculos de color en los datos corresponden al color del fragmento amplificado.



Tabla 7. Programa para amplificación de los fragmentos de MMTV.

FASE	CICLOS	PASOS	
		TEMPERATURA (°C)	TIEMPO (MINUTOS)
1	1	95	04:00
2	35	94	00:45
		*	00:30
		72	01:30
3	1	72	10:00
4	1	4	∞

El * expresa la temperatura de alineamiento de la PCR la cual es variable dependiendo los *primers* y se encuentra en la tabla 8.

Tabla 8. Temperatura de alineamiento de los pares de primers para la amplificación de los fragmentos de MMTV.

Pares de primers	T.A.
LTR5-GAG3	55 °C
LTR5-LTR3	54.3 °C
G378F-G1467R	55 °C
G1158F-61987R	56.2 °C
KM4-POLJR	53 °C
POL 7-POL3	50.5 °C
POL5-POL2	50.5 °C
POL6-POL9	52.5 °C
POL6-ENV5R	53 °C
POL3NR-EPR	56.2 °C
ENV1-3N	52.5 °C
2N-LTR3	54 °C
ENV/LTR-LTR3	54.6 °C

Tabla 9. Condiciones para una PCR de alta fidelidad utilizando Platinum®PCR Super Mix.

Reactivo	Cantidad por reacción
Platinum PCR Super Mix	45 μ l
Primer sentido	2 μ l
Primer antisentido	2 μ l
Muestra	1 μ l
Volumen final	50 μ l

6.7 Electroforesis

Se realizó mediante el empleo de un gel de agarosa preparado al 1.2% y se corrió con buffer TE1X. El gel se corrió en un rango de 100mV a 200mV, en un período de 30 a 50 minutos, dependiendo del avance de las bandas. Además se usó marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen, California EUA) o 1Kb (Promega Corporation, Madison Wisconsin EUA) según corresponda y para una mejor resolución del tamaño del amplicón obtenido (Figura 17). El resultado se observó bajo una lámpara de luz UV y se fotodocumentó.

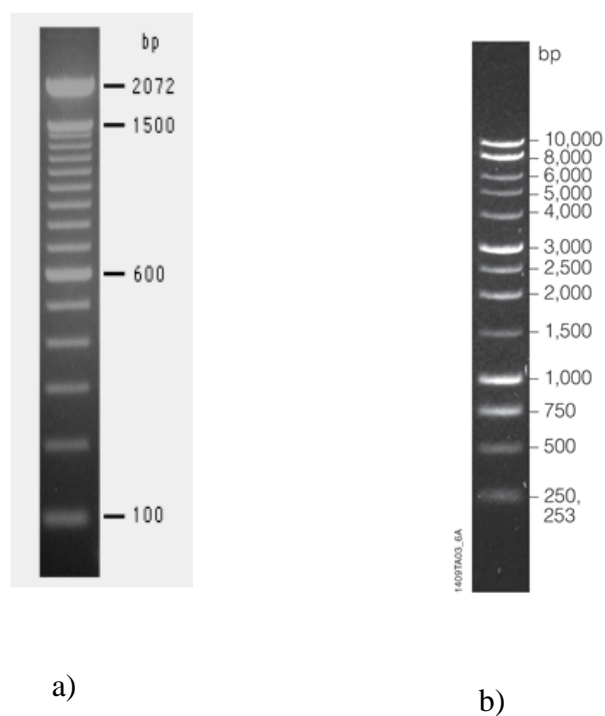


Fig. 17. Escalera de marcador de pares 100pb (a) y 1Kb (b) en un gel de agarosa a una concentración de 1%.



6.8 Purificación del fragmento.

La purificación de los productos de PCR para su secuenciación, se realizó por medio del kit Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification, (GE Healthcare Bio-Sciences Corp. Piscataway, NJ USA), llevando a cabo el siguiente procedimiento.

Se corrieron en un gel de agarosa al 1.2% 4 reacciones de cada producto de PCR (200 μ L) a secuenciar, posteriormente se cortaron las bandas de interés con ayuda de una navaja y se colocaron en un tubo tipo eppendorf de 1.6 mL. Se agregaron 300 μ L del Buffer de captura tipo 3 y se colocaron en un termoblock a una temperatura de 60°C, hasta disolver completamente la agarosa. Una vez disuelta la agarosa en el buffer se colocó el líquido en una columna de purificación acoplada a un tubo tipo eppendorf de 1.6 mL y se centrifugó a 14 000 rpm por 30 segundos, descartando el líquido recuperado en el tubo. Posteriormente se agregaron 500 μ L del Buffer de lavado tipo 1 a la columna y se centrifugó a 14 000 rpm por 30 segundos, descartando el líquido recuperado en el tubo. Al finalizar el lavado se agregaron 50 μ L del Buffer de elución tipo 3 en el centro de la membrana de la columna y se centrifugó a 14 000 rpm por 1 minuto, recuperando el producto de la purificación. Por último se cuantificó dicho producto en el Nanodrop, leyendo su concentración a 260nm y se obtuvo su índice de pureza a 260/280 nm.

6.9 Comparación de la secuencia de los fragmentos purificados con la secuencia de MMTV.

Los fragmentos purificados se enviaron a secuenciar al Instituto de Biotecnología, UNAM (Cuernavaca, Morelos), en una alícuota total de 15 μ L que contenían 14 μ L de la muestra (10 ng por cada 100pb) y 1 μ L del primer utilizado; enviando por ende 2 preparaciones por cada producto de PCR. Una vez secuenciados los fragmentos se compararon con la secuencia completa del virus (GenBank. Número de acceso M15122.1) por medio de los programas Bioedit, CLC Main Workbench 6 y por medio del programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) del NCBI (National Center for Biotechnology Information).

6.10 Estimulación de transcritos con Polybrene y DMSO.

Basados en la metodología descrita en la literatura (Kawai et Nishizawa, 1984), se plaquearon 8×10^5 células INER-51 en 2 mL de medio (DMEM. SFB al 10%, 1% antibiótico) utilizando placas de 60 mm. Se incubó a 37°C por 18 horas, pasado el tiempo de incubación, se retiró el medio y se agregó 1 mL de medio con Polybrene (0, 10, 20 o 30 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) incubándose por 6 horas a 37°C. Pasadas las 6 horas se retiró el medio y se agregaron 2mL de medio con DMSO a diferentes concentraciones (0, 10, 20 o 30%), incubándose a temperatura ambiente por 4 minutos. Al término del período de incubación, se realizó un lavado de las placas con 1mL de medio y se incubó con 2mL de medio a 37°C por 24 horas, al finalizar la incubación se realizó la extracción de RNA de cada una de las placas del experimento (Figura18).

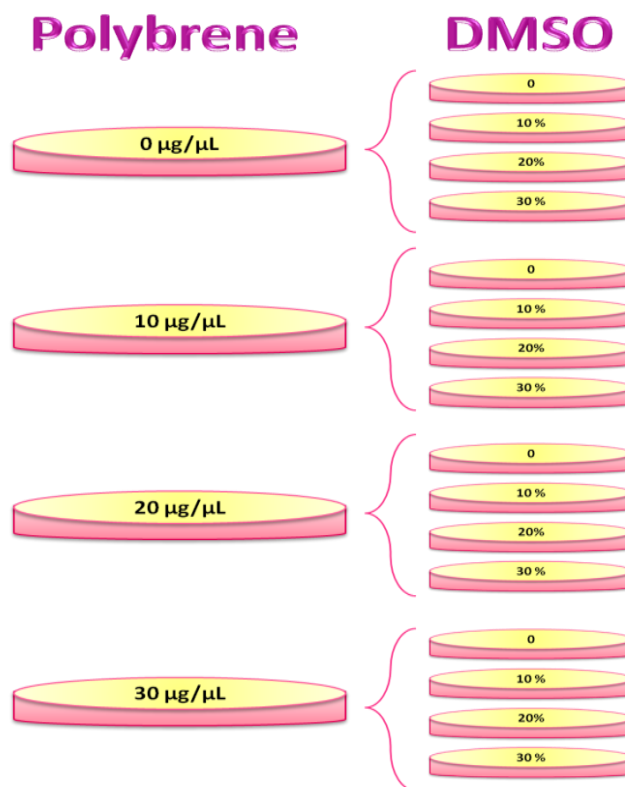


Fig. 18 Tratamientos con Polybrene y DMSO a células INER-51 para la estimulación de transcritos.



6.11 Extracción de RNA

Para la determinación de transcritos se realizó una extracción de RNA de la línea celular utilizando el método de extracción fenólica con TRIZOL (Reagent® Invitrogen Life Technologies, California EUA). Este método se basa en el uso de una solución monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina para la lisis de las células y la separación de la muestra en dos fases (acuosa y orgánica). Seguida de la extracción y precipitación de RNA total con cloroformo e isopropanol respectivamente a partir de la fase acuosa.

Para la obtención de la muestra se agregaron 300 μ L de TRIZOL a la caja de cultivo, hasta barrer con las células que se encuentran adheridas, posteriormente se absorben los 300 μ L, se introducen en un tubo eppendorf de 1.5mL al que previamente se le agregaron 700 μ L de TRIZOL para obtener un volumen total de 1mL. El tubo se sometió a centrifugación a 13000rpm por 3 minutos, posteriormente se transfirió el sobrenadante a un tubo eppendorf de 1.5mL, se le añadió 0.2 volúmenes de cloroformo, se dio un spin y se incubó a temperatura ambiente por espacio de 3 minutos; pasado este tiempo se centrifugó a 13 000 rpm por 5 minutos y se observaron dos fases, de las cuales se recuperó la fase superior en un tubo nuevo y se le adicionó 0.7 volúmenes de isopropanol (\pm 350 μ L), se mezcló por inversión 10 veces y se centrifugó a 13000 rpm por 5 minutos, descartando el sobrenadante. El pellet encontrado en el fondo del tubo se lavó con etanol 70% / agua DEPC y se centrifugó a 13000 rpm por 10 minutos, posteriormente se eliminó el etanol y se agregaron 30 μ L de Agua DEPC aumentándose la temperatura a 60°C por espacio de 30 min para resuspender de forma homogénea. Por último se corrió un gel de agarosa al 1.2% para observar el patrón de bandas característico de una extracción de RNA.



6.12 Cuantificación del RNA

Para este fin se utilizó un espectrofotómetro (Nanodrop 2000) en el cual se introducen 2 μL de la muestra y a partir de la concentración obtenida a 260 nm y tomando en cuenta el índice de pureza 260/280nm, se procede a realizar diluciones para obtener la concentración deseada.

6.13 Tratamiento con DNAsa libre de RNAsa

Se realizó un tratamiento al RNA extraído con el kit RQ1 RNase-free DNase 1Kb (Promega Corporation, Madison Wisconsin EUA), siguiendo el protocolo que se describe a continuación. En un tubo tipo eppendorf de 1.6 mL se agregó 1 μg del RNA (resuspendido en 8 μl de agua libre de nucleasas), 1 μL de RQ1 RNase-Free DNase 10x Buffer y 1 μL de RQ1 RNase-Free DNase para obtener un total de 10 μL . Se incubó a 37°C por 30 minutos, al término de la incubación se agregó 1 μL de RQ1 DNase Stop Solution, para detener la actividad de la DNAsa y se incubó por 10 minutos a 65°C, al finalizar la incubación se realizó RT-PCR para sintetizar cDNA.

6.14 Síntesis de cDNA

El cDNA se sintetizó a partir del RNA total obtenido de la extracción previamente realizada y tratada con la DNAsa libre de RNAsa, por medio de la transcripción reversa utilizando el kit High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystem, Carlsbad California USA).

Se preparó una mezcla con 2 μL del Buffer RT 10X, 0.8 μL de dNTPs mix (100mM), 2 μl de Random Primers 10x, 1 μL de Multiscribe RT 50 U/ μL y 4.2 μL de H₂O. Se mezclaron 10 μL del mix con 10 μL del RNA (100ng/ μL) para dar un volumen total de 20 μL . Se incubó a 25°C por 10 minutos seguidos de un período de incubación de 2 horas a 37°C.



6.15 Búsqueda de transcritos

Para la búsqueda de transcritos se realizó primeramente un PCR para gen constitutivo G3PDH y posteriormente se realizaron PCRs punto final y anidado utilizando el cDNA sintetizado.

Los pares de *primers* utilizados fueron 01-03 y 5L-3L para la región *env*, G1158-G1987 para la región *gag* y POL6-POL9 para la región génica *pol*. Los productos de PCR se observaron en un gel de agarosa bajo las condiciones ya mencionadas.

6.15 Análisis filogenético para la región génica *env*

El análisis filogenético para la región génica *env* (554pb) se realizó alineando un fragmento de 552 pb de *env* del MMTV presente en la línea celular INER-51, con secuencias de MMTV presentes en pacientes con patologías pulmonares humanas (adenocarcinoma pulmonar e infiltrado inflamatorio agudo), secuencias de MMTV de GenBank de pacientes con cáncer de mama de 2 regiones geográficas diferentes (Australia y Estados Unidos de América) y una secuencia de la región génica *env* de HERVK-10 que fue utilizado como grupo externo y para dar raíz al árbol. El alineamiento se realizó por medio de MUSLE utilizando el programa MEGA 5. Posterior al alineamiento se realizó un análisis filogenético por el método de Neighbor joining el cual nos dice la distancia genética entre una secuencia y la otra, el objetivo fundamental de este método es poder identificar individuos cuando se desconoce la especie a la que pertenecen. El estudio se realizó con un “Bootstrap” de 1000 repeticiones utilizando el programa MEGA 5. El “Bootstrap” se usa para encontrar soporte estadístico de los clados mediante un sub-muestreo de los datos obteniendo réplicas de los mismos y construyendo árboles para cada una de las réplicas. Esta metodología permite determinar qué tan confiables son las relaciones deducidas a partir de los datos; un “Bootstrap” de 80% en este caso, indica que al correr 1000 veces el mismo análisis, el clado aparece de la misma forma 800 veces, tomando como un buen “Bootstrap” un valor por encima de 40%. La edición del árbol se realizó por medio del programa FigTree.



6.16 Análisis filogenético para la región reguladora *LTR*

Para el análisis filogenético de la región reguladora se alineó un fragmento 352 pb de la región reguladora 5' del MMTV presente en la línea celular INER-51, con secuencias de MMTV presentes en pacientes con patologías pulmonares humanas (adenocarcinoma pulmonar e infiltrado inflamatorio agudo), secuencias de MMTV de GenBank asociadas a otras patologías en humano (linfoma no Hodgkin y cáncer de mama) y con un fragmento LTR de XMRV que fue utilizado como grupo externo. El alineamiento se realizó por medio de MUSLE utilizando el programa MEGA 5. Posterior al alineamiento se realizó un análisis filogenético por el método de Neighbor joining y con un "Bootsrap" de 1000 utilizando el programa MEGA 5. La edición del árbol se realizó por medio del programa FigTree.

RESULTADOS

7.1 Amplificación de G3PDH en las muestras y en la línea celular INER-51.

Se realizó una PCR para amplificar el gen constitutivo control, G3PDH, del DNA extraído de la línea celular INER-51. La línea celular INER-51 mostró una amplificación exitosa de un producto de PCR de 452pb (Ver Figura 19).

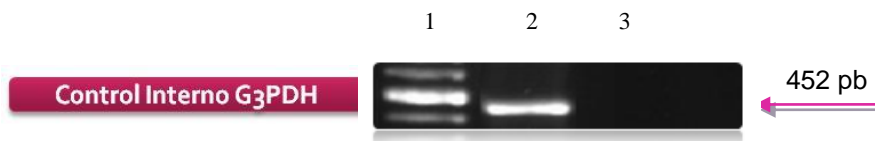


Fig.19 Productos de PCR de la línea celular INER-51 utilizando *primers* específicos para G3PDH: Carril 1: marcador de peso molecular (100pb), carril 2: línea celular INER-51, carril 3: control negativo.

7.2 Amplificación de regiones génicas y reguladoras de MMTV en la línea INER-51.

Se realizó PCR para amplificar las regiones génicas y reguladoras de MMTV en la línea celular INER-51. Para la región reguladora 5' se observaron amplificaciones exitosas de los productos esperados (Ver Figura 20).

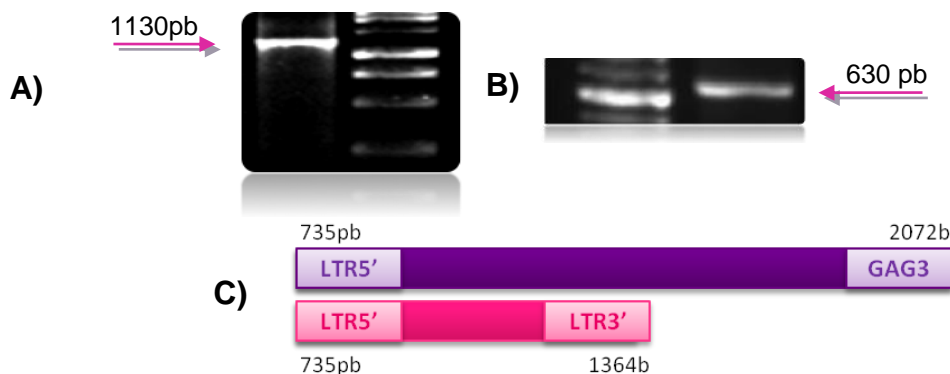


Fig. 20. A) Productos de PCR de la línea celular INER-51 utilizando los *primers* para MMTV “*LTR5'*” y “*GAG3*”. Carril 1: INER-51, carril 2: marcador de peso molecular (1Kb) .B) Productos de la PCR semianidada del producto de *LTR5'-GAG3*, utilizando los *primers* “*LTR5'*” y “*LTR3'*”. Carril 1: marcador de peso molecular (100 pb), carril 2: INER-51. C) Ubicación de *primers* para primer PCR y PCR anidada.

Se amplificó la región génica *gag* con la ayuda de los *primers* previamente descritos, observándose los productos esperados (Ver Figura 21).

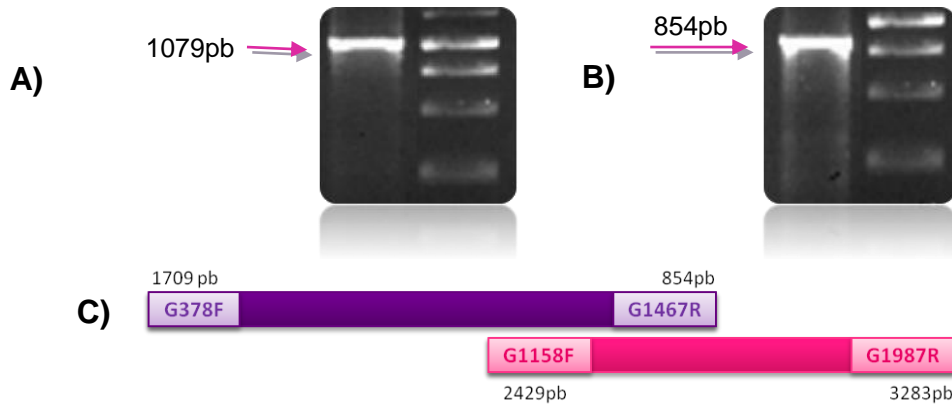


Fig. 21. A) Productos de PCR de la línea celular INER-51 utilizando los *primers* para MMTV “G378F” y “G1467R”. Carril 1: INER-51, carril 2: marcador de peso molecular (1Kb). B) Productos de PCR, utilizando los *primers* “G1158F” y “G1987R”. Carril 1: INER-51, carril 2: marcador de peso molecular (1Kb), C) Ubicación de *primers* para ambos PCRs.

La región génica *pol* se amplificó utilizando 5 juegos de *primers*, observándose de los productos esperados (Ver Figura 22-24).

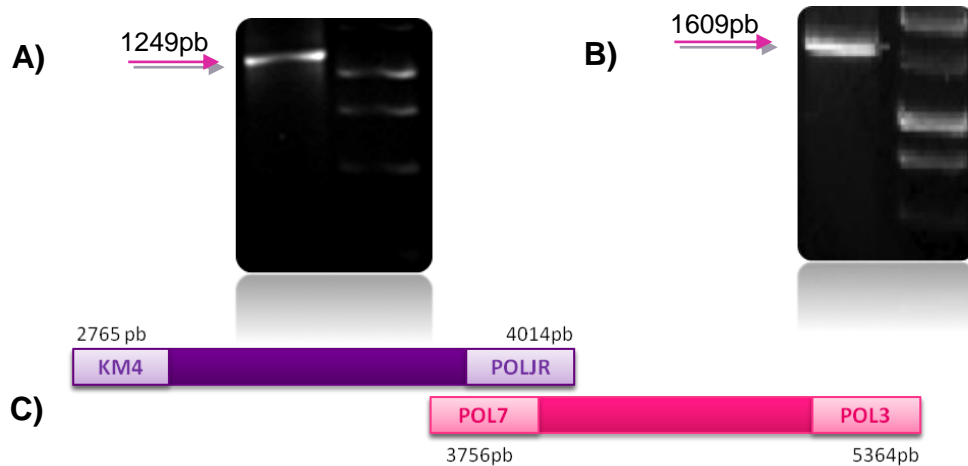


Fig. 22. A) Productos de PCR de la línea celular INER-51 utilizando los *primers* para MMTV “KM4” y “POLJR”. Carril 1: INER-51, carril 2: marcador de peso molecular (1Kb). B) Productos de PCR, utilizando los *primers* “POL7” y “POL3”. Carril 1: INER-51, carril 2: marcador de peso molecular (1Kb), C) Ubicación de *primers* para ambos PCRs.

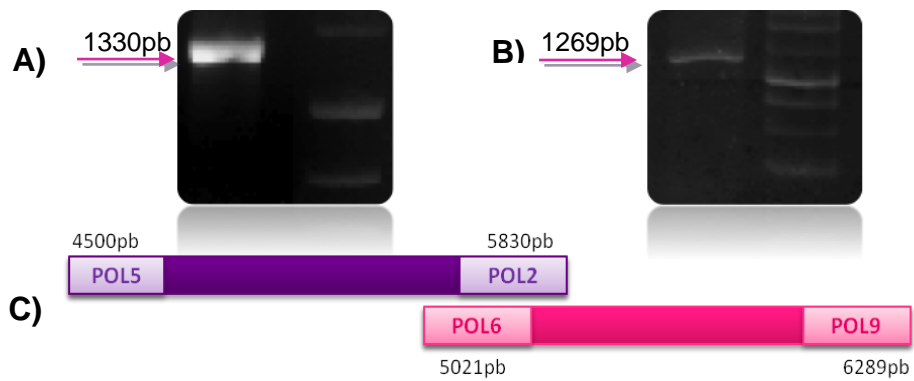


Fig. 23A) Productos de PCR de la línea celular INER-51 utilizando los *primers* para MMTV “POL5” y “POL2”. Carril1: INER-51, carril 2: marcador de peso molecular (1Kb). B) Productos de PCR, utilizando los *primers* “POL6” y “POL9”. Carril 1: INER-51, carril 2: marcador de peso molecular (1Kb), C) Ubicación de *primers* para ambos PCRs

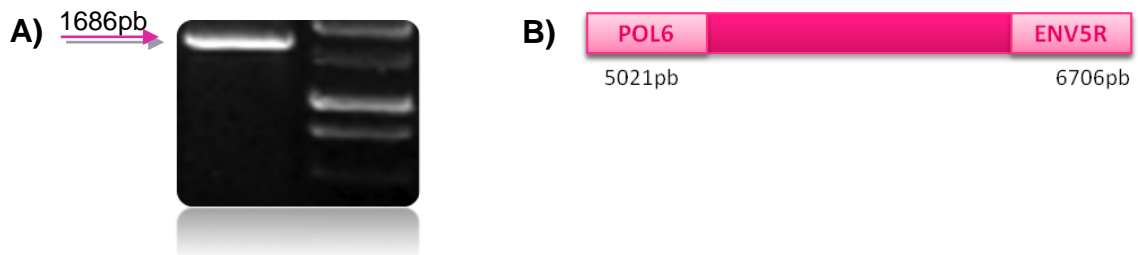


Fig. 24 A) Productos de PCR de la línea celular INER-51 utilizando los *primers* para MMTV “POL6” y “ENV5R”. Carril1: INER-51, carril 2: marcador de peso molecular (1Kb). B) Ubicación de *primers* para la reacción.

Para amplificar la región génica *env*, que codifica para la proteína de envoltura, y la región reguladora 3' se usaron 5 juegos de *primers*, observándose de los productos esperados (Ver Figura 25-27).

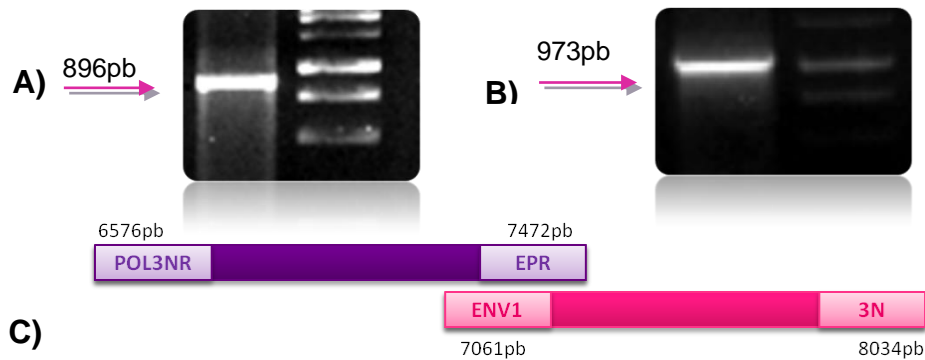


Fig.25 A) Productos de PCR de la línea celular INER-51 utilizando los *primers* para MMTV “POL3NR” y “EPR”. Carril1: INER-51, carril 2: marcador de peso molecular (1Kb). B) Productos de PCR, utilizando los *primers* “ENV1” y “3N”. Carril1: INER-51, carril 2: marcador de peso molecular (1kb). C) Ubicación de *primers* para ambos PCRs.

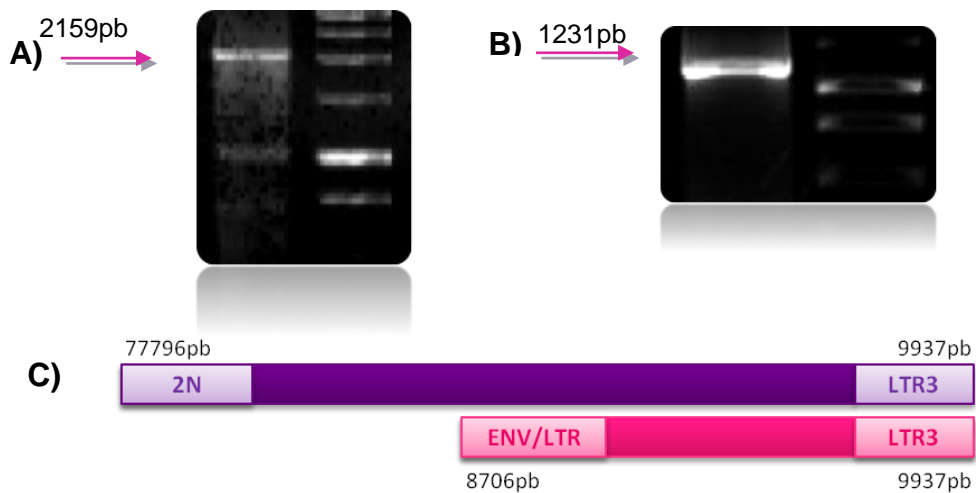


Fig. 26 A) Productos de PCR de la línea celular INER-51 utilizando los *primers* para MMTV “2N” y “LTR3”. Carril1: INER-51, carril 2: marcador de peso molecular (1Kb). B) Productos de PCR, utilizando los *primers* “ENV/LTR” y “LTR3”. Carril1: INER-51, carril 2: marcador de peso molecular (1Kb). C) Ubicación de *primers* para ambos PCRs.

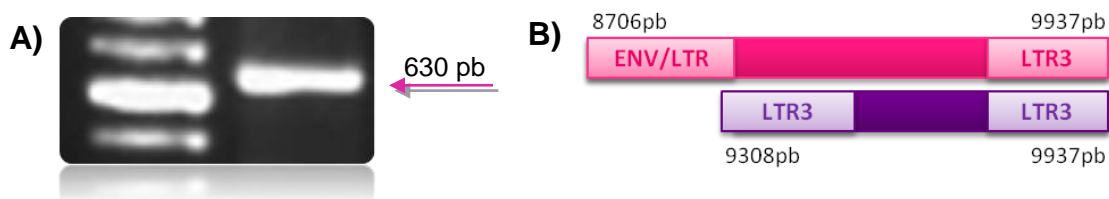


Fig. 27. A) Productos de la PCR semianidada del producto de *ENV/LTR'-LTR3*, utilizando los *primers* “*LTR5*” y “*LTR3*”. Carril 1: marcador de peso molecular (100 pb), carril 2: INER-51. C) Ubicación de *primers* para primer PCR y PCR anidada.

7.3 Comparación de las secuencias obtenidas del provirus con la secuencia reportada para MMTV en el GenBank

Los fragmentos amplificados y purificados se enviaron al Instituto de Biotecnología de Cuernavaca Morelos para su secuenciación. El cromatograma de la secuencia de cada uno de los fragmentos se analizó por medio del programa Bioedit, observándose una buena señal que no presentaba ruido de fondo.

Las secuencias analizadas se traslaparon para obtener una secuencia final de 9167 pb. La secuencia completa (9167pb) fue analizada por medio de los programas Bioedit, CLC Main Workbench 6 y por medio del programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) del NCBI (National Center for Biotechnology Information) indicando el porcentaje de identidad con MMTV (No. de acceso M15122.1) y los nucleótidos impares (**Figura 28**).



MMTV (M15122.1)	GGGACTTATA	GGGGACCTTA	CATCTACAGA	CCAACAGATG	CCCCCTTACC	GTATACAGGA	60
MMTV (INER-51)GC.....	A.....	60
		80		100		120	
MMTV (M15122.1)	AGATATGACC	TAAATTTTGA	TAGGTGGGTC	ACAGTCAATG	GCTATAAAGT	GTTATACAGG	120
MMTV (INER-51)TTA	120
		140		160		180	
MMTV (M15122.1)	TCCCTCTCCT	TTCGTGAAAG	GCTCGCCAGG	GCTAGACCTC	CTTGGTGTAT	GTTGACTCAG	180
MMTV (INER-51)CAGA	180
		200		220		240	
MMTV (M15122.1)	GAAGAGAAAA	ACGACATGAA	ACAACAGGTA	CATGATTATA	TTTATTTGGG	AACAGGAAATG	240
MMTV (INER-51)A...GCA	240
		260		280		300	
MMTV (M15122.1)	AGCAGCATTT	GGGGAAAGAT	TTTTCAT---	ACCAAGGAGA	GGACAGTGGC	TGCACTAATA	297
MMTV (INER-51)	.A.G- - -TATGAG...T	297
		320		340		360	
MMTV (M15122.1)	GAGCACTATT	CTGCAAAGAC	TTATGGCATG	AGTTATTATG	ATTAGCCTTT	ATTAGCCCAA	357
MMTV (INER-51)	.A.....G.TTG.A	GA.AG	357
		380		400		420	
MMTV (M15122.1)	TCTTGTGGTT	CCCAAGGTTT	AAGTAAGTTC	ATGGTCACAG	ACTGTTCTTA	AAACAAGGAT	417
MMTV (INER-51)	C.....CA	417
		440		460		480	
MMTV (M15122.1)	GTGAGACAAG	TGGTTTCCTG	ACTTGGCTTG	GTATCAAATG	TTTTGATCTA	AGCTCTAAAT	477
MMTV (INER-51)TG	477
		500		520		540	
MMTV (M15122.1)	GCTCTAACCT	CCTATGTTCT	TTTGGATTCT	ATCCAAGTTT	TATGTAAATG	CTTATGTAAA	537
MMTV (INER-51)	.T.....A	537
		560		580		600	
MMTV (M15122.1)	CCATGATATA	AAAGAGTGCT	AAATTTTGA	GTAACCTTGC	AACAGTCCTA	ACATTCACCT	597
MMTV (INER-51)	G.T	597
		620		640		660	
MMTV (M15122.1)	CTCGTGTGTT	TGTGTCTGTT	CGCCATCCCG	TCTCCGCTCG	TCACCTATCC	TTCACCTTCC	657
MMTV (INER-51)	657
		680		700		720	
MMTV (M15122.1)	AGAGGGTCCC	CCCCGAGACC	CCGGTGACCC	TCAGGTCCGC	CGACTGCCGC	AGCTGGCGCC	717
MMTV (INER-51)	717
		740		760		780	
MMTV (M15122.1)	CGAACAGGGA	CCCTCGGATA	AGTGACCCTT	GTCTCTATTT	CTACTATTTT	GTGTTGCTCT	777
MMTV (INER-51)G	777
		800		820		840	
MMTV (M15122.1)	TGTTTTGTCT	CTATCTTATC	TGGCTATTAT	CACAAGAGCG	GAACGGACTC	ACCACAGGGA	837
MMTV (INER-51)	...A.....C.GC	837
		860		880		900	
MMTV (M15122.1)	ACTGCAGTCT	CGCCTACAGA	GAAGAGGTAG	GTTACGGTGA	GCCATTGGAA	ATGGGGGTCT	897
MMTV (INER-51)	G.....CG	897
		920		940		960	
MMTV (M15122.1)	CGGGATCAAA	AGGGCAGAAA	CTCTTTGTTT	CTGTTCTACA	AAGACTCCTC	TCAGAGAGGG	957
MMTV (INER-51)CTG	957
		980		1,000		1,020	
MMTV (M15122.1)	GTCTTCATGT	GAAAGAGAGC	AGTGCAATAG	AGTTTTATCA	GTTCTTAATA	AAGGTCTCTC	1017
MMTV (INER-51)T.C	1017
		1,040		1,060		1,080	
MMTV (M15122.1)	CTTGGTTTCC	CGAAGAAGGA	GGATTAAATT	TACAAGATTG	GAAAAGGGTG	GGAAGAGAGA	1077
MMTV (INER-51)AA	1077
		1,100		1,120		1,140	
MMTV (M15122.1)	TGAAGAGGTA	CGCAGCAGAA	CATGGGACGG	ATAGTATACC	AAAGCAGGCT	TACCCCATTT	1137
MMTV (INER-51)GACA	1137
		1,160		1,180		1,200	
MMTV (M15122.1)	GGCTTCAGTT	GAGAGAGATA	CTGACAGAGC	AATCAGACTT	GGTTTTGTTA	TCTGCAGAAG	1197
MMTV (INER-51)CC	1197
		1,220		1,240		1,260	
MMTV (M15122.1)	CCAAGTCCGT	GAAGTGAAGAG	GAATTAGAGG	AAGGTTTAAAC	CGGACTACTA	TCGACAAGTT	1257
MMTV (INER-51)A.T	T.C	A	1257
		1,280		1,300		1,320	
MMTV (M15122.1)	CACAGGAAAA	AACCTTATGGG	ACTAGGGGAA	CAGCATATGC	AGAAATAGAT	ACAGAGGTAG	1317
MMTV (INER-51)AC	1317

Fig. 28 (Parte1) Comparación de la secuencia del provirus de MMTV en la línea INER-51 con la secuencia de MMTV (GenBank. Número de acceso M15122.1) (1-1317nt). Se observa en color rosa la variación nucleotídica.



MMTV (M15122.1)	ACAAGCTGTC	TGAACATATT	TATGATGAAC	CATATGAAGA	AAAGGAGAAG	GCAGATAAAA	1377
MMTV (INER-51)	1377
MMTV (M15122.1)	ATGAGGAAAA	GGACCATGTT	AGAAAAATAA	AGAAGGTAGT	ACAAAGAAAA	GAAATAGTGT	1437
MMTV (INER-51)G.....	1437
MMTV (M15122.1)	AGGGTAAGAG	AAAAGAGAAG	GATTCAAAGG	CCTTTTTAGC	CACAGATTGG	AACGATGATG	1497
MMTV (INER-51)CA.....	1497
MMTV (M15122.1)	ACCTGTCCCC	TGAGGATTGG	GACGATTTAG	AGGAACAAGC	GGCACATTAT	CATGATGATG	1557
MMTV (INER-51)T.....	1557
MMTV (M15122.1)	ATGAGCTAAT	CCTTCCAGTA	AAAAGGAAGG	TGGTTAAGAA	GAAACCTCAG	GCACTCAGAA	1617
MMTV (INER-51)	1617
MMTV (M15122.1)	GGAAACCCCT	GCCTCCGGTG	GGTTTTGCAG	GAGCGATGGC	AGAGGCCAGG	GAAAAAGGAG	1677
MMTV (INER-51)G.....	1677
MMTV (M15122.1)	ATTTGACTTT	TACGTTTCTT	GTAGTTTTTA	TGGGAGAGAG	TGATGAAGAT	GACACGCCCTG	1737
MMTV (INER-51)A.....T.....T.....	1737
MMTV (M15122.1)	TTTGGGAACC	GCTGCCATTG	AAAACCTTAA	AGGAATTGCA	ATCGGCAGTT	AGGACCATGG	1797
MMTV (INER-51)A.....T.....A.....	1797
MMTV (M15122.1)	GACCATCTGC	TCCCTACACC	CTGCAGGTGG	TAGACATGGT	GGCTAGTCAA	TGGCTCACCC	1857
MMTV (INER-51)A.....T.....A.....T.....	1857
MMTV (M15122.1)	CGAGTGACTG	GCACCAAACA	GCCAGAGCTA	CCTTGTCTCC	TGGAGACTAT	GTTTTATGGA	1917
MMTV (INER-51)T.....A..C..G..T.....	1917
MMTV (M15122.1)	GAACTGAATA	TGAAGAGAAA	AGTAAAGAAA	TGGTACAAAA	GGCTGCAGGC	AAGCGAAAGG	1977
MMTV (INER-51)	..G.....CA.....C.....	1977
MMTV (M15122.1)	GCAAGGTCTC	TCTTGATATG	TTACTGGGGA	CTGGCCAATT	CCTGTCCCCT	TCTTCTCAGA	2037
MMTV (INER-51)C.....C.....T..G..T.....	2037
MMTV (M15122.1)	TAAAATTGTC	TAAGGATGTC	TTAAAAGATG	TCACCACAAA	TGCTGTGTTA	GCATGGAGGG	2097
MMTV (INER-51)	..C.....A..A.....	2097
MMTV (M15122.1)	CCATTCCGCC	TCCTGGAGTT	AAAAAGACTG	TATTAGCAGG	ATTAAACAG	GGAAATGAAG	2157
MMTV (INER-51)	..A.....C.....G.....	2157
MMTV (M15122.1)	AGTCTTATGA	GACTTTCATT	TCAAGGCTCG	AGGAAGCTGT	TTACCGAATG	ATGCCAGAG	2217
MMTV (INER-51)	..A.....	..A.....A..T..TA.....A.....	2217
MMTV (M15122.1)	GGGAAGGGTC	GGATATATTG	ATCAAACAAT	TGGCGTGGGA	GAATGCAAA	TCATTGTGTC	2277
MMTV (INER-51)	..A..G..A..	..A.....A.....	2277
MMTV (M15122.1)	AGGATCTCAT	CGGCCAATA	CGTAAAACAG	GAACTATACA	GGATTATATT	CGTGCTTGTC	2337
MMTV (INER-51)T.....C.....C.....	2337
MMTV (M15122.1)	TGGACGCTTC	TCCCGCAGTT	GTTCAGGGTA	TGGCATATGC	AGCAGCCATG	AGAGGACAAA	2397
MMTV (INER-51)	..T.....	2397
MMTV (M15122.1)	AGTATTCTAC	CTTTGTAAG	CAAACATATG	GTGGGGGAAA	AGGAGGTCAA	GGAGCAGAAG	2457
MMTV (INER-51)T.....	2457
MMTV (M15122.1)	GGCCAGTTTG	TTTTTCTGT	GGTAAGACAG	GACACATCAG	AAAAGACTGT	AAGGATGAAA	2517
MMTV (INER-51)T.....A.....G..CG	2517
MMTV (M15122.1)	AGGGCTCAAA	AAGGGCCCCT	CCTGGGCTCT	GCCCCAGATG	TAAGAAAGGC	TATCACTGGA	2577
MMTV (INER-51)T.....	2577
MMTV (M15122.1)	AGAGTGAGTG	TAAATCTAAA	TTTGACAAAG	ATGGGAATCC	ACTTCCTCCC	TTGAAACTA	2637
MMTV (INER-51)A..A..	2637

Fig. 28 (Parte2) Comparación de la secuencia del provirus de MMTV en la línea INER-51 con la secuencia de MMTV

(GenBank. Número de acceso M15122.1) (1318-2637nt). Se observa en color rosa la variación nucleotídica.



MMTV (M15122.1)	ATGCTGAAAA	TTCAAAAAAC	TTGTAAAGGG	GCAGTCCCCT	AGCCCCGCTC	AAAAGGGGGA	2697
MMTV (INER-51)	2697
MMTV (M15122.1)	TGGAGTTAAG	GGCTCAGGAT	TAAATCCTGA	AGCCCCACCT	TTCACAATAC	ATGATTTGCC	2757
MMTV (INER-51)	..AA.A.....	..A.....	2757
MMTV (M15122.1)	TCGAGGCACC	CCTGGAAGTG	CAGGTTTAGA	CCTGTCATCA	CAGAAGGATT	TGATCCTCTC	2817
MMTV (INER-51)C.....G.C.....	2817
MMTV (M15122.1)	TCTAGAAGAT	GGAGTATCAT	TGGTACCCAC	CTTAGTGAAA	GGCACCTCC	CTGAAGGGAC	2877
MMTV (INER-51)GC.A.....T.....	2877
MMTV (M15122.1)	TACTGGACTA	ATAATAGGTA	GAAGTTCTAA	TTATAAAAAG	GGACTTGAGG	TTTTACCAGG	2937
MMTV (INER-51)	C.....T..G.....C..	2937
MMTV (M15122.1)	AGTCATTGAC	TCCGATTTC	AAGGAGAAAT	CAAGGTTATG	GTTAAGGCCG	CAAAAAATGC	2997
MMTV (INER-51)	G.....	2997
MMTV (M15122.1)	GGTCATCATT	CACAAAGGAG	AAAGAATAGC	ACAACCTGCTG	TTGCTGCCAT	ATTTAAAT	3057
MMTV (INER-51)A.....	3057
MMTV (M15122.1)	ACCCAATCCT	GTAATCAAGG	AAGAACGAGG	CTCAGAAGGC	TTCGGATCAA	CAAGTCATGT	3117
MMTV (INER-51)	G.....	A.....	3117
MMTV (M15122.1)	GCATTGGGTG	CAGGAAATAA	GTGACTCCAG	ACCCATGCTT	CACATTTACT	TAAATGGAAG	3177
MMTV (INER-51)	A.....T.T.....T.....G.....	3177
MMTV (M15122.1)	AAGATTCCTC	GGTCTCTTGG	ATACCGGGGC	AGATAAAACT	TGCATAGCAG	GCAGAGACTG	3237
MMTV (INER-51)A.....T.A.....	3237
MMTV (M15122.1)	GCCAGCTAAT	TGGCCCATTC	ACCAAACTGA	GAGTTCTCTT	CAAGGTTTAG	GCATGGCCTG	3297
MMTV (INER-51)A.A.....C.....	3297
MMTV (M15122.1)	TGGGGTGGCG	CGTAGTAGTC	AGCCACTCCG	TTGGCAACAT	GAGGATAAAT	CAGGAATTAT	3357
MMTV (INER-51)A.....C.....G.....	3357
MMTV (M15122.1)	ACATCCTTTT	GTGATCCCTA	CACTGCCTTT	CACCTTATGG	GGAAGAGATA	TTATGAAAGA	3417
MMTV (INER-51)C.....G.....C.....	3417
MMTV (M15122.1)	TATAAAGGTC	AGATTGATGA	CAGACTCACC	AGATGATTCA	CAGGATTTAT	GATAGGGGCC	3477
MMTV (INER-51)	G.....G.A.....T.....T.....	3477
MMTV (M15122.1)	ATTGAGAGCA	ATCTCTTTGC	AGACCAAATA	TCTTGAAGT	CAGACCAGCC	TGTATGGCTT	3537
MMTV (INER-51)A.....A.....	3537
MMTV (M15122.1)	AATCAATGGC	CCCTTAAACA	AGAAAAGTTA	CAGGCTTTAC	AACAGTTAGT	GACAGAACAA	3597
MMTV (INER-51)	3597
MMTV (M15122.1)	TTACAACCTGG	GCCACTTAGA	AGAGAGCAAT	AGCCCTTGGA	ATACGCCTGT	TTTTGTCAAT	3657
MMTV (INER-51)	3657
MMTV (M15122.1)	AAAAAGAAGT	CAGGAAAATG	GAGACTGTTA	CAAGACCTAC	GTGCAGTTAA	TGCTACAATG	3717
MMTV (INER-51)	3717
MMTV (M15122.1)	CACGATATGG	GAGCATTACA	ACCCGGCTTG	CCGTCCCCTG	TAGCAGTCCC	TAAAGGATGG	3777
MMTV (INER-51)	3777
MMTV (M15122.1)	GAAATAATCA	TAATAGATCT	ACAAGATTGC	TTTTTTAATA	TAAACTGCA	TCCTGAAGAT	3837
MMTV (INER-51)	3837
MMTV (M15122.1)	TGTAAGAGAT	TTGCTTTTAG	TGTGCCCTCC	CCTAATTTTA	AGAGACCTTA	TCAAAGATTC	3897
MMTV (INER-51)	...G.....A.....	3897
MMTV (M15122.1)	CAATGGAAAG	TTTTGCCCCA	GGGTATGAAA	AATAGCCCTA	CTTTATGTCA	AAAAATTTGTG	3957
MMTV (INER-51)	..G.....A.....	3957

Fig.28 (Parte3) Comparación de la secuencia del provirus de MMTV en la línea INER-51 con la secuencia de MMTV (GenBank. Número de acceso M15122.1) (2638-3957 nt). Se observa en color rosa la variación nucleotídica



		3,980		4,000		4,020	
MMTV (M15122.1)	GACAAAGCTA	TATTGACTGT	AAGGGATAAA	TACCAAGACT	CATATATTGT	GCATTACATG	4017
MMTV (INER-51)	. . . T T	4017
		4,040		4,060		4,080	
MMTV (M15122.1)	GATGACATTC	TTTTGGCACA	CCCATCAAGA	TCCATTGTCG	ATGAAATACT	TACTTCCATG	4077
MMTV (INER-51) T	4077
		4,100		4,120		4,140	
MMTV (M15122.1)	ATACAGGCC	TAAACAAACA	TGGCCTTGTA	GTATCCACAG	AGAAGATTCA	AAAATATGAT	4137
MMTV (INER-51)	4137
		4,160		4,180		4,200	
MMTV (M15122.1)	AATCTCAAAT	ATTTGGGAAC	TCATATACAG	GGTGATTGAG	TGTCTTATCA	AAAATTACAG	4197
MMTV (INER-51) G T G	4197
		4,220		4,240		4,260	
MMTV (M15122.1)	ATTAGGACAG	ATAAATTAAG	AACCTTAAAT	GATTTCCAAA	AGCTATTAGG	AAATATTAAT	4257
MMTV (INER-51) C	4257
		4,280		4,300		4,320	
MMTV (M15122.1)	TGGATACGTC	CTTCTTAAA	ATTAACACAG	GGAGAGTTAA	AACCTCTCTT	TGAAATTCCT	4317
MMTV (INER-51) C	4317
		4,340		4,360		4,380	
MMTV (M15122.1)	AATGGAGATT	CTAATCCGAT	CTCAACAAGA	AAACTTACTC	CTGAGGCATG	CAAAGCTCTT	4377
MMTV (INER-51) C T T	4377
		4,400		4,420		4,440	
MMTV (M15122.1)	CAATTAATGA	ATGAGAGACT	ATCTACCGCT	CGGGTAAAGA	GGCTAGATTT	ATCACAGCCT	4437
MMTV (INER-51)	4437
		4,460		4,480		4,500	
MMTV (M15122.1)	TGGTCTCTAT	GTATATTAAG	GACTGAATAT	ACCCCCACAG	CATGCCTCTG	GCAGGATGGA	4497
MMTV (INER-51) A	4497
		4,520		4,540		4,560	
MMTV (M15122.1)	GTTGTAGAAT	GGATACATTT	GCCTCATATT	TCACCAAAGG	TGATTACTCC	TTATGATATC	4557
MMTV (INER-51) C A	4557
		4,580		4,600		4,620	
MMTV (M15122.1)	TTTTGTACAC	AACTTATTAT	TAAGGGCCGA	CACCGCTCTA	AAGAATTATT	TAGTAAAGAC	4617
MMTV (INER-51)	4617
		4,640		4,660		4,680	
MMTV (M15122.1)	CCTGATTATA	TTGTTGTGCC	CTACACCAA	GTTCAATTTG	ATCTCCTATT	ACAAGAAAAG	4677
MMTV (INER-51)	4677
		4,700		4,720		4,740	
MMTV (M15122.1)	GAAGATTGGC	CTATTTCTTT	ATTAGGGTTC	TTGGGAGAGG	TTCATTTCCA	TCTTCCAAAA	4737
MMTV (INER-51)	4737
		4,760		4,780		4,800	
MMTV (M15122.1)	GACCCTTTGC	TTACATTTAC	CCTACAAACT	GCCATTATTT	TTCTCACAT	GACCTCTACC	4797
MMTV (INER-51)	4797
		4,820		4,840		4,860	
MMTV (M15122.1)	ACACCACTAG	AGAAAGGAAT	TGTGATTTTT	ACAGACGGGT	CAGCAAATGG	CCGTTCCGTA	4857
MMTV (INER-51) G	4857
		4,880		4,900		4,920	
MMTV (M15122.1)	ACATATATAC	AAGGAAGGGA	GCCTATAAAT	AAAGAAAATA	CACAAAACAC	AGCCCAACAG	4917
MMTV (INER-51)	4917
		4,940		4,960		4,980	
MMTV (M15122.1)	GCTGAAATTG	TGGCAGTCAT	TACAGCCTTT	GAGGAAGTGA	GTCACCCTT	TAATTTGTAT	4977
MMTV (INER-51) T	4977
		5,000		5,020		5,040	
MMTV (M15122.1)	ACTGATTCTA	AATATGTGAC	AGGGTTGTTT	CCCGAAATCG	AAACTGCAAC	TTTGTCAACC	5037
MMTV (INER-51) T	5037
		5,060		5,080		5,100	
MMTV (M15122.1)	AGAACA AAAA	TTACACAGA	ACTGAAACAT	TTACAAAGGT	TAATCCACAA	GAGACAAGAA	5097
MMTV (INER-51)	5097
		5,120		5,140		5,160	
MMTV (M15122.1)	AAATTTTACA	TTGGTCATAT	CAGAGGACAC	ACTGGACTTC	CCGGTCCTTT	GGCACAGGGA	5157
MMTV (INER-51)	5157
		5,180		5,200		5,220	
MMTV (M15122.1)	AATGCCTATG	CAGATTCCTT	AACAAGAATT	CTGACCGCTT	TAGAGTCAGC	TCAAGAAAGC	5217
MMTV (INER-51) C A	5217
		5,240		5,260		5,280	
MMTV (M15122.1)	CACGCACTAC	ATCATCAAAA	TGCCGCGGCG	CTTAGGTTTC	AGTTTCACAT	CACTCGTGAA	5277
MMTV (INER-51)	5277

Fig. 28 (Parte4) Comparación de la secuencia del provirus de MMTV en la línea INER-51 con la secuencia de MMTV (GenBank. Número de acceso M15122.1) (3958-5277 nt). Se observan en color rosa la variación nucleotídica.



MMTV (M15122.1)	CACGCACTAC	ATCATCAAAA	TGCCGCGGCG	CTTAGGTTTC	AGTTTCACAT	CACTCGTGAA	5277
MMTV (INER-51)	5277
MMTV (M15122.1)	CAAGCGCGAG	AAATAGTAAA	ATTATGTCC	AATTGCCCG	ACTGGGGGCA	CGCGCCGCAA	5337
MMTV (INER-51)A.....C.....	5337
MMTV (M15122.1)	TTAGGGGTAA	ACCCAGGGG	CCTTAAGCCC	CGAGTTCTAT	GGCAAATGGA	TGTTACTCAT	5397
MMTV (INER-51)	5397
MMTV (M15122.1)	GTTTCAGAAT	TTGGAAAATT	AAAATATGTA	CATGTGACAG	TGGATACTTA	TTCTCATTTT	5457
MMTV (INER-51)	..C.....G..C.....A.....C.....	5457
MMTV (M15122.1)	ACTTTGCTA	CGCCCGAAC	GGCGAAGCA	ACCAAGGATG	TGTTACAACA	CTTGGCTCAA	5517
MMTV (INER-51)	5517
MMTV (M15122.1)	AGCTTTGCAT	ACATGGGCAT	TCCTCAAAAA	ATAAAAACAG	ATAATGCCCC	TGCATATGTG	5577
MMTV (INER-51)	5577
MMTV (M15122.1)	TCTCGTTCAA	TACAAGAATT	TCTGGCCAGA	TGGAAAATAT	CTCACGTAC	GGGGATCCCC	5637
MMTV (INER-51)	..C.....T.....G.....T.....	5637
MMTV (M15122.1)	TACAATCCCC	AAGGACAGGC	CATTGTTGAA	CGAACGCACC	AAAATATAAA	GGCACAGCTT	5697
MMTV (INER-51)A.....	5697
MMTV (M15122.1)	AATAAATTC	AAAAGGCTGG	AAAATACTAT	ACACCCCATC	ATCTGTTGGC	ACACGCTCTT	5757
MMTV (INER-51)C.....A.....T.....	5757
MMTV (M15122.1)	TTTGTGCTGA	ATCATGTAAA	TATGGACAAT	CAAGGCCATA	CAGCGGCCGA	AAGACATTGG	5817
MMTV (INER-51)G.....	5817
MMTV (M15122.1)	GGTCCAATCT	CAGCCGATCC	AAAACCTATG	GTCATGTGGA	AAGACCTTCT	CACAGGGTCC	5877
MMTV (INER-51)T.....T.....	5877
MMTV (M15122.1)	TGGAAGGAC	CCGATGTCCT	AATAACAGCC	GGACGAGGCT	ATGCTTGTGT	TTTTCCACAG	5937
MMTV (INER-51)	5937
MMTV (M15122.1)	GATGCCGAAA	CACCAATCTG	GGTCCCGCAC	CGATTCATCC	GACCTTTTAC	TGAGCGGAAA	5997
MMTV (INER-51)T.....T.....C.....G.....	5997
MMTV (M15122.1)	GAAGCAACGC	CCACACCTGG	CACTGCGGAG	AAAACGCCGC	CGCGAGATGA	GAAAGATCAA	6057
MMTV (INER-51)	..G.T.G.....A.....C.....	6057
MMTV (M15122.1)	CAGGAAAGTC	CC-AAGAATG	AATCTAGTCC	CCATCAAAGA	GAAGACGGCT	TGGCAACATC	6116
MMTV (INER-51)	..A.....	..GG.....	..CC.....A.....A.....	6117
MMTV (M15122.1)	TGCAGGCGTT	GATCTCCGAA	GCGGAGGAGG	TCCTTAAAC	CTCACAAACT	CCCCAAACCT	6176
MMTV (INER-51)T.....	6177
MMTV (M15122.1)	CTTTGACCTT	ATTTCTTGCT	TTGTTGTCTG	TCCTCGGCC	CCCGCCTGTG	ACAGGGGAGA	6236
MMTV (INER-51)C.....A.....	6237
MMTV (M15122.1)	GTTATTGGGC	CTACCTACCT	AAACCACCTA	TTCTCCATCC	CGTGGGATGG	GGAAGTACAG	6296
MMTV (INER-51)T.....	6297
MMTV (M15122.1)	ACCCATTAG	AGTTCTGACA	AATCAAACCA	TGTATTTGGG	TGGTTCGCCT	GACTTTCATG	6356
MMTV (INER-51)C.....	6357
MMTV (M15122.1)	GGTTCAGAAA	TATGTCTGGT	AATGTACATT	TTGAGGGGAA	GTCTGATACG	CTCCCCATTT	6416
MMTV (INER-51)T.....C.....	6417
MMTV (M15122.1)	GCCTTTCCTT	CTCCTTTTCT	ACCCACACGG	GCTGCTTTCA	AGTAGACAAG	CAAGTATTTC	6476
MMTV (INER-51)T.....	6477
MMTV (M15122.1)	TTTCTGATAC	ACCCACGGTT	GATAATAATA	AACCTGGGGG	AAAGGGTGAT	AAAAGGCGTA	6536
MMTV (INER-51)	6537

Fig. 28 (Parte5) Comparación de la secuencia del provirus de MMTV en la línea INER-51 con la secuencia de MMTV (GenBank. Número de acceso M15122.1) (5278-6537 nt). Se observa en color rosa la variación nucleotídica.



MMTV (M15122.1)	TGTGGGA	ACT	ACTCAGGG	CAATACAAA	CTGGTCCCTA	6596
MMTV (INER-51)	6597
MMTV (M15122.1)	TAAAAAGAA	GTTGCCCC	AAATATCCT	ACTGCCAGAT	CGCCTTTAAG	6656
MMTV (INER-51)	6657
MMTV (M15122.1)	TCTGGGAGG	AGACGAGT	GCTCCTCCAC	GGTGGTTGCC	TTGCGCCTTC	6716
MMTV (INER-51)	6717
MMTV (M15122.1)	GGGTGAGTTT	TTCTCAAAA	GGGGCCCTTG	GGTTACTTTG	GGATTTCTCC	6776
MMTV (INER-51)	6777
MMTV (M15122.1)	CTAGTG TAGA	TCAGTCAGAT	CAGATTAAAA	GCAAAAAGAA	TCTATTTGGA	6836
MMTV (INER-51)	A.....G	6837
MMTV (M15122.1)	CCCCTGTCAA	TAAAGAGGT	CATCGATGGT	ATGAAGCAGG	ATGGGTAGAA	6896
MMTV (INER-51)	6897
MMTV (M15122.1)	TCTGGGAAA	TTCTCCTAAG	GATCCCAATG	ATAGAGATTT	CACTGCAC TA	6956
MMTV (INER-51)	A.....	T.....T	6957
MMTV (M15122.1)	CAGAATTGTT	TCGCTTAGTC	GCAGCCTCAA	GACATCTTAT	TCTCAAAGG	7016
MMTV (INER-51)	T.....	A.....	7017
MMTV (M15122.1)	AAGAACATGA	GATGATTCCT	ACATCTGCCT	GTGTTACTTA	CCCTTATGCC	7076
MMTV (INER-51)	7077
MMTV (M15122.1)	GATTACCTCA	GTTAATAGAT	ATAGAGAAAA	GAGGATCTAC	TTTTCATATT	7136
MMTV (INER-51)	C.....	7137
MMTV (M15122.1)	CTGTAGATT	GACTAATTGT	TTAGACTCTT	CTGCCTACGA	CTATGCAGCG	7196
MMTV (INER-51)	T.....	7197
MMTV (M15122.1)	AGAGGCCGCC	ATATGTGCTG	CTACCTGTAG	ATATTGGTGA	TGAACCATGG	7256
MMTV (INER-51)	7257
MMTV (M15122.1)	CTGCCATTCA	AACCTTTAGG	TATGCCACAG	ATTTAATTCG	AGCTAAGCGA	7316
MMTV (INER-51)	T.....	7317
MMTV (M15122.1)	CCATTATCCT	GGGCATATCT	GCTTTGATTG	CTATTATTAC	TTCCTTTGCT	7376
MMTV (INER-51)T.....	A.....	7377
MMTV (M15122.1)	CTGCCTTAGT	TAAGGAGATG	CAAAC TGCTA	CGTTTGTTAA	TAATCTTCAT	7436
MMTV (INER-51)	A.....	7437
MMTV (M15122.1)	CATTAGCCTT	ATCTGAACAA	CGGATAATAG	ATTTAAAATT	AGAAGCTAGA	7496
MMTV (INER-51)	A.A.....	GA.....	7497
MMTV (M15122.1)	TAGAAGAAGT	AGTTTTAGAG	TTGGGACAAG	ATGTGGCCAA	TTTAAAGACC	7556
MMTV (INER-51)	A.....	C.....	7557
MMTV (M15122.1)	CTAGGTG TCA	TGCAAATTAT	GACTTTATCT	GCGTTACACC	TTTACCCTAT	7616
MMTV (INER-51)	T.....	T.C.....	G.A.....	7617
MMTV (M15122.1)	AGAACTGGGA	AAGAACCAGG	GCTCATTAT	TGGGCATTTG	GAATGATAAT	7676
MMTV (INER-51)	..G..A..A.....A.....C.....	7677
MMTV (M15122.1)	ATAACATACA	GGAGTTAACC	AACCTGATTA	GTGATATGAG	CAAACAACAT	7736
MMTV (INER-51)	..G.....G.....	7737
MMTV (M15122.1)	TGGACCTTAG	TGGCTTGGCT	CAGTCTTTTG	CCAATGGAGT	GAAGGCTTTA	7796
MMTV (INER-51)C.....	A.....	7797
MMTV (M15122.1)	ATTGGACACA	ATATTTTATT	TTTATAGGTG	TTGGAGCCCT	GCTTTTAGTC	7856
MMTV (INER-51)	..G.....	A.....	7857

Fig.28 (Parte6) Comparación de la secuencia del provirus de MMTV en la línea INER-51 con la secuencia de MMTV

(GenBank. Número de acceso M15122.1) (6537-7857 nt). Se observa en color rosa la variación nucleotídica



MMTV (M15122.1)	TGATTTTCCC	CATTGTTTTC	CAGTGCCTTG	CGAAGAGCCT	TGACCAAGTG	CAGTCAGATC	7916
MMTV (INER-51)G.....T.....	7917
MMTV (M15122.1)	TTAACGTGCT	TCTTTTAAAA	AAGAAAAAAG	GGGAAATGCG	CGCGCCTGCA	GCAGAAATGG	7976
MMTV (INER-51)	7976
MMTV (M15122.1)	TTGAACTCCC	GAGAGTGTC	TACACTTAGG	GGAGAAGCAG	CCAAGGGGTT	GTTTCCCACC	8036
MMTV (INER-51)	8036
MMTV (M15122.1)	AAGGACGACC	CGTCTGCGCA	CAAACGGATG	AGCCCATCAG	ACAAAGACAT	ACTCATTCTC	8096
MMTV (INER-51)	8096
MMTV (M15122.1)	TGCTGCAAAC	TTGGCATAGC	TCTGCTTTGC	CTGGGGCTAT	TGGGGGAAGT	TGCGGTTTCGT	8156
MMTV (INER-51)	8156
MMTV (M15122.1)	GCTCGCAGGG	CTCTCACCC	TGACTCTTTT	AATAGCTCTT	CTGTGCAAGA	TTACAATCTA	8216
MMTV (INER-51)	8216
MMTV (M15122.1)	AACGATTCGG	AGAACTCGAC	CTTCTCCTG	AGGCAAGGAC	CACAGCCAAC	TTCTCTTAC	8276
MMTV (INER-51)	8276
MMTV (M15122.1)	AAGCCGCATC	AACCTTGTC	TTCAGAAATA	GAAATAAGAA	TGCTTGCTAA	AAATTATATT	8336
MMTV (INER-51)	8336
MMTV (M15122.1)	TTTACCAATA	AGACCAATCC	AATAGGTAGA	TTATTAGTTA	CTATGTTAAG	AAATGAATCA	8396
MMTV (INER-51)	8396
MMTV (M15122.1)	TTACCTTTTA	GTACTATTTT	TACTCAAATT	CAAAGGTTAG	AAATGGGAAT	AGAAAATAGA	8456
MMTV (INER-51)	8456
MMTV (M15122.1)	AAGAGACACT	CAACCTCAGT	TGAAGAACAG	GTGCAGGGAC	TAAGGGCCTC	AGGCCTAGAA	8516
MMTV (INER-51)	8516
MMTV (M15122.1)	GTA AAAAGGG	GAAAGAGGAG	TGCGCTTGTC	AAAATAGGAG	ACAGGTGGTG	GCAACCAGGG	8576
MMTV (INER-51)	8576
MMTV (M15122.1)	ACTTATAGGG	GACCTTACAT	CTACAGACCA	ACAGATGCC	CCTTACCCTA	TACAGGAAGA	8636
MMTV (INER-51)G.....TT.....TTG.....GG.G.....GC.....AC.....C..T.....	8636
MMTV (M15122.1)	TATGACCTAA	ATTTTGATAG	GTGGGTCACA	GTCAATGGCT	ATAAAGTGT	ATACAGGTCC	8696
MMTV (INER-51)TT.....T.....A.....	8696
MMTV (M15122.1)	CTCTCCTTTC	GTGAAAGGCT	CGCCAGGGCT	AGACCTCCTT	GGTGTATGTT	GACTCAGGAA	8756
MMTV (INER-51)C.....G.....A.....G.....	8756
MMTV (M15122.1)	GAGAAAAACG	ACATGAAACA	ACAGGTACAT	GATTATATTT	ATTTGGGAAC	AGGAATGAGC	8816
MMTV (INER-51)A...G.....C.A.....A.....	8816
MMTV (M15122.1)	AGCATTGGG	GAAAGATTTT	TCAT - - - ACC	AAGGAGAGGA	CAGTGGCTGC	ACTAATAGAG	8873
MMTV (INER-51)	G - - - G.....TAT.....G.....AG.....T...A.....	8873
MMTV (M15122.1)	CACTATTCTG	CAAAGACTTA	TGGCATGAGT	TATTATGATT	AGCCTTTATT	AGCCCAATCT	8933
MMTV (INER-51)G.T.....G.....A...GA.....A.....G.....C.....	8933
MMTV (M15122.1)	TGTGGTTCCC	AAGGTTTAAG	TAAGTTCATG	GTCACAGACT	GTTCTTAAAA	CAAGGATGTG	8993
MMTV (INER-51)C.....A.....	8993
MMTV (M15122.1)	AGACAAGTGG	TTTCTGACT	TGGCTTGGA	TCAAATGTTT	TGATCTAAGC	TCTAAATGCT	9053
MMTV (INER-51)T.....G.T.....	9053
MMTV (M15122.1)	CTAACCTCCT	ATGTTCTTTT	GGATTCTATC	CAAGTTTTAT	GTAATGCTT	ATGTAAACCA	9113
MMTV (INER-51)	9113
MMTV (M15122.1)	TGATATAAAA	GAGTGCTAAA	TTTTTGAGTA	AACTTGCAAC	AGTCCTAACA	TTCAG	9168
MMTV (INER-51)G.....	9168

Fig. 28(Parte7) Comparación de la secuencia del provirus de MMTV en la línea INER-51 con la secuencia de MMTV (GenBank. Número de acceso M15122.1) (7857-9168 nt). Se observa en color rosa la variación nucleotídica.



El alineamiento por BLAST determinó que la secuencia proviral presente en la línea celular INER-51 tiene una identidad del 96% con MMTV (GenBank. Número de acceso M15122.1) (**Figura 29**) y analizando por separado cada una de las regiones génicas se determinó que las regiones reguladoras poseen un porcentaje de identidad del 96%, la secuencia de MMTV, la región génica *gag*, *pol* y *env* poseen un porcentaje de identidad de 97%, 98% y 96%, respectivamente (**Figura 30**).

```
Score = 1.506e+04 bits (8156), Expect = 0.0  
Identities = 8837/9174 (96%), Gaps = 14/9174 (0%)  
Strand=Plus/Plus
```

Fig. 29 Resultados del alineamiento múltiple por BLAST de toda la región viral.

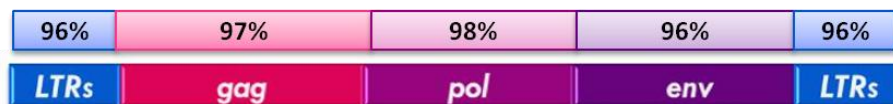


Fig. 30. Porcentaje de identidad por región.

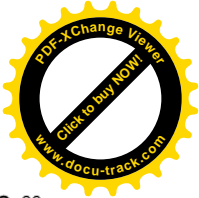
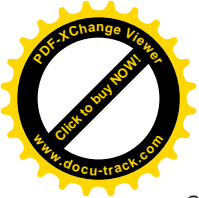
7.4 Análisis de la expresión del RNA genómico viral

Para analizar la expresión del RNA genómico viral se realizó una previa estimulación de la transcripción con Polybrene y DMSO (a diferentes concentraciones) a la línea celular INER-51 como se describe en material y métodos, posteriormente se extrajo el RNA para hacer una transcripción inversa y buscar transcritos virales por medio de PCR; sin embargo no se detectó ningún transcrito de las diferentes regiones génicas de MMTV, solo se amplificó el cDNA del transcrito control (G3PDH).



7.5 Análisis filogenético de la región génica *env*.

Se realizó un alineamiento múltiple utilizando la herramienta MUSCLE de MEGA5 (**Figura 31**) y en base a este se construyó un análisis filogenético por el método de Neighbor joining (**Figura 32**), mostrando la relación de las secuencias *env* de MMTV encontradas en patologías de pulmón en humano (incluyendo la línea celular INER-51) con respecto a las secuencias de MMTV asociadas a cáncer de mama de diferentes regiones geográficas; las secuencias de MMTV asociadas a pulmón se relacionan con todas las secuencias de MMTV presentes en cáncer de mama humano de otras regiones geográficas y en cáncer de mama murino. La mayoría de los clados muestran un “Bootstrap” arriba de un 40%.



GU252129.1 LC INER6	ACGCCTTCTG	GGAGGGAGAC	GAGTCTGCTC	CTCCACGGTG	GTTGCCTTGC	GCCTTCCCTG	60
HM636470.1 AI HZ-14	ACGCCTTCTG	GGAGGGAGAC	GAGTCTGCTC	CTCCACGGTG	GTTGCCTTGC	GCCTTCCCTG	60
LC INER51	ACGCCTTCTG	GGAGGGAGAC	GAGTCTGCTC	CTCCACGGTG	GTTGCCTTGC	GCCTTCCCTG	60
AF243039 BC USA	ACGCCTTCTG	GGAGGGAGAC	GAGTCTGCTC	CTCCACGGTG	GTTGCCTTGC	GCCTTCCCTG	60
AY702715 BC Sydney	ACGCCTTCTG	GGAGGGAGAC	GAGTCTGCTC	CTCCACGGTG	GTTGCCTTGC	GCCTTCCCTG	60
AY702714 BC Sydney	ACGCCTTCTG	GGAGGGAGAC	GAGTCTGCTC	CTCCACGGTG	GTTGCCTTGC	GCCTTCCCTG	60
AF239172 BC USA	ACGCCTTCTG	GGAGGGAGAC	GAGTCTGCTC	CTCCACGGTG	GTTGCCTTGC	GCCTTCCCTG	60
HM636471.1 LC INER101	ACGCCTTCTG	GGAGGGAGAC	GAGTCTGCTC	CTCCACGGTG	GTTGCCTTGC	GCCTTCCCTG	60
AF071010 Mice	ACGCCTTCTG	GGAGGGAGAC	GAGTCTGCTC	CTCCACGGTG	GTTGCCTTGC	GCCTTCCCTG	60
AF346816 BC USA	ACGCCTTCTG	GGAGGGAGAC	GAGTCTGCTC	CTCCACGGTG	GTTGCCTTGC	GCCTTCCCTG	60
			80		100		120
GU252129.1 LC INER6	ACCAGGGGGT	GAGTTTTTCT	CCTTTGGGTT	ACTTTGGGAT	TTCTCCCTTC	120	
HM636470.1 AI HZ-14	ACCAGGGGGT	GAGTTTTTCT	CCTTTGGGTT	ACTTTGGGAT	TTCTCCCTTC	120	
LC INER51	ACCAGGGGGT	GAGTTTTTCT	CCTTTGGGTT	ACTTTGGGAT	TTCTCCCTTC	120	
AF243039 BC USA	ACCAGGGGGT	GAGTTTTTCT	CCTTTGGGTT	ACTTTGGGAT	TTCTCCCTTC	120	
AY702715 BC Sydney	ACCAGGGGGT	GAGTTTTTCT	CCTTTGGGTT	ACTTTGGGAT	TTCTCCCTTC	120	
AY702714 BC Sydney	ACCAGGGGGT	GAGTTTTTCT	CCTTTGGGTT	ACTTTGGGAT	TTCTCCCTTC	120	
AF239172 BC USA	ACCAGGGGGT	GAGTTTTTCT	CCTTTGGGTT	ACTTTGGGAT	TTCTCCCTTC	120	
HM636471.1 LC INER101	ACCAGGGGGT	GAGTTTTTCT	CCTTTGGGTT	ACTTTGGGAT	TTCTCCCTTC	120	
AF071010 Mice	ACCAGGGGGT	GAGTTTTTCT	CCTTTGGGTT	ACTTTGGGAT	TTCTCCCTTC	120	
AF346816 BC USA	ACCAGGGGGT	GAGTTTTTCT	CCTTTGGGTT	ACTTTGGGAT	TTCTCCCTTC	120	
			140		160		180
GU252129.1 LC INER6	CCTCGCCTAG	TGTAGATCAG	TCAGATCAGA	TAAAAACAA	AAAGGATCTA	TTTGGAAATT	180
HM636470.1 AI HZ-14	CCTCGCCTAG	TGTAGATCAG	TCAGATCAGA	TAAAAACAA	AAAGGATCTA	TTTGGAAATT	180
LC INER51	CCTCGCCTAG	TGTAGATCAG	TCAGATCAGA	TAAAAACAA	AAAGGATCTA	TTTGGAAATT	180
AF243039 BC USA	CCTCGCCTAG	TGTAGATCAG	TCAGATCAGA	TAAAAACAA	AAAGGATCTA	TTTGGAAATT	180
AY702715 BC Sydney	CCTCGCCTAG	TGTAGATCAG	TCAGATCAGA	TAAAAACAA	AAAGGATCTA	TTTGGAAATT	180
AY702714 BC Sydney	CCTCGCCTAG	TGTAGATCAG	TCAGATCAGA	TAAAAACAA	AAAGGATCTA	TTTGGAAATT	180
AF239172 BC USA	CCTCGCCTAG	TGTAGATCAG	TCAGATCAGA	TAAAAACAA	AAAGGATCTA	TTTGGAAATT	180
HM636471.1 LC INER101	CCTCGCCTAG	TGTAGATCAG	TCAGATCAGA	TAAAAACAA	AAAGGATCTA	TTTGGAAATT	180
AF071010 Mice	CCTCGCCTAG	TGTAGATCAG	TCAGATCAGA	TAAAAACAA	AAAGGATCTA	TTTGGAAATT	180
AF346816 BC USA	CCTCGCCTAG	TGTAGATCAG	TCAGATCAGA	TAAAAACAA	AAAGGATCTA	TTTGGAAATT	180
			200		220		240
GU252129.1 LC INER6	ATACTCCCC	TGTCAAATAA	GAGGTTTCATC	GATGGTATGA	AGCAGGATGG	GTAGAACCTA	240
HM636470.1 AI HZ-14	ATACTCCCC	TGTCAAATAA	GAGGTTTCATC	GATGGTATGA	AGCAGGATGG	GTAGAACCTA	240
LC INER51	ATACTCCCC	TGTCAAATAA	GAGGTTTCATC	GATGGTATGA	AGCAGGATGG	GTAGAACCTA	240
AF243039 BC USA	ATACTCCCC	TGTCAAATAA	GAGGTTTCATC	GATGGTATGA	AGCAGGATGG	GTAGAACCTA	240
AY702715 BC Sydney	ATACTCCCC	TGTCAAATAA	GAGGTTTCATC	GATGGTATGA	AGCAGGATGG	GTAGAACCTA	240
AY702714 BC Sydney	ATACTCCCC	TGTCAAATAA	GAGGTTTCATC	GATGGTATGA	AGCAGGATGG	GTAGAACCTA	240
AF239172 BC USA	ATACTCCCC	TGTCAAATAA	GAGGTTTCATC	GATGGTATGA	AGCAGGATGG	GTAGAACCTA	240
HM636471.1 LC INER101	ATACTCCCC	TGTCAAATAA	GAGGTTTCATC	GATGGTATGA	AGCAGGATGG	GTAGAACCTA	240
AF071010 Mice	ATACTCCCC	TGTCAAATAA	GAGGTTTCATC	GATGGTATGA	AGCAGGATGG	GTAGAACCTA	240
AF346816 BC USA	ATACTCCCC	TGTCAAATAA	GAGGTTTCATC	GATGGTATGA	AGCAGGATGG	GTAGAACCTA	240
			260		280		300
GU252129.1 LC INER6	CTTGGTTCTG	GGAAAAATTCT	CCTAAAGATC	CCAATGATAG	AGATTTTACT	GCTCTAGTTC	300
HM636470.1 AI HZ-14	CTTGGTTCTG	GGAAAAATTCT	CCTAAAGATC	CCAATGATAG	AGATTTTACT	GCTCTAGTTC	300
LC INER51	CTTGGTTCTG	GGAAAAATTCT	CCTAAAGATC	CCAATGATAG	AGATTTTACT	GCTCTAGTTC	300
AF243039 BC USA	CTTGGTTCTG	GGAAAAATTCT	CCTAAAGATC	CCAATGATAG	AGATTTTACT	GCTCTAGTTC	300
AY702715 BC Sydney	CTTGGTTCTG	GGAAAAATTCT	CCTAAAGATC	CCAATGATAG	AGATTTTACT	GCTCTAGTTC	300
AY702714 BC Sydney	CTTGGTTCTG	GGAAAAATTCT	CCTAAAGATC	CCAATGATAG	AGATTTTACT	GCTCTAGTTC	300
AF239172 BC USA	CTTGGTTCTG	GGAAAAATTCT	CCTAAAGATC	CCAATGATAG	AGATTTTACT	GCTCTAGTTC	300
HM636471.1 LC INER101	CTTGGTTCTG	GGAAAAATTCT	CCTAAAGATC	CCAATGATAG	AGATTTTACT	GCTCTAGTTC	300
AF071010 Mice	CTTGGTTCTG	GGAAAAATTCT	CCTAAAGATC	CCAATGATAG	AGATTTTACT	GCTCTAGTTC	300
AF346816 BC USA	CTTGGTTCTG	GGAAAAATTCT	CCTAAAGATC	CCAATGATAG	AGATTTTACT	GCTCTAGTTC	300
			320		340		360
GU252129.1 LC INER6	CCCATACAAA	ATTGTTTCGC	TTAGTTGCAG	CCTCAAGACA	TCTTATTCTC	AAAAGGCCAA	360
HM636470.1 AI HZ-14	CCCATACAAA	ATTGTTTCGC	TTAGTTGCAG	CCTCAAGACA	TCTTATTCTC	AAAAGGCCAA	360
LC INER51	CCCATACAGA	ATTGTTTCGC	TTAGTTGCAG	CCTCAAGACA	TCTTATTCTC	AAAAGGCCAG	360
AF243039 BC USA	CCCATACAGA	ATTGTTTCGC	TTAGTTGCAG	CCTCAAGACA	TCTTATTCTC	AAAAGGCCAG	360
AY702715 BC Sydney	CCCATACAGA	ATTGTTTCGC	TTAGTTGCAG	CCTCAAGACA	TCTTATTCTC	AAAAGGCCAG	360
AY702714 BC Sydney	CCCATACAGA	ATTGTTTCGC	TTAGTTGCAG	CCTCAAGACA	TCTTATTCTC	AAAAGGCCAG	360
AF239172 BC USA	CCCATACAGA	ATTGTTTCGC	TTAGTTGCAG	CCTCAAGACA	TCTTATTCTC	AAAAGGCCAG	360
HM636471.1 LC INER101	CCCATACAGA	ATTGTTTCGC	TTAGTTGCAG	CCTCAAGACA	TCTTATTCTC	AAAAGGCCAG	360
AF071010 Mice	CCCATACAGA	ATTGTTTCGC	TTAGTTGCAG	CCTCAAGACA	TCTTATTCTC	AAAAGGCCAG	360
AF346816 BC USA	CCCATACAGA	ATTGTTTCGC	TTAGTTGCAG	CCTCAAGACA	TCTTATTCTC	AAAAGGCCAG	360

Fig. 31 (Parte 1) Alineamiento múltiple por MUSCLE de la región génica *env* de muestras de cáncer de pulmón: INER 6 (Genbank No. de acceso GU252129), INER101 (HM636471.1), INER-51, infiltrado inflamatorio agudo de pulmón HZ14 (HM63470.1), muestras de cáncer de mama de USA (AF346816, AF239172, AF243039), cáncer de mama de Sydney (AY702715, AY702714) y MMTV de ratón (AF071010).

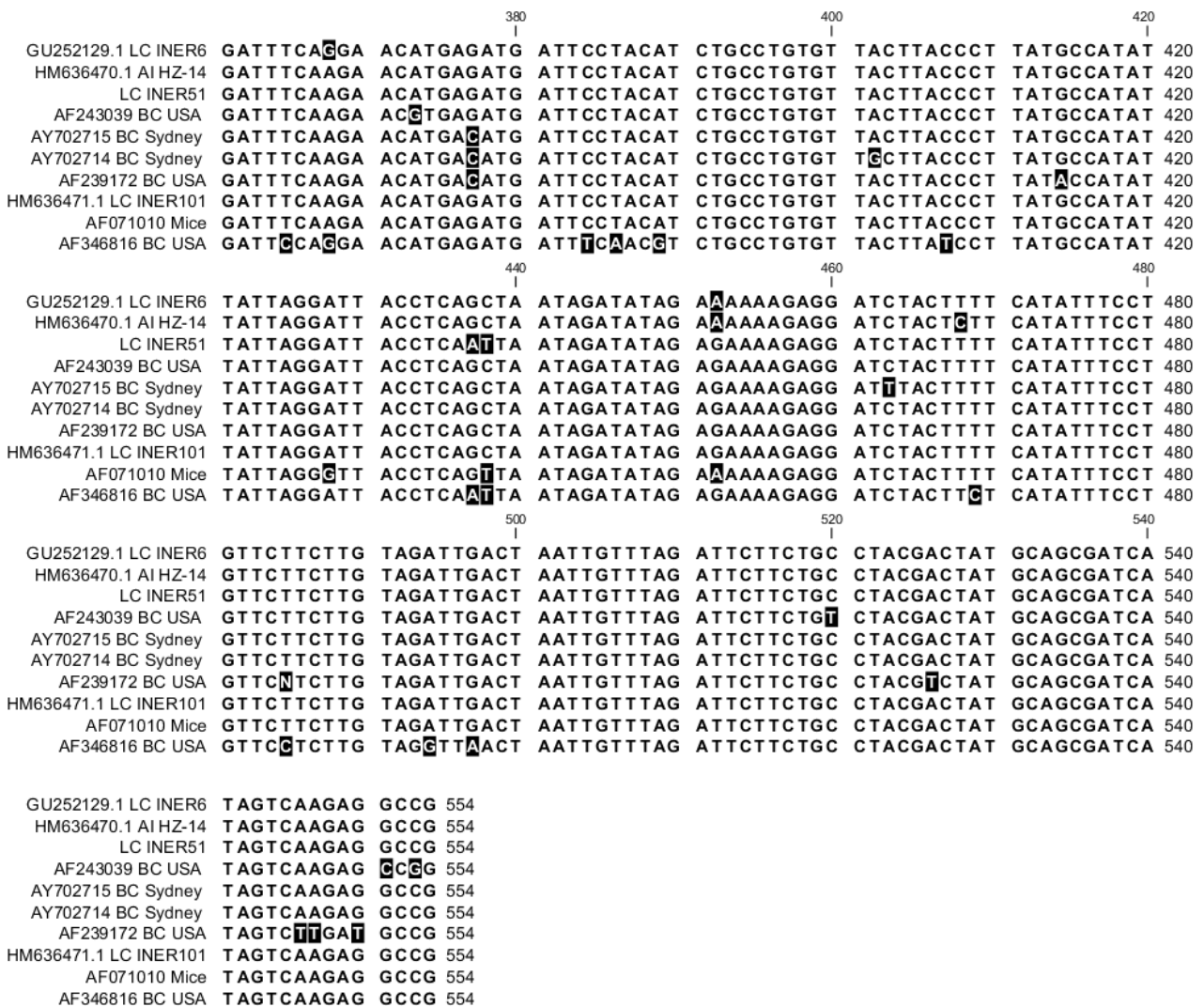


Fig. 31 (Parte 2) Alineamiento múltiple por MUSCLE de la región génica *env* de muestras de cáncer de pulmón: INER 6 (Genbank No. de acceso GU252129), INER101 (HM636471.1), INER-51, infiltrado inflamatorio agudo de pulmón HZ14 (HM63470.1), muestras de cáncer de mama de USA (AF346816, AF239172, AF243039), cáncer de mama de Sydney (AY702715, AY702714) y MMTV de ratón (AF071010).

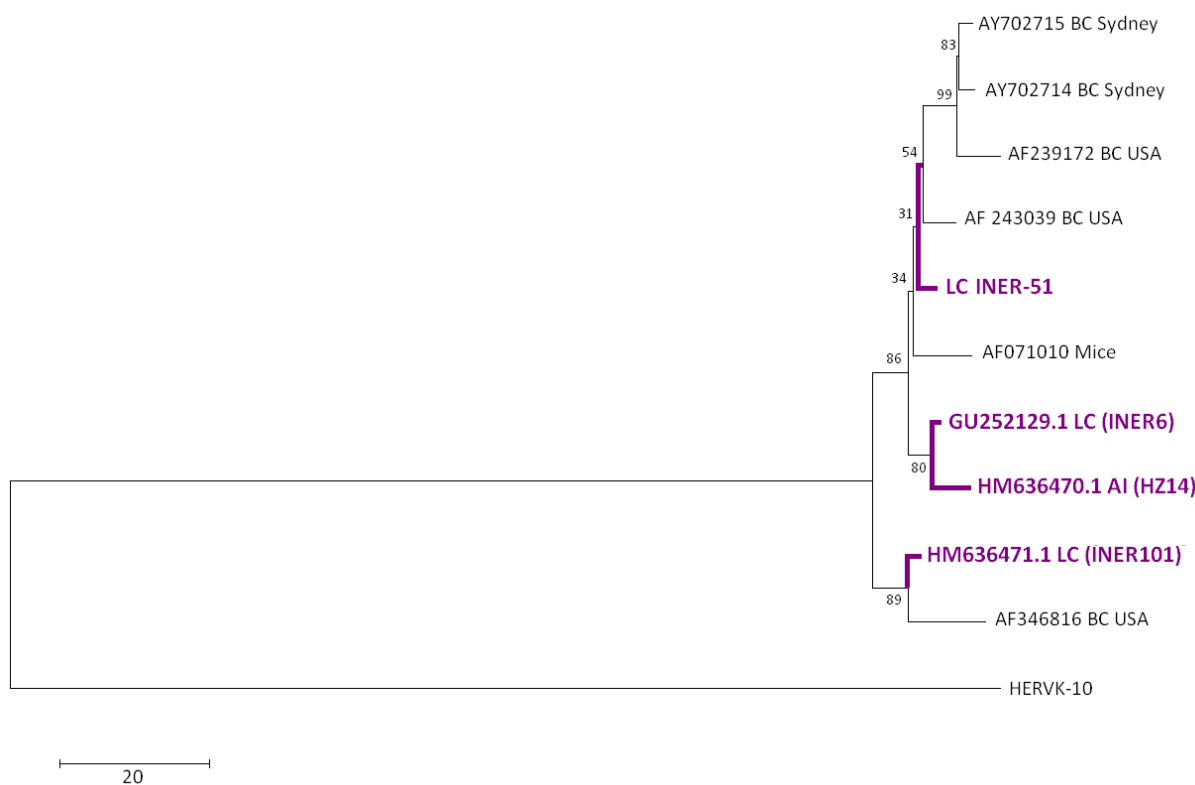


Fig. 32. Análisis filogenético que muestra la relación de las secuencias *env* de cáncer de pulmón en humano (INER6 No. de acceso 6u25212931, INER101 No. de acceso HM636471.1 e INER51) e infiltrado inflamatorio agudo humano (HZ14, No. de acceso HM636470.1) de México con las secuencias *env* de cáncer de mama en humano de diferentes regiones geográficas (Sydney (No. de acceso AY702715 y AY702714) y Estados Unidos. (No de acceso AF239172, AF243039 y AF346816)) y con la secuencia *env* de MMTV (No de acceso AF071010) y la secuencia *env* de HERV-K10 como grup externo (JN656291.1) La línea de la parte inferior izquierda indica la medida visual de los cambios de nucleótidos. Bootstrap: 1000 repeticiones.

7.6 Análisis filogenético de la región reguladora LTR.

Se realizó un alineamiento múltiple utilizando la herramienta MUSCLE de MEGA5 (**Figura 33**) y en base a este se construyó un análisis filogenético por el método de Neighbor joining (**Figura 34**), el cual muestra la relación de las secuencias *LTR* de MMTV encontradas en patologías de pulmón en humano (incluyendo la línea celular INER-51) con respecto a las secuencias de MMTV asociadas a otras patologías en humano; las secuencias de MMTV asociadas a pulmón en humano poseen una mayor identidad con el MMTV presente en cáncer de mama murino que las secuencias de MMTV presentes en otras patologías en humano. Todos los clados muestran un “Bootstrap” arriba del 40%.

		20		40		60							
AY652974.1 BC	AGGACTTATA	GGGGAC	TTT -	ACATTTACAG	ACCAACAGAC	GCCCCGTTAC	CATATACAGG 59						
AY652975.1 BC	AGGACTTATA	GGGGAC	TTT -	ACATTTACAG	ACCAACAGAC	GCCCCGTTAC	CATATACAGG 59						
AY652966.1 NH-L	AGGACTTATA	GGGGAC	CTT -	ACATTTACAG	ACCAACAGAC	GCCCCGTTAC	CATATACAGG 59						
AY652973.1 BC	AGGACTTATA	GGGGAC	CTT -	ACATTTA	AGACCAACAT	TACGCCCCGTTAC	CATATACAGG 59						
INER51 LC	GGGACTTATA	GGGGAC	CTT -	ACAT	CTACAGACCAACAGAC	GCCCCG	CTACCATATACAGG 59						
HZ14 AIL	GGGACTTATA	GGGGAC	CTT -	ACAT	CTACAGACCAACAGAC	GCCCCG	CTACCATATACAGG 59						
INER6 LC	GGGACTTATA	GGGGAC	CTT -	ACAT	CTACAGACCAACAGAC	GCCCCG	CTACCATATACAGG 59						
AY652971.1 NH-L	AGGACTTATA	GGGGAC	CTT	TACATTTACAG	ACCAACAGAC	GCCCCG	CTACCATATACAGG 59						
M15122.1 MICE	GGGACTTATA	GGGGAC	CTT -	ACAT	CTACAGACCAACAGAT	GCCCC	CTTACCATATACAGG 59						
		80		100		120							
AY652974.1 BC	AAGATATGAT	TTAAATTTT	GATAGG	TGGGT	CACAGTCAAC	GGCTATAAAG	TGTTATACAG 119						
AY652975.1 BC	AAGATATGAT	TTAAATTTT	GATAGG	TGGGT	CACAGTCAAC	GGCTATAAAG	TGTTATACAG 119						
AY652966.1 NH-L	AAGATATGAT	TTAAATTTT	GATAGG	TGGGT	CACAGTCAAC	GGCTATAAAG	TGTTATACAG 119						
AY652973.1 BC	AAGATA	AGATTTT	GATAGG	TGGGT	CACA	ATCAACGGCTATAAAG	TGTTATACAG 119						
INER51 LC	AAGATA	CGATTTT	GATAGG	TGGGT	CACAGTCAAC	GGCTATAAAG	TGTT	CTACAG 119					
HZ14 AIL	AAGATA	CGATTTT	GATAGG	TGGGT	CACAGTCAAC	GGCTATAAAG	TGTT	CTACAG 119					
INER6 LC	AAGATA	CGATTTT	GATAGG	TGGGT	CACAGTCAAC	GGCTATAAAG	TGTT	CTACAG 119					
AY652971.1 NH-L	AAGATATGAT	TTAAATTTT	GATAGG	TGGGT	CACAGTCAAC	GGCTATAAAG	TGTTATACAG 119						
M15122.1 MICE	AAGATATGA	CTAAATTTT	GATAGG	TGGGT	CACAGTCAAT	GGCTATAAAG	TGTTATACAG 119						
		140		160		180							
AY652974.1 BC	ATCCCTCCCC	TTTTCGTGAAA	GGC	CGCCAGAGCTAGACCT	CCTTGGTGTG	TGTTGTCTCA	179						
AY652975.1 BC	ATCCCTCCCC	TTTTCGTGAAA	GGC	CGCCAGAGCTAGACCT	CCTTGGTGTG	TGTTGTCTCA	179						
AY652966.1 NH-L	ATCCCTCCCC	TTTTCGTGAAA	GGC	TCGCCAGAGCTAGACCT	CCTTGGTGTG	TGTTGTCTCA	179						
AY652973.1 BC	ATCCCTCCCC	TTTTCGTGAAA	GGC	ACGCCAGAGCTAGACCT	CCTTGGTGTG	TGTTGTCTCA	179						
INER51 LC	ATCCCTCCCC	TTTTCGTGAAA	G	ACTCGCCAGAGCTAGACCT	CCTTGGTGTG	TGTTAA	ACTCA 179						
HZ14 AIL	ATCCCTCCCC	TTTTCGTGAAA	G	ACTCGCCAGAGCTAGACCT	CCTTGGTGTG	TGTTAA	ACTCA 179						
INER6 LC	ATCCCTCCCC	TTTTCGTGAAA	G	ACTCGCCAGAGCTAGACCT	CCTTGGTGTG	TGTTAA	ACTCA 179						
AY652971.1 NH-L	A	CCCTCCCC	TTTTCGTGAAA	GGCTCGCCAG	AGCTAGACCT	CCTTGGTGTG	TGTTGTCTCA 179						
M15122.1 MICE	G	TCCCTCTCC	TTTTCGTGAAA	GGCTCGCCAG	CGCTAGACCT	CCTTGGTGT	A	TGTTGACTCA 179					
		200		220		240							
AY652974.1 BC	AGAAGAAAA	GACGACATGA	AACAACAGGT	ACATGATTAT	ATTTATCTAG	GAACAGGAAT	239						
AY652975.1 BC	AGAAGAAAA	GACGACATGA	AACAACAGGT	ACATGATTAT	ATTTATCTAG	GAACAGGAAT	239						
AY652966.1 NH-L	AGAAGAAAA	GACGACATGA	AACAACAGGT	ACATGATTAT	ATTTATCTAG	A	GAACAGGAAT 239						
AY652973.1 BC	AGAAGAAAA	GACGACATGA	AACAACAGGT	ACATGATTAT	ATTTATCTAG	GAACAGGAAT	239						
INER51 LC	GGAAGAAAA	GACGACAT	AAACAACAGGT	ACATGATTAT	ATTTATCTAG	GAAC	TGGAAT 239						
HZ14 AIL	GGAAGAAAA	GACGACAT	AAACAACAGGT	ACATGATTAT	ATTTATCTAG	GAAC	TGGAAT 239						
INER6 LC	GGAAGAAAA	GACGACAT	AAACAACAGGT	ACATGATTAT	ATTTATCTAG	GAAC	TGGAAT 239						
AY652971.1 NH-L	AGAAGAAAA	GACGACATGA	AACAACAGGT	ACATGATTAT	ATTTATCTAG	GAAC	TGGAAT 239						
M15122.1 MICE	GGAAGAG	AAAGACATGA	AACAACAGGT	ACATGATTAT	ATTTAT	TTGG	GAACAGGAAT 239						
		260		280		300							
AY652974.1 BC	GATAC	- - -AT	TGG	- - -AAAG	TATTTTATAA	CAGTAGAGAG	GAGGCCAAAA	GACATATAAT 293					
AY652975.1 BC	GATAC	- - -AT	TGG	- - -AAAG	TATTTTATAA	CAGTAGAGAG	GAGGCCAAAA	GACATATAAT 293					
AY652966.1 NH-L	GATAC	- - -AT	TGG	- - -AAAG	TATTTTATAA	CAGTAGAGAG	GAGGCCAAAA	GACATATAAT 293					
AY652973.1 BC	GATAC	- - -GT	TGG	- - -AAAG	TATTTTATAA	CAATAGAGAG	GAGGCCAAAA	GACATATAAT 293					
INER51 LC	GAACG	- - -TT	TGGGGAAAGA	TTTTTCATTA	TACCAAGGAG	GGGGC - AGTG	GCTAGACAAT 295						
HZ14 AIL	GAACG	- - -TT	TGGGGAAAGA	TTTTTCATTA	TACCAAGGAG	GGGGC - AGTG	GCTAGACAAT 295						
INER6 LC	GAACG	- - -TT	TGGGGAAAGA	TTTTTCATTA	TACCAAGGAG	GGGGC - AGTG	GCTAGACAAT 295						
AY652971.1 NH-L	GAACG	- - -TT	TGGGGAAAGA	TTTTTCATTA	TACCAAGGAG	GGG	- C - AGTG	GCTAGACATT 294					
M15122.1 MICE	GAGCAGCA	TT	TGGGGAAAGA	TTTTTCAT	-	-	ACCAAGGAG	AGGAC - AGTG	GCTGCACTAA 295				
		320		340		360							
AY652974.1 BC	-	AGAACATAT	TAAGGC	- - -	- - -	TTTGCC	TTAGCTTT	- - -	CTAAAGT	TTG	- - -	- - -	333
AY652975.1 BC	-	AGAACATAT	TAAGGC	- - -	- - -	TTTGCC	TTAGCTTT	- - -	CTAAAGT	TTG	- - -	- - -	333
AY652966.1 NH-L	-	AGAACATAT	TAAGGC	- - -	- - -	TTTGCC	TTAGCTTT	- - -	CTAAAGT	TTG	- - -	- - -	333
AY652973.1 BC	-	AGAACATAT	TAAGGC	- - -	- - -	TTTGCC	TTAGCTTT	- - -	CTAAAGT	TTG	- - -	- - -	333
INER51 LC	TAGAACACAT	TTCTGCAGAT	ACTTTTGGCA	TGAGCTATAA	TGGATAACCT	TTATGAGCCC	355						
HZ14 AIL	TAGAACACAT	TTCTGCAGAT	ACTTTTGGCA	TGAGCTATAA	TGGATAACCT	TTATGAGCCC	355						
INER6 LC	TAGAACACAT	TTCTGCAGAT	ACTTTTGGCA	TGAGCTATAA	TGGATAACCT	TTATGAGCCC	355						
AY652971.1 NH-L	TAGAACACAT	TTCTGCAGAT	ACTTTTGGCA	TGAGCTATAA	TGGATAACCT	TTATGAGCCC	354						
M15122.1 MICE	TAGAGCAC	TTAAG	TTCTGC	AAACTTTATGGCA	TGAGTTATTA	TGATTAGCCT	TTAT	TAGCCC 355					

Fig. 33 (Parte1) Alineamiento múltiple por MUSCLE de la región reguladora *LTR* de muestras de cáncer de pulmón: INER 6, INER-51, infiltrado inflamatorio agudo de pulmón HZ14, secuencias de cáncer de mama de (AY652974.1, AY652975.1, AY652973), secuencias de Linfoma no-Hodgkin (AY652966.1, AY652971.1) y secuencias de MMTV de ratón (M15122.1).

			380		400		420	
AY652974.1 BC	■■■CTTGCGG	TTCCCAAGGT	TTAAGTAAGT	ACATGGATAC	AAACTGTTCT	TAAAACAAGG	390	
AY652975.1 BC	■■■CTTGCGG	TTCCCAAGGT	TTAAGTAAGT	ACATGGATAC	AAACTGTTCT	TAAAACAAGG	390	
AY652966.1 NH-L	■■■CTTGCGG	TTCCCAAGGT	TTAAGTAAGT	TCATGGTTAC	AAACTGTTCT	TAAAACAAGG	390	
AY652973.1 BC	■■■CTTGCGG	TTCCCAAGGT	TTAAGTAAGT	TCATGGTTAC	AACTGTTCT	TAAAACAAGG	390	
INER51 LC	AACCTTGCGG	TTCCCAAGGT	TTAAGTAAGT	TCAGGGTCAC	AAACTGTTCT	TAAAACAAGG	415	
HZ14 AIL	AACCTTGCGG	TTCCCAAGGT	TTAAGTAAGT	TCAGGGTCAC	AAACTGTTCT	TAAAACAAGG	415	
INER6 LC	AACCTTGCGG	TTCCCAAGGT	TTAAGTAAGT	TCAGGGTCAC	AAACTGTTCT	TAAAACAAGG	415	
AY652971.1 NH-L	AACCTTGCGG	TTCCCAAGGT	TTAAGTAAGT	TCATGGTTAC	AAACTGTTCT	TAAAACAAGG	414	
M15122.1 MICE	AATCTTGTTGG	TTCCCAAGGT	TTAAGTAAGT	TCATGGTCAC	AACTGTTCT	TAAAACAAGG	415	
			440		460			
AY652974.1 BC	ATGTGAGACA	AGTGGTTTCC	TGACTTGGTT	TGGTATCAAAA	TGTTTTGATC	TAAGC	445	
AY652975.1 BC	ATGTGAGACA	AGTGGTTTCC	TGACTTGGTT	TGGTATCAAAA	TGTTTTGATC	TAAGC	445	
AY652966.1 NH-L	ATGTGAGACA	AGTGGTTTCC	TGACTTGGTT	TGGTATCAAAA	TGTTTTGATC	TAAGC	445	
AY652973.1 BC	ATGTGTTGCA	AGTGGTTTCC	TGACTTGGTT	TGGTATCAAAA	TGTTTTGATC	TAAGC	445	
INER51 LC	ATGTGAGACA	AGTGGTTTCC	TGACTTGGTT	■	■	■	445	
HZ14 AIL	ATGTGAGACA	AGTGGTTTCC	TGACTTGGTT	■	■	■	445	
INER6 LC	ATGTGAGACA	AGTGGTTTCC	TGACTTGGTT	■	■	■	445	
AY652971.1 NH-L	ATGTAGACA	AGTGGTTTCC	TGACTTGGTT	T	■	■	445	
M15122.1 MICE	ATGTGAGACA	AGTGGTTTCC	TGACTTGGCT	■	■	■	445	

Fig. 33 (Parte2) Alineamiento múltiple por MUSCLE de la región reguladora *LTR* de muestras de cáncer de pulmón: INER 6, INER-51, infiltrado inflamatorio agudo de pulmón HZ14, secuencias de cáncer de mama de (AY652974.1, AY652975.1, AY652973), secuencias de Linfoma no-Hodgkin (AY652966.1, AY652971.1) y secuencias de MMTV de ratón (M15122.1).

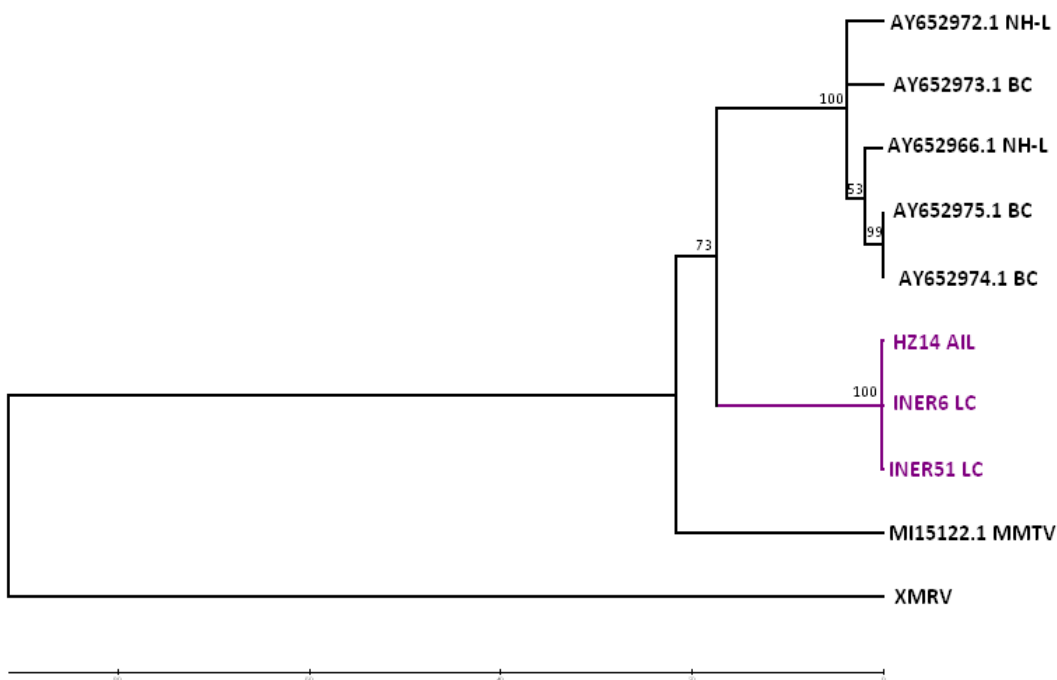


Fig. 34. Análisis filogenético que muestra la relación de las secuencias *LTR* de cáncer de pulmón en humano (INER6, INER51) e infiltrado inflamatorio agudo humano (HZ14) de México con las secuencias *LTR* de cáncer de mama (No. de acceso AY652973.1, AY652974.1 y AY652975.1) y linfoma no Hodgkin (No. de acceso AY652972.1 y AY652966.1) en humano y con la secuencia *env* de MMTV en cáncer mamario de ratón (No de acceso M15122.1). Utilizando XMRV como grupo externo (NC_007815.2). Bootstrap: 1000 repeticiones.



DISCUSIÓN

Los retrovirus oncogénicos de transformación no aguda, causan la expresión desregulada de los oncogenes celulares mediante la integración del provirus en el genoma huésped y han sido utilizados para estudiar el desarrollo y progresión del tumor en modelos animales (Coffin *et al.* 1997).

MMTV fue el primero caracterizado en la década de 1930 como un agente asociado con tumores mamarios en ratones y ha sido utilizado como un modelo in vivo para el estudio de cáncer de mama humano (Bittner, 1936) (Callahan *et Smith*, 2008).

Desde el descubrimiento de MMTV, numerosos investigadores han buscado un virus similar asociado a cáncer de mama humano, encontrando secuencias con alta identidad con MMTV.

En nuestro país se ha observado la presencia de secuencias génicas *env* en el 4.2% de las biopsias de tumor mamario procesadas, observándose un elevado porcentaje de identidad (entre el 98 - 99%), con MMTV, así como también la presencia de secuencias génicas *env* y reguladoras *LTR* en una línea celular de adenocarcinoma pulmonar primario humano y en muestras de pacientes con cáncer pulmonar y otras patologías relacionadas, con un porcentaje de identidad con MMTV mayor al 96% (Zapata-Benavides *et al.* 2007) (Trejo-Avila *et al.*, 2011).

En el presente trabajo se realizó la secuenciación del genoma completo del virus like-MMTV integrado en la línea celular de adenocarcinoma pulmonar humano INER-51, se analizó la expresión del provirus y se construyó un análisis filogenético del gen *env* y de las regiones reguladoras *LTR* de MMTV, de las secuencias reportadas en Genbank, de las secuencias provirales de la línea celular INER-51 y de las muestras de cáncer de pulmón positivas.

Al realizar la secuenciación del genoma completo del provirus insertado en la línea celular INER-51 y realizar un alineamiento múltiple por BLAST (megablast) (**Figura 29**) se observó que la secuencia tenía un porcentaje de identidad del 96% con el MMTV aislado de tumor de mama. Liu *et al* en el 2001 secuenciaron un provirus presente en tumor mamario humano observando una identidad de 95% con MMTV, del



mismo modo (Melana *et. al*, 2008) aislaron la secuencia de un provirus a partir de cáncer de mama humano y determinaron que esta secuencia poseía un porcentaje de identidad del 97% con el MMTV aislado a partir de cáncer de mama murino.

El análisis de la expresión del provirus se realizó por medio de RT-PCR, previo a esto se realizó una estimulación de la transcripción por medio de Polybrene y DMSO. No se observaron transcritos de ninguna región génica del virus, sin embargo no se descarta la expresión del mismo, la falta de amplicón del DNA complementario del virus puede deberse a la sensibilidad de la técnica; el uso de técnicas más sensibles como el Q-PCR puede arrojar resultados más certeros.

La falta de evidencia de la expresión del provirus no descarta su asociación con la carcinogénesis; ya que MMTV transforma la célula por un mecanismo de mutagénesis insercional, regulando y potenciando la expresión de protooncogenes celulares por medio de sus regiones reguladoras *LTRs*.

Al construir un análisis filogenético con las secuencias *env* de 552pb provenientes de los provirus integrados en: INER51; en patologías pulmonares de humano; en muestras de cáncer de mama humano de diferentes regiones geográficas; y en cáncer mamario de ratón, se observó que la secuencia encontrada en INER-51 no se agrupaba con las secuencias de *env* encontradas en cáncer de pulmón; sino que se asociaba indiscriminadamente con las secuencias de *env* reportadas en cáncer de mama humano provenientes de diferentes regiones geográficas y con la secuencia de MMTV de ratón. Solo las secuencias encontradas en cáncer pulmonar INER-6 y en infiltrado inflamatorio agudo HZ14 se agrupaban en un solo clado, mostrando una distancia genética mas cercana entre estas dos secuencias y por lo tanto una alta identidad entre sí (**Figura 32**).

El hecho de que la secuencia de INER51 se interrelacione con las secuencias provenientes de cáncer mamario de otras regiones geográficas y no forme un grupo separado confirma el alto porcentaje de identidad que existe entre las secuencias *env* de MMTV provenientes de todas las muestras aisladas de humano antes mencionadas y por otra parte que el mismo provirus MMTV está presente en cáncer de mama de ratón y humano, así como también en cáncer de pulmón humano.



Este análisis filogenético es acorde con el presentado por, (Lawson *et al.*, 2010) en su estudio observaron claramente que las secuencias de *env* de los provirus like-MMTV presentes en muestras de cáncer de mama en humanos provenientes de Estados Unidos, Italia, México y Argentina no se agrupan como dos especies distintas de MMTV.

(Hsu *et al.*, 2010) observaron un comportamiento similar al anterior, dónde las secuencias *env* extraídas de tumores de cáncer mamario de ratón, gato, perro y humano se interrelacionan indiscriminadamente en los clados, concluyendo que el virus puede transmitirse entre estos diferentes huéspedes (**Figura 12**).

Los genes de envoltura de los provirus son los que presentan mayor divergencia, por lo que, con un análisis filogenético de toda la secuencia completa de los provirus presentes podría arrojar datos concluyentes con respecto a la relación entre el virus que infecta el tejido mamario en ratón y el que infecta tejido humano.

Con respecto al análisis filogenético de las regiones reguladoras *LTR* de MMTV presentes en cáncer de pulmón humano, cáncer de mama humano, linfoma no-Hodgkin humano y cáncer mamario murino (**Figura 34**), se observó que las secuencias de cáncer de pulmón humano se agrupaban en un mismo clado. En un estudio realizado por (Etkind *et al.*, 2000) en el cual se compararon secuencias *LTR* presentes en los integrantes de una familia con cáncer de mama humano (padre, madre e hija), con las secuencias de MMTV de cáncer de mama murino, observaron como las secuencias de la madre e hija se agrupaban en un solo clado (**Figura 9**), pero no fue elemento suficiente para determinar que los provirus presentes en los humanos pertenecen a una especie distinta al MMTV murino. En otro estudio realizado por el mismo grupo de (Etkind, *et al.*, 2004) (**Figura 10**), compararon las secuencias de MMTV presentes en muestras de linfoma no-Hodgkin humano, cáncer de mama humano y cáncer de mama en ratón observando una estrecha relación de todas las secuencias *LTR* asociadas a humano y murino. En nuestro estudio, el análisis filogenético de la región *LTR* tampoco podría sugerir la presencia de una especie distinta de MMTV, ya que el análisis filogenético de la región *env* de las mismas muestras nos descarta esta posibilidad.

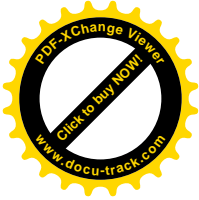
Analizando el alineamiento múltiple de las secuencias de la región reguladora *LTR* (**Figura 33**), se observa el mismo patrón de diferencias, pérdidas o ganancias de



nucleótidos, en la mayoría de secuencias analizadas en humano con respecto a la secuencia presente en ratón. En especial, llama particularmente la atención la pérdida de un triplete localizado en los nucleótidos 246, 247 y 248 en todos los tumores humanos analizados (pulmón, mama, linfoma no-Hodgkin), la pérdida de estos nucleótidos pudiera quizás conferirle al virus ciertas características que le permitan su adaptación al nuevo huésped.

La presencia de un provirus insertado en una línea celular de pulmón humano (INER51) que posee una alta identidad con el provirus MMTV presente en cáncer de mama en ratones, así como también la relación de las secuencias del provirus presentes en la línea celular con: las secuencias aisladas de cáncer de pulmón humano; cáncer de mama humano; y cáncer de mama de ratones, son evidencias que apoyan la asociación de MMTV con la tumorigénesis en pulmón.

Es necesario consolidar estas evidencias por una parte analizando el locus de inserción del provirus de MMTV y de protooncogenes (familias *Fgf* y *Wnt* que son comúnmente alteradas en el modelo murino) en la línea celular INER-51; así como también analizar la expresión de estos protooncogenes y determinar si se encuentran sobre expresados diferencialmente en células provenientes de cáncer pulmonar, con y sin el virus asociado. Por otra parte será necesario seguir buscando la presencia de este retrovirus en un número mayor de pacientes con cáncer pulmonar y buscar su asociación con cáncer pulmonar en otros huéspedes.



CONCLUSIONES

1. Se amplificaron y secuenciaron las regiones génicas y reguladoras del provirus de MMTV integrado en la línea celular INER-51 derivada de cáncer pulmonar.

2. Se compararon las secuencias obtenidas del provirus con la secuencia reportada para MMTV en el GenBank (GenBank. Número de acceso M15122.1) se observó un porcentaje de identidad del 96%.

3. Se analizó la expresión de RNA genómico viral del provirus insertado en la línea celular INER-51 derivada de cáncer pulmonar, sin embargo no se detectó la expresión de dicho provirus.

4. Se construyó un análisis filogenético del gen “env” de MMTV con las secuencias reportadas en Genbank (cáncer de mama humano de diferentes regiones geográficas y cáncer de mama en ratón) y las secuencias provirales: de la línea celular INER-51 y de las muestras de cáncer de pulmón positivas, observando como éstas se agrupaban indiscriminadamente, sin formar un clado en particular, indicando que la misma cepa de MMTV está presente en ratón y humano.

5. Se construyó un análisis filogenético de las regiones reguladoras “LTR” de MMTV en las secuencias reportadas en Genbank (cáncer de mama humano, linfoma no-Hodgkin y cáncer de mama en ratón) y las secuencias provirales: de la línea celular INER-51; y de las muestras de cáncer de pulmón positivas, observando cómo las secuencias aisladas a partir de pulmón formaban un solo grupo indicando que el virus presente en pulmón presenta variaciones significativas en la región reguladora, al que infecta tejido mamario humano y de ratón. En el alineamiento múltiple de las secuencias *LTR*, observamos cambios y pérdidas de nucleótidos con respecto al MMTV murino que se conservan entre las secuencias de MMTV presentes en tejido humano.

CONCLUSION FINAL - Este estudio confirma la presencia de un provirus like-MMTV completo insertado en células de cáncer pulmonar, asociado a los provirus aislados de tumores mamarios humanos y de ratón.



LITERATURA CITADA

Abritta A. 2000. Actitud Médica, Prevención y Diagnóstico Precoz en Cáncer de Pulmón. *Rev Argent Canc.* 28: 5-7

Ahmed I, Harvey JR, Ali S, Kirby JA, Lennard TWJ. 2008. Mouse mammary tumor virus: a cause of breast cancer in humans? *Cancer Ther.* 6:537-544

Amarante MK, Ehara MA. 2009. The possible involvement of virus in breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.* 135:329-337

Baillie GJ, Van de Lagemaat LN, Baust C, Mager DL. 2004. Multiple groups of endogenous betaretroviruses in mice, rats, and other mammals. *J Virol.* 78:5784-98.

Bentvelzen P, Brinkhof J. 1980. Expression of mammary tumour virus in late-appearing mammary carcinomas in presumed virus-free mice. *Eur J Cancer.* 16:267-71.

Bindra A, Muradrasoli S, Kisekka R, Nordgren H, Wärnberg F, Blomberg J. 2007. Search for DNA of exogenous mouse mammary tumor virus-related virus in human breast cancer samples. *J Gen Virol.* 88:1806-9.

Bittner JJ. 1936. Some possible effects of nursing on the mammary gland tumor incidence in mice. *Science.* 84:162.

Bouvard V, Baan R, Straif K, Grosse Y, Secretan B, El Ghissassi F, Benbrahim-Tallaa L, Guha N, Freeman C, Galichet L, Coglianò V. 2009. A review of human carcinogens--Part B: biological agents. *Lancet Oncol.* 10:321-322.

Braoudaki M, Tzortzatou-Stathopoulou. 2011. Tumorigenesis related to retroviral infections. *J Infect Dev Ctries.* 5:751-8.

Brambilla E. 2009. Epigenetic modifications in lung cancer *Ann Pathol.* 29 Spec No 1:S31-3. PMID: 19887246



Buchsacher G. 2003. Lentiviralvector Systems forgenetransfer. Landes Biosciences. 45-48pp.

Butel J. 2000. Viral carcinogenesis: revelation of molecular mechanisms and etiology of human disease. *Carcinogenesis*. 21:405-426.

Callahan, R.; Smith, G.H. 2008. The mouse as a model for mammary tumorigenesis: history and current aspects. *J. Mammary Gland Biol. Neopl.* 13:269.

Cheng YW, Chiou HL, Sheu GT. 2001. The Association of Human Papillomavirus 16/18 infection with lung cancer among nonsmoking Taiwanese women. *Cancer Res*. 61:2799-2803.

Coffin JM, Hughes SH, Varmus HE. 1997. *Retroviruses*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 161-263pp

Dingli D, Nowak MA.2006. Cancer biology: infectious tumour cells. *Nature*. 443:35-6.

Etkind P, Du J, Khan A, Pillitteri J, Wiernik PH. 2000. Mouse Mammary Tumor Virus-like ENV Gene Sequences in Human Breast Tumors and in a Lymphoma of a Breast Cancer Patient. *Clin Cancer Res*. 6:1273–1278.

Etkind PR, Stewart AF, Dorai T, Purcell DJ, Wiernik PH. 2004. Clonal isolation of different strains of mouse mammary tumor virus-like DNA sequences from both the breast tumors and non-Hodgkin's lymphomas of individual patients diagnosed with both malignancies. *Clin Cancer Res*. 10:5656-64.

Fan H.1997. Leukemogenesis by Moloney murine leukemia virus: a multistep process. *Trends Microbiol*. 5:74-82.

Feng H, Shuda M, Chang Y, Moore PS. 2008. Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma. *Science*. 319:1096-100.

Ford CE, Faedo M, Crouch R, Lawson JS, Rawlinson WD. 2004. Progression from Normal Breast Pathology to Breast Cancer Is Associated with Increasing



Prevalence of Mouse Mammary Tumor Virus-Like Sequences in Men and Women. *Cancer Res.* 64:4755–4759

Frank AP. 2008. Human papillomavirus DNA versus papanicolaou screening tests for cervical cancer. *N Engl J Med.* 358:642; author reply 643.

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.* 80:1447-5.

Gallahan D, D'Hoostelaere LA, Potter M. 1986. Endogenous MMTV proviral genomes in fetal *Mus musculus domesticus*. *Curr Top Microbiol Immunol.* 127:362–370

Grassmann R, Aboud M, Jeang KT. 2005. Molecular mechanisms of cellular transformation by HTLV-1 Tax. *Oncogene.* 24:5976–5985.

Harpreet J. 2009. The need for hypothesis testing in MMTV-like virus (MMTV-LV) studies. *J Hepatology.* 51: 414-415.

Haynes BF, Palker TJ. 1997. *Microbiología.* 2ª Ed. *Retrovirus Humanos.* Cap. 7. pp. 323-354

Held W, Acha H, MacDonald HR. 1994. Superantigens and retroviral infection: insights from mouse mammary tumor virus. *Immunol Today.* 15:184-90.

Hsu WL, Lin HY, Chiou SS, Chang CC, Wang SP, Lin KH, Chulakasian S, Wong ML, Chang SC. 2010. Mouse mammary tumor virus-like nucleotide sequences in canine and feline mammary tumors. *J Clin Microbiol.* 48:4354-62.

Indik S, Günzburg WH, Salmons B, Rouault F. 2005. Mouse Mammary Tumor Virus Infects Human Cells. *Cancer Res.* 65:6651–6659.

INEGI 2009. <http://www.inegi.org.mx/inegi/default.aspx> (Consulta: Julio 2012)

Javier RT, Butel JS. 2008. The history of tumor virology. *Cancer Res.* 68:7693-706..



Jemal A, Murray T, Ward E, Samuels A, Tiwari RC, Ghafoor A, Feuer EJ, Thun MJ. 2005. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 55:10-30.

Kasai K, Sato Y, Kameya T, Inoue H, Yoshimura H, Kon S, Kikuchi K. 1994. Incidence of latent infection of Epstein-Barr virus in lung cancers: an analysis of EBER-1 expression in lung cancer by in situ hybridization. *J Pathol.* 174:257-265.

Kumar V, Abbas AK, Fausto N. 2005. *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease.* 7a ed. Elsevier. Cap7. pp 273-347.

Lawson JS, Glenn WK, Salmons B, Ye Y, Heng B, Moody P, Johal H, Rawlinson WD, Delprado W, Lutze-Mann L, Whitaker NJ. 2010. Mouse mammary tumor virus-like sequences in human breast cancer. *Cancer Res.* 70:3576-85.

Liu B, Wang Y, Melana SM, Pelisson I, Najfeld V, Holland JF, Pogo BG. 2008. Identification of a proviral structure in human breast cancer. *Cancer Res.* 61:1754-9.

Maeda N, Fan H, Yoshikai Y. 2008. Oncogenesis by retrovirus: old and new paradigms. *Rev Med Virol.* 18:387-405.

Mant C, Cason J. 2004. A human murine mammary tumour virus-like agent is an unconvincing aetiological agent for human breast cancer. *Rev Med Virol.* 14:169-77.

Martel C, Franceschi S. 2009. Infections and cancer: established associations and new hypotheses. *Crit Rev Oncol Hematol.* 70:183-94 20.

Matsuoka M, Jeang KT. 2007. Human T-cell leukaemia virus type 1 (HTLV-1) infectivity and cellular transformation. *Nat Rev Cancer.* 4:270-80.

Melana SM, Nepomanschy I, Sakalin M, Abbott A, Hasa J, Holland JF, Pogo BGT. 2007. Characterization of viral particles isolated from primary cultures of human breast cancer cells. *Cancer Res.* 67: 8960-8965.

Melana SM, Nepomanschy I, Hasa J, Djougarian A, Holland JF, Pogo BGT. 2010. Detection of human mammary tumor virus proteins in human breast cancer cells. *J Virol Methods.* 163:157-161.



McLaughlin ME, Munger K. 2008. Viruses Associated with Human Cancer Biochim Biophys Acta. 1782:127–150.

McNally, RJ, Eden, TO. 2004. An infectious aetiology for childhood acute leukaemia: a review of the evidence. J. Cancer. 39:1586–1593.

Müllner M, Salmons B, Günzburg WH, Indik S. 2008. Identification of the Rem-responsive element of mouse mammary tumor virus. Nucleic Acids Res. 36:6284-94.

Murray PR, Pfaller MA. 2006. Microbiología Médica. 5aEd. Elsevier. Cap 65. pp 657-674

OMS 2009 <http://www.who.int/cancer/en/index.html> Consulta: Junio 2010 Fact sheet N°297

OMS 2011 <http://www.who.int/cancer/en/index.html> Consulta: Julio 2012

Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. 2005. Global cancer statistics, 2002. CA Cancer J Clin. 55:74-108.

Parkin DM. 2006. The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. Int J Cancer. 118:3030-3044.

Risch HA. 2004. Re: Are women more susceptible to lung cancer? J Natl Cancer Inst. 96:1560.

Rivera RM, Salazar M. 2002. Cáncer pulmonar: Distribución de acuerdo al tipo histológico. Estudio de autopsias. Rev Inst Nal Enf Resp Mex. 15:84-89

Rollini P, Billotte J, Kolb E, Diggelmann H. 1992. Expression pattern of mouse mammary tumor virus in transgenic mice carrying exogenous proviruses of different origins. J Virol. 66:4580-6.

Ross SR. 2010. Mouse mammary tumor virus molecular biology and oncogenesis. Viruses. 2:2000-12.

Ruddon RW. 2007. Cancer Biology, 4th ed. Oxford University Press, Oxford.



Senra V. 2002. Cancer: Etiology, Epidemiology, Diagnosis and Prevention. Elsevier España

Soriano V. 2003. Secuencias largas terminales repetidas de los retrovirus: Estructura y Función. Medicina Clínica UANL. 121:74-77.

Sun S, Schiller JH, Gazdar AF. 2007. Lung cancer in never smokers--a different disease. Nat Rev Cancer. 7:778-90.

Takeda E, Tsuji-Kawahara S, Sakamoto M, Langlois MA, Neuberger MS, Rada C, Miyazawa M. 2008. Mouse APOBEC3 restricts friend leukemia virus infection and pathogenesis in vivo. J Virol. 82:10998-1008.

Thun MJ, Henley SJ, Burns D, Jemal A, Shanks TG, Calle EE. 2006. Lung cancer death rates in lifelong nonsmokers. J Natl Cancer Inst. 98:691-9.

Trejo-Avila LM, Zapata-Benavides P, Barrera-Rodríguez R, Badillo-Almaráz I, Saavedra-Alonso S, Zamora-Avila DE, Morán-Santibañez K, Garza-Sáenz JA, Tamez-Guerra R, Rodríguez-Padilla C. 2011. Mouse mammary tumor virus-like gene sequences are present in lung patient specimens. Virol J. 8:451.

Tustin RC. 1969. Ovine Jaagsiekte. J South African Vet Med Assoc. 1:3-23.

Wang Y, Holland JF, Bleiweiss IJ, Melana S, Liu X, Pelisson I, Cantarella A, Stellrecht K, Mani S, Pogo BGT, 1995. Detection of mammary tumor virus env gene-like sequences in human breast cancer. Cancer Res. 55:5173-5179.

Wang Y, Pelisson I, Melana SM, Go V, Holland JF, Pogo BGT. 2001. MMTV-like env gene sequences in human breast cancer. Brief Report. Arch Virol. 146:171-180.

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. Oncol Rep. 10:1025-9.

Xu L, Wrona TJ, Dudley JP. 1997. Strain-specific expression of spliced MMTV RNAs containing the superantigen gene. Virology. 236:54-65.



Yang NS, McGrath CM, Furmanski P. 1978. Presence of a mouse mammary tumor virus-related antigen in human breast carcinoma cells and its absence from normal mammary epithelial cells. J Natl Cancer Inst. 61:1205-8.

Zangen R, Harden S, Cohen D, Parrella P, Sidransky D. 2002. Mouse mammary tumor-like env gene as a molecular marker for breast cancer? Int J Cancer. 102:304-7.

Zapata-Benavides P, Saavedra-Alonso S, Zamora-Ávila D, Vargas-Rodarte C, Barrera-Rodríguez R, Salinas-Silva J, Rodríguez-Padilla C, Tamez-Guerra R, Trejo-Ávila L. 2007. Mouse Mammary Tumor Virus-Like Gene Sequences in Breast Cancer Samples of Mexican Women. Intervirology. 50:402-407.

ZurHausen H. 2002. Papillomaviruses and cancer: From basic studies to clinical Application. Nature. 2:342-350